



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

**CAROLINY GOMES DE OLIVEIRA**

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO BETACAROTENO PRODUZIDO  
POR *Rhodotorula glutinis* TENDO COMO SUBTRATO O SUCO DE  
CAJU**

FORTALEZA

2010

CAROLINY GOMES DE OLIVEIRA

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO BETACAROTENO PRODUZIDO  
POR *Rhodotorula glutinis* TENDO COMO SUBTRATO O SUCO DE  
CAJU**

Trabalho Final de Curso submetida  
à Coordenação do Curso de Graduação em  
Engenharia Química da Universidade Federal  
do Ceará, como requisito parcial para  
obtenção do grau de Bacharel em Engenharia  
Química.

Orientadora: Prof.(a) Dra. Andrea Lopes de  
Oliveira Ferreira

FORTALEZA

2010

CAROLINY GOMES DE OLIVEIRA

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO BETACAROTENO PRODUZIDO POR  
*Rhodotorula glutinis* TENDO COMO SUBSTRATO O SUCO DE CAJU**

Trabalho de conclusão de curso submetida à Coordenação do Curso de Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Química.

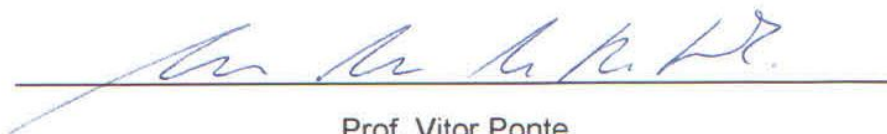
Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 10 / 12 / 2010

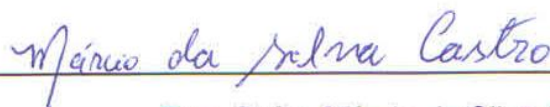
BANCA EXAMINADORA



Msc. Tigressa Helena Soares Rodrigues  
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Vitor Ponte  
Universidade Federal do Ceará - UFC



Eng. Quím. Márcio da Silva Castro  
Universidade Federal do Ceará - UFC

FORTALEZA - CE

2010

"O conhecimento é o processo de acumular dados; a sabedoria reside na sua simplificação"

*(Martin H. Fischer)*

A Deus

Aos meus pais Socorro e Francisco

A minha madrinha Zulene

A meu namorado Jaderson

Aos meus amigos

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, o Senhor de todas as coisas, que me fez chegar onde estou.

Aos meus pais, Francisco e Socorro, pelo amor, dedicação, apoio em todos os momentos. Estejam certos que essa vitória também é de vocês.

Aos meus avós, Laura e Zé Gino, e minha avó Maria que sempre torceram por mim.

A minha madrinha Zulene que sempre me deu muito carinho, me orientou e me auxiliou na minha educação.

Aos meus irmãos (George e Edson), tios (José Maria e José da Paz), tias (Helena, Dudu, Prazer) e primos que sempre me apoiaram e incentivaram.

Ao meu namorado Jaderson por todo amor e paciência para comigo, pelo constante apoio, incentivo e confiança.

A orientadora e amiga Dr<sup>a</sup>. Andrea Lopes Oliveira Ferreira, pela orientação, incentivo, disponibilidade e confiança nos últimos anos, além de sua amizade e apoio.

Ao professores do Departamento de Engenharia Química, pelos grandes ensinamentos que contribuíram para a minha formação.

A todos os amigos de turma, mas especialmente Cesár, Daniel, Felipe Sá, Filipe Xavier, Jeann, João, Julianne, Regiane, Régis, Tamires por compartilhar experiências e pela ótima convivência ao longo desses anos.

Ao Laboratório de Grupo de Pesquisas e Desenvolvimento de Processos (GPBIO) pela utilização do laboratório, e em especial a Tigressa Helena por me acompanhar nos experimentos e me auxiliar sempre quando necessário.

A todos que torceram por mim e contribuíram de alguma forma, seja diretamente ou indiretamente, meu muito obrigado.

## RESUMO

Carotenóides são pigmentos naturais, encontrados em fungos, bactérias, animais, em tecidos verdes de plantas e de órgãos não fotossintéticos como frutas, flores, sementes e raízes. Sua função biológica mais fundamentada é a atividade provitamínica A. Este trabalho descreve processo de separação e purificação parcial de betacaroteno visando seu uso na indústria alimentícia e cosmética. O microrganismo utilizado neste trabalho foi a levedura *Rhodotorula glutinis* por apresentar altas taxas de crescimento em substratos de baixo custo e de alto teor de açúcar. O substrato utilizado nesse trabalho foi o suco de caju, trata-se de um substrato não convencional, mas é utilizado por ser abundante no Nordeste, ter um baixo custo e possuir em sua composição todos os nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo. Após cultivo, a biomassa foi separada por centrifugação, e em seguida, o betacaroteno produzido foi recuperado por diferentes técnicas de extração com os solventes: acetona, etanol, acetona-etanol, associadas ao sistema de ultrassom; além do uso de dimetilsulfóxido com uma mistura de éter de petróleo e acetato de etila 1:1 (v/v). Os extratos foram então separadas por centrifugação, e o sobrenadante foi coletado para análise. Após extração, utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação dos produtos. Durante a análise apenas na extração com dimetilsulfóxido foi possível verificar e quantificar o betacaroteno a partir dos tempos de retenção dos padrões do betacaroteno.

**Palavras chaves:** Betacaroteno, suco de caju, purificação, extração solvente, CLAE.

## ABSTRACT

Carotenoids are natural pigments found in filamentous fungi, yeasts, some species of bacteria, algae, and lichens. Their biological function is to be the most efficient precursor to vitamin A. This work presents a study of methods for separation and pre purification of beta-carotene aiming its use in food and cosmetic industries. The microorganism used in this work was the yeast *Rhodotorula glutinis* to present high growth rates on substrates of low cost and high sugar content. The substrate used in this work was the cashew juice, it is a substrate unconventional, but it used to be abundant in the Northeast, have a low cost in its composition and possess all the necessary nutrients for microbial growth. After cultivation, biomass was separated by centrifugation and then the beta-carotene produced was recovered by different solvent extraction techniques: acetone, ethanol, acetone-ethanol, associated or not with the ultrasound system, and also using dimethyl sulfoxide with a mixture of petroleum ether and ethyl acetate 1:1 (v / v). The mixtures were then separated by centrifugation and the supernatant was collected for analysis. After extraction, we used high performance liquid chromatography (HPLC) for quantification of products. The quantification of carotenoids was possible only in the extraction with dimethyl sulfoxide and the production of beta-carotene verify and quantify based on the retention times with patterns of beta-carotene.

**Key words:** Beta-carotene, cashew apple juice, purification, solvent extraction, HPLC.



## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vii</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. CAROTENÓIDES</b> .....	<b>3</b>
2.1.1.Importância e aplicações.....	3
2.1.2.Estrutura química e propriedades .....	4
<b>2.2. BETACAROTENO</b> .....	<b>5</b>
2.2.1.Microorganismos produtores.....	6
2.2.2.Importância e Aplicações industriais .....	8
<b>2.3. SUCO DE CAJU COMO FONTE DE CARBONO</b> .....	<b>10</b>
<b>2.4 PURIFICAÇÃO DE CAROTENÓIDES</b> .....	<b>11</b>
2.4.1.Clarificação .....	11
2.4.2.Extração e recuperação do betacaroteno .....	12
2.4.3.Espectrofotometria .....	12
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>14</b>
<b>3.1. MICROORGANISMOS E TÉCNICAS DE MANUTENÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>3.2 REAGENTES</b> .....	<b>14</b>
<b>3.3. PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA</b> .....	<b>15</b>
3.3.1.Meio de Inóculo e Propagação.....	15
3.3.2.Meio de cultivo .....	16
3.3.2.1. Clarificação do suco de caju .....	16
3.3.2.2.Cultivo em meio de suco de caju .....	16
<b>3.4 EXTRAÇÃO DO BETACAROTENO</b> .....	<b>17</b>
3.4.1.Extração com acetona.....	17
3.4.2. Extração com solvente acoplado ao ultrassom .....	17
3.4.3 Extração com Dimetilsufóxido .....	17
<b>3.5 ANÁLISE DO BETACAROTENO</b> .....	<b>18</b>
3.3.1.Análise em Espectrofotômetro .....	18
3.3.2.Análise em HPLC .....	18

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>4.1. EXTRAÇÃO DO BETACAROTENO</b> .....	<b>19</b>
4.1.1.Extração com acetona e etanol.....	19
4.1.2 Análises no microscópio.....	21
4.1.3 Extração com dimetilsufóxido.....	22
4.1.4 Análise por HPLC.....	23
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>27</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>28</b>
<b>7. ANEXOS</b> .....	<b>31</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Estrutura do betacaroteno (Omenn <i>et al.</i> , 1996) .....	1
Figura 2.1. Estrutura química de alguns carotenóides (a) xantofilas- zeaxantina ,lutéina , criptoxantina e astaxantina. (b) Carotenos- neurospereno, licopeno, $\beta$ -caroteno e $\alpha$ - caroteno, respectivamente (Silva,2004).....	4
Figura 2.2. Estrutura química e clivagem do $\beta$ -caroteno (AMBROSIO <i>et al.</i> , 2006).....	6
Figura 2.3. Provocada pelo ultrassom, deformação de uma bolha simples em colapso com a superfície a ser rompida.....	12
Figura 2.4. Espectros de absorção visível do licopeno (---), $\gamma$ -caroteno (- - -), $\beta$ -caroteno (-.-.-) e $\alpha$ caroteno (...) em éter de petróleo (Britton, 1995).....	13
Figura 3.1 <i>Rhodotorula glutinis</i> em ágar inclinado.....	14
Figura 3.2. Inóculo após 48 horas de cultivo, a 150 rpm, em temperatura ambiente.....	15
Figura 3.3.Esquema ilustrativo do funcionameno de um HPLC(Sousa,2007 com modificações.....	17
Figura 4.1. <i>Rhodotorula glutinis</i> após cultivo submerso em suco de caju,aumento de 100 x.....	21
Figura 4.2. <i>Rhodotorula glutinis</i> após cultivo submerso em suco de caju, aumento de 100 x, após uso de ultrassom e solvente: acetona por 15 minutos.....	21
Figura 4.3. <i>Rhodotorula glutinis</i> após cultivo submerso em suco de caju, aumento de 100 x, após uso de ultrassom e solvente: etanol por 15 minutos.....	22
Figura 4.4. <i>Rhodotorula glutinis</i> após cultivo submerso em suco de caju, aumento de 100 x, após uso de ultrassom e solvente: acetona/etanol por 15 minutos.....	22
Figura 4.5 Fermentado contendo 25%, 50%, 75%, 100% de suco de caju respectivamente.....	22
Figura 4.6 Betacaroteno liberado no sobrenadante contendo DMSO, éter de petróleo e acetato de etila, para diferentes concentrações de suco no meio.....	23
Figura 4.7 Cromatograma de betacaroteno obtido de cultivo submerso de <i>Rhodotorula glutinis</i> em suco de caju após purificação por ultrassom e solvente acetona.....	24
Figura 4.8 Curva padrão do Betacaroteno.....	24
Figura 4.9 Cromatograma de betacaroteno obtido de cultivo submerso de <i>Rhodotorula glutinis</i> em suco de caju após purificação por uso de DMSO, éter de petróleo e acetato de etila.....	25
Figura 7.1 Curva padrão de crescimento do microrganismo.....	31
Figura 7.2 Correlação linear para o betacaroteno .....	32

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Eficiência de transformação dos diversos carotenos em vitamina A (ESTEVES, 2006).....	6
Tabela 2.2: : Microrganismos e carotenóides produzidos biotecnologicamente (TATSCH, 2008).....	7
Tabela 4.1. Concentração de Betacaroteno utilizando somente acetona e acetona com o ultrassom .....	20
Tabela 4.2 Concentração de Betacaroteno extraído com solvente associado à técnica de ultrassom .....	20
Tabela 4.3 Concentração de betacaroteno produzido em diferentes porcentagens de suco de caju no meio .....	26

# Capítulo I

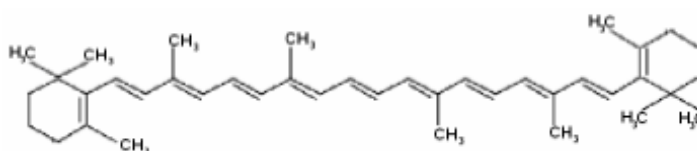
## Introdução

### 1. INTRODUÇÃO

Carotenóides são pigmentos naturais, encontrados em fungos, bactérias, animais, em todos os tecidos verdes de plantas e também de órgãos não fotossintéticos como frutas, flores, sementes e raízes (Bauernfiend, 1981a,b; Gordon & Bauernfiend, 1982). Os carotenóides são biologicamente importantes para os mamíferos e suas propriedades fotoquímicas, fotofísicas, bioquímicas e antioxidantes são amplamente estudadas. Sua função biológica mais fundamentada é a atividade provitamínica A.

Nas últimas décadas seu maior uso tem sido como corante natural em alimentos processados e em suplementos alimentares vendidos sem prescrição médica. O betacaroteno vem sendo investigado como um potencial remédio anti-câncer, mas as pesquisas clínicas ainda não conseguiram estabelecer uma relação de eficácia nesta área (Omenn *et al.*, 1996; Heinonen *et al.*, 1994; Hennekens *et al.*, 1996).

Betacaroteno (Figura 1.1) é sintetizado comercialmente há mais de 40 anos e apresenta uma escala de produção de 450 ton/ano. Industrialmente, os carotenóides, como o betacaroteno, apresentam uma crescente demanda e uma ampla variedade de aplicações comerciais, tais como agentes de coloração em alimentos (queijos, refrigerantes e margarinas), como aditivos em cosméticos, preparações multivitamínicas (Bhosale & Gadre, 2001).



**Figura 1.1** – Estrutura do betacaroteno (Omenn *et al.*, 1996)

Na última década, o betacaroteno vem sendo estudado como antioxidante para prevenir doenças (Chew *et al.*, 1999). A vitamina A e seus derivados como o betacaroteno são antioxidantes e como tal, ligam-se a radicais livres, defendendo os

lipídeos do corpo. Os radicais livres freqüentemente rompe ácidos graxos insaturados, prejudicando a habilidade da membrana em transportar substâncias para dentro e para fora da célula. Os radicais livres também prejudicam as proteínas celulares, alterando suas funções, e o DNA, perturbando todas as células que herdaram esse DNA danificado. Quando os radicais livres no corpo excedem as defesas contra eles, acontece o conhecido estresse oxidativo. Há uma ligação íntima entre esse estresse e doenças como artrite, catarata, doenças renais, alguns tipos de câncer e doenças cardiovasculares (Campbel, 2000).

A produção industrial de carotenóides naturais por fermentação já é estabelecida e vem se expandindo. O processo de recuperação dos carotenóides, que possuem natureza intracelular, é um significativo fator nos custos de produção. Logo, a sua recuperação de forma eficiente vem chamando atenção em tempos recentes (AKSU E EREN, 2007).

Alguns trabalhos têm reportado métodos de extração e purificação de carotenóides de diversas origens. Liu *et al.* (1998) reportaram a utilização de extração por solventes orgânicos e posterior quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de retinol e carotenóides presentes no leite humano. Fleischmann *et al.* (2002) apresentaram uma purificação parcial e caracterização cinética de carotenóides extraído do marmelo (*Cydonia oblonga*). Estes autores realizaram um procedimento exaustivo que envolveu centrifugação, precipitação com acetona, ultrafiltração, focalização isoelétrica e eletroforese em gel de poliacrilamida.

Mais recentemente, Chen *et al.* (2005) utilizou extração com solventes orgânicos e posterior etapa cromatográfica (“High Speed Counter- Current Chromatography”) para isolar e purificar carotenóides bioativos da microalga *Microcystis aeruginosa*. Tendo em vista o conhecimento de que as operações de separação sólido-líquido são mais eficientes no que diz respeito ao rendimento e produtividade, etapas cromatográficas são essenciais em processos que envolve extração e purificação de bioprodutos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método eficiente para extrair o betacaroteno produzido a partir de cultivo submerso em suco de caju visando o uso deste produto na indústria cosmética e alimentícia, dando continuidade ao trabalho de produção de betacaroteno com suco de caju como substrato iniciado por Humberto Cavalcante Gondim, O microrganismo utilizado neste trabalho foi a levedura *Rhodotorula glutinis*.

## Capítulo II

### Revisão Bibliográfica

#### 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nos tópicos a seguir serão apresentadas informações sobre os carotenóides, especificamente sobre betacaroteno abordando definições, relevâncias, aplicações, aspectos industriais de produção, microrganismos produtores e fatores que influenciam a biorreação. Também apresentará informações sobre leveduras do gênero *Rhodotorula*, de processos de purificações e do uso de suco de caju como fonte de carbono em bioprocessos, servindo então como base teórica para as discussões levantadas posteriormente.

##### 2.1 Carotenóides

###### 2.1.1 Importância e aplicações

Os carotenóides são isoprenóides lipofílicos sintetizados por todos os microrganismos fotossintéticos e por algumas bactérias não-fotossintéticas e fungos. São encontrados na natureza em duas classes: carotenos e xantofilas. Os carotenos se caracterizam por serem hidrocarbonetos lineares que podem ser ciclizados em uma ou ambas as extremidades da molécula, como por exemplo o  $\beta$ -caroteno. (BOTELLA-PAVÍA E RODRIGUES-CONCEPCIÓN, 2006)

Os carotenóides compõem um grupo de pigmentos naturais responsáveis pelas cores amarelo, laranja e vermelho de muitos alimentos, como frutas, vegetais, gema de ovo, alguns peixes e crustáceos (MALDONADE *et al.*, 2007). São amplamente distribuídos na natureza com grande diversidade de estruturas e funções. Já foram isolados cerca de 800 carotenóides e mais de 600 tiveram suas estruturas elucidadas e aproximadamente 50 podem, teoricamente, ser convertidos em vitamina A (Rodriguez-

Amaya, 1993 b). Três formas da vitamina A são ativas no organismo: uma das formas, o retinol, é armazenado no fígado. As células convertem, quando necessário, o retinol em suas duas outras formas ativas, retinal e ácido retinóico.

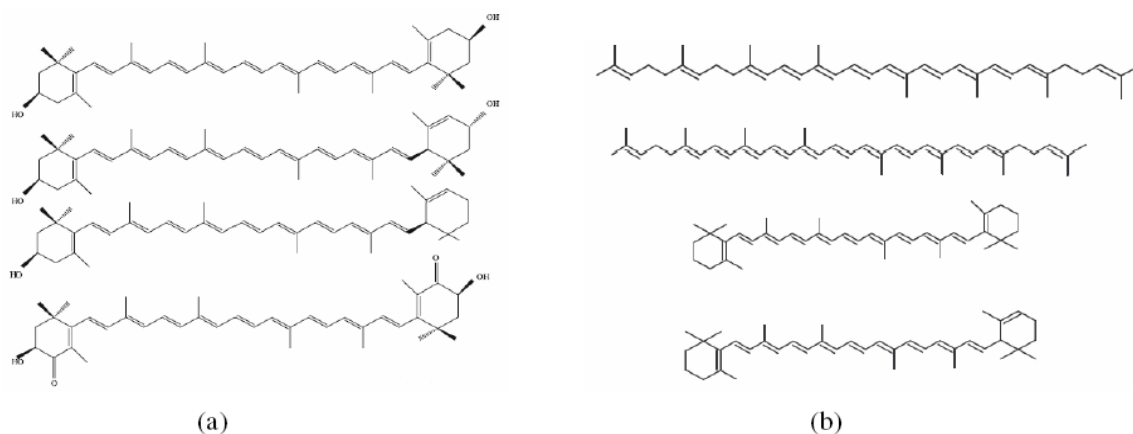
Esse grupo vem sendo estudado ao longo dos anos não somente pela sua comprovada atividade pró-vitamínica A, mas também pela evidência de outras propriedades biológicas benéficas à saúde, tais como o fortalecimento do sistema imunológico e a diminuição do risco de doenças degenerativas (certos tipos de câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular e catarata) (NIIZU, 2003)

Na indústria de alimentos, os carotenóides são utilizados principalmente como corantes, com os objetivos de repor a cor perdida durante o processamento e armazenamento, colorir os alimentos incolores e uniformizar a coloração de alguns produtos alimentícios (TATSCH, 2008). Industrialmente, os carotenóides como o  $\beta$ -caroteno e astaxantina são utilizados como corantes naturais para alimentos ou adicionados em ração para aquicultura (AKSU E EREN, 2007)

### 2.1.2 Estrutura química e Propriedades

Os carotenóides são isoprenóides lipofílicos sintetizados por todos os microrganismos fotossintéticos e por algumas bactérias não-fotossintéticas e fungos. São encontrados na natureza em duas classes: carotenos e xantofilas.

Os carotenos se caracterizam por serem hidrocarbonetos lineares que podem ser ciclizados em uma ou ambas as extremidades da molécula, como por exemplo o  $\beta$ -caroteno. Xantofilas são derivados oxigenados de carotenos, como luteína, violaxantina, neoxantina e zeaxantina (BOTELLA-PAVÍA & RODRIGUES-CONCEPCIÓN, 2006) (Figura 2.1).





**Figura 2.1:** Estrutura química de alguns carotenóides: (a) Xantofilas – zeaxantina, luteína, criptoxantina e astaxantina; (b) Carotenos – neurosporeno, licopeno,  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -caroteno, respectivamente (SILVA, 2004).

A maioria dos carotenóides são tetraterpenóides de quarenta carbonos, formado por oito unidades isoprenóides de cinco carbonos, são ligados de tal forma que a molécula é linear, simétrica e com a ordem invertida no centro. A estrutura básica acíclica  $C_{40}$  pode ser modificada por hidrogenação, desidrogenação, ciclização ou oxidação. A característica de absorção de luz destes pigmentos dá-se devido à cadeia de duplas ligações conjugadas que atua como cromóforo. São necessárias, sete ligações duplas conjugadas para que o carotenóide apresente coloração. Os pigmentos podem absorver luz especificamente na região do ultravioleta (UV) e visível do espectro, o restante é transmitido ou refletido, e apresentam cor.

Devido à alta taxa de insaturação, fatores tais como o calor, luz e ácidos ocasionam isomerização dos carotenóides *trans*, que é a forma mais estável na natureza, para a forma *cis*, perdendo a cor e atividade pró-vitáminica. Os carotenóides são também susceptíveis às oxidações enzimáticas ou não enzimáticas, que dependem da estrutura do carotenóide, disponibilidade de oxigênio, presença de enzimas, metais, pró-oxidantes e antioxidantes, alta temperatura e exposição à luz. (SCHROEDER & JOHNSON,1995) Os pigmentos podem absorver luz especificamente na região ultravioleta (UV) e visível do espectro, o restante é transmitido ou refletido, e apresentam cor. A estrutura responsável pela absorção da luz é o grupamento cromóforo, que nos carotenóides se caracteriza pelas duplas ligações conjugadas.

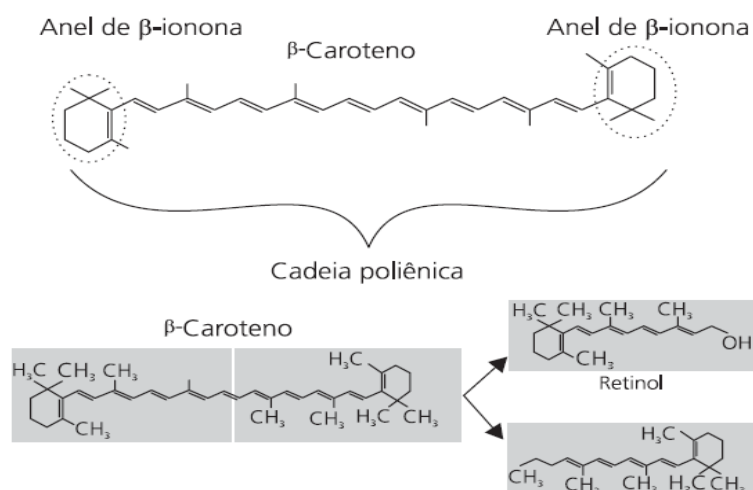
Cada carotenóide é caracterizado por um espectro de absorção eletrônica. Assim, a espectroscopia de absorção é uma importante técnica na análise de carotenóides (GROSS,1991).

## 2.2 Betacaroteno

Os carotenos são formados por oito unidades isoprênicas e estão presentes em quase todas as plantas verdes, os principais são o  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -caroteno e a criptoxantina. Dentre os isômeros presentes entre os carotenóides o mais importante é o  $\beta$ -caroteno, que se trata de um produto químico natural pertencente à classe dos

terpenos, que possuem, geralmente, 10, 15, 20 ou 30 átomos de carbono e são derivados de uma unidade de 5 átomos de carbono, o isopreno (2-metil-1,3-butadieno).

O  $\beta$ -caroteno é o caroteno mais abundante nos alimentos e o mais interessante economicamente, pois apresenta maior atividade vitamínica (AMBROSIO *et al.*, 2006). É o único carotenóide que apresenta dois radicais  $\beta$ -ionona, que ao romper-se forma duas moléculas de pró-vitamina A. (Figura 2.2).



**Figura 2.2:** Estrutura química e clivagem do  $\beta$ -caroteno (AMBROSIO *et al.*, 2006).

Sua eficiência de conversão em vitamina A é a mais elevada entre os demais carotenóides, vê-se pela tabela 2.1, que sua eficiência é de 100% (ESTEVES, 2006).

**Tabela 2.1:** Eficiência de transformação dos diversos carotenos em vitamina A (ESTEVES, 2006)

TIPO DE CAROTENO	% DE CONVERSÃO (EM MASSA)
$\alpha$ -caroteno	53
$\beta$ -caroteno	100
$\gamma$ -caroteno	53
criptoxantina	57

### 2.2.1 Microorganismos produtores

Os carotenóides podem ser biossintetizados por microrganismos fotossintetizantes, como algas e cianobactérias, e por microrganismos não fotossintetizantes como bactérias, fungos e leveduras (JOHNSON & SCHROEDER,

1995). Na Tabela 2.2 vemos os microrganismos que possuem potencial para serem empregados na produção industrial de carotenóides e quais os principais carotenóides produzidos.

**Tabela 2.2:** Microrganismos e carotenóides produzidos biotecnologicamente (TATSCH, 2008)

<b>Espécies</b>	<b>Carotenóides principais</b>	<b>Autores</b>
<b>Cianobactérias</b>		
<i>Anabaena variabilis</i>	Cantaxantina	Johnson & Schroeder (1995)
<i>Aphanizomenon flos-aqua</i>	Cantaxantina	Johnson & Schroeder (1995)
<i>Nostoc commune</i>	Cantaxantina	Johnson & Schroeder (1995)
<b>Algas</b>		
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Luteína	Johnson & Schroeder (1995)
<i>Dictyococcus cinnabarinus</i>	Cantaxantina	Johnson & Schroeder (1995)
<i>Dunaliella salina</i>	$\beta$ -caroteno	Aguilar et al. (2004)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	$\beta$ -caroteno	Fazeli et al. (2006)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxantina	Orosa et al. (2004)
<i>Spongiococcum excetricum</i>	Luteína	Johnson & Schroeder (1995)
<b>Fungos e leveduras</b>		
<i>Blakeslea trispora</i>	$\beta$ -caroteno e licopeno	Johnson & Schroeder (1995)
<i>Dacrymyces deliquescens</i>	Luteína	Johnson & Schroeder (1995)
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxantina e $\beta$ -caroteno	Liu et al. (2006); Parajó et al. (1998)
<i>Rhodospiridium sp</i>	Toruleno, $\beta$ -caroteno	Johnson & Schroeder (1995)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Torularrodina, $\beta$ -caroteno, toruleno	Buzzini & Martini (1999)
<i>Rhodotorula graminis</i>	Toruleno	Buzzini et al. (2005)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Toruleno, torularrodina e $\beta$ -caroteno	Buzzini & Martini (1999)
<i>Rhodotorula rubra</i>	$\beta$ -caroteno	Shih & Hang (1996)
<i>Rhodotorula spp</i>	Toruleno, torularrodina e $\beta$ -caroteno	Bhosale & Grade (2001)
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	$\beta$ -caroteno	Valduga (2005)
<i>Sporidiobolus sp</i>	Toruleno, torularrodina, $\beta$ -caroteno	Johnson & Schroeder (1995)
<i>Sporobolomyces roseus</i>	Torularrodina, $\beta$ -caroteno, toruleno	Davoli et al. (2004)
<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	Torularrodina, $\beta$ -caroteno,	Razavi & March (2006)
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Astaxantina	Hu et al. (2006)
<b>Bactérias</b>		
<i>Mycobacterium brevicai</i>	Cantaxantina	Johnson & Schroeder (1995)
<i>Mycobacterium lacticola</i>	Astaxantina	Johnson & Schroeder (1995)
<i>Rhodococcus maris</i>	Cantaxantina	Johnson & Schroeder (1995)
<i>Streptomyces chrestomyceticus</i>	Xantofilas	Johnson & Schroeder (1995)

O betacaroteno pode ser obtido de diversas espécies de fungos, leveduras e algas. Entretanto, somente certas espécies são capazes de sintetizar em quantidade suficiente para permitir sua produção em escala industrial. Tal limitação baseia-se em razões fundamentais como: tipo de carotenóide produzido e o rendimento que se é possível obter.

As leveduras destacam-se pelo seu uso como fonte protéica e capacidade de crescimento em substratos de baixo custo e alto teor de açúcar. Os tipos de carotenóides e a quantidade relativa destes podem variar dependendo das condições do meio de cultura, temperatura, pH, taxa de aeração e luminosidade (HAYMAN *et al.*, 1974).

A produção de carotenóides por rota biotecnológica tem sido bastante estudadas com a finalidade de otimizar a bioprodução de carotenóides, visando sua utilização industrial, tendo destaque a produção comercial de  $\beta$ -caroteno pelas leveduras como *Xanthophyllomyces dendrorhous* (FONTANA *et al.*, 1996), *Rhodotorula glutinis* (TINOI *et al.*, 2005; AKSU E EREN, 2007), *Sporobolomyces* (DAVOLI *et al.*, 2004) e *Phaffia* (LIU *et al.*, 2006)..

### **2.2.2 Importância e Aplicações industriais**

O betacaroteno é um antioxidante. Essa provitamina se liga a radicais livres, ou seja, ela defende os lipídeos do corpo. O dano por radicais livres freqüentemente rompe ácidos graxos insaturados, prejudicando a habilidade da membrana em transportar substâncias para dentro e para fora da célula. Os radicais livres também prejudicam as proteínas celulares, alterando suas funções, e o DNA, perturbando todas as células que herdaram esse DNA danificado. Quando os radicais livres no corpo excedem as defesas contra eles, acontece o conhecido estresse oxidativo. Há uma ligação íntima entre esse estresse e doenças como artrite, catarata, doenças renais, alguns tipos de câncer e doenças cardiovasculares.

O estudo da produção de betacaroteno é recentemente incentivado principalmente pelo fato que a utilização de corantes artificiais vem sendo questionada devido aos possíveis problemas que podem ocasionar à saúde, levando a FAO (Food And Agriculture Organization) que é órgão da ONU a tomar medidas restritivas ao seu

uso, fato que contribui para aumentar a demanda de corantes naturais em detrimento dos sintéticos. No Brasil, a legislação de alimentos e cosméticos está a cargo do Ministério da Saúde. As normas brasileiras para corantes e aditivos têm por base as americanas, especificadas pelo FDA (Food and Drug Administration).

No Brasil, por exemplo, diversos estados já tratam da proibição do uso de corantes artificiais. As indústrias, por força das restrições, têm recorrido aos produtos naturais, como o betacaroteno. Essa substituição é mais intensa em países de maior desenvolvimento econômico, como é o caso dos países europeus, dos Estados Unidos e do Japão.

A produção industrial de carotenóides utilizando microrganismos é altamente eficiente, uma vez que são de fácil manipulação. As leveduras do gênero *Rhodotorula* são amplamente utilizadas na fermentação devido a sua natureza unicelular e as altas taxas de crescimento, sendo capaz de produzir  $\beta$ -caroteno e torularodeno como produtos finais do seu metabolismo. Além disso, não são patogênicas e são fortes em relação à desintegração (COSTA *et al.*, 1987; KAISER *et al.*, 2007).

Além do fato de não oferecer qualquer risco à saúde do consumidor, se ingerido dentro das margens de segurança sendo estas muito amplas, existem os fatores econômicos tais como: possibilidade de utilização de substratos de baixo custo para a bioprodução; denominação de substâncias naturais; pequeno espaço para produção, não estando sujeita às condições ambientais como clima, estação do ano ou composição do solo, e controle das condições de cultivo (SILVA, 2004).

O betacaroteno vem sendo sintetizado comercialmente há cerca de 40 anos, apresentando uma escala de produção de 450 ton/ano (Paust, 1991). Industrialmente, os carotenóides, como o betacaroteno, apresentam uma crescente demanda e uma ampla variedade de aplicações comerciais. Como corantes e suplementos nutricionais nas indústrias de alimentos, os carotenóides apresentam um mercado global estimado em US\$ 935 milhões/ano (FRASER *et al.*, 2004).

No segmento das indústrias não alimentícias (betacaroteno é usado em recheios de biscoitos, conservantes de farinhas), o betacaroteno pode ser usado nas seguintes categorias industriais: indústria farmacêutica (cremes faciais, remédios para pele, creme hidratante, pomadas cicatrizantes e etc) e indústria cosmética (produtos destinados à fabricação de bronzeadores, maquiagem, cremes, sabonetes e perfumes, óleo para cabelo, esmalte, batons, pós faciais, etc.) e em outras indústrias com potencial

de aplicação (têxtil, ceras para assoalho, graxas para sapato, filmes, tintas, vernizes, madeiras e etc). Sendo assim, as principais aplicações do betacaroteno são como agentes de coloração em alimentos (queijos, refrigerantes e margarinas), como aditivos em cosméticos, preparações multivitamínicas (Bhosale & Gadre, 2001).

### **2.3 Suco de caju como fonte de carbono**

A utilização de substratos alternativos, em processos fermentativos, visa o aproveitamento de matérias-primas agrícolas de baixo custo. Esta prática diminui o custo do meio de cultura utilizado e, conseqüentemente, do produto final. Além de fonte de carbono e demais nutrientes, os substratos agrícolas apresentam composição complexa. Sua composição total exata é muitas vezes desconhecida. Substratos agrícolas podem apresentar em sua composição elementos capazes de inibir o crescimento do microorganismo e/ou impedir a síntese do metabólito de interesse. Dessa forma, embora virtualmente qualquer substrato natural possa ser empregado como substrato para o cultivo de microorganismos, o estudo da viabilidade do emprego deste substrato é uma etapa necessária para assegurar sua utilização em larga escala.

O caju, largamente cultivado no Ceará, possui pedúnculo que é desperdiçado, pois o maior valor dessa cultura está associado à amêndoa da castanha. Embora o aproveitamento do pedúnculo apresente várias opções tecnológicas de industrialização, podendo ser aproveitado na elaboração de sucos, doces, refrigerantes, vinhos, polpas e outros produtos alimentícios, além do consumo *in natura*, o volume de pedúnculo produzido supera a quantidade processada.

Calcula-se que o país produza cerca de 1,5 milhão de toneladas de caju por ano. Considerando-se que o pseudo fruto corresponde a 90% do peso do caju, menos de 10% desse total é aproveitado industrialmente ou para consumo *in natura*, sendo grande parte perdida no campo, no momento do descastanhamento feito para a indústria de beneficiamento de castanha (LEITE, 1994).

Este substrato apresenta altos teores de glicose e frutose, que são assimiláveis e metabolizados por microorganismos, produzindo o produto de interesse, sendo então apropriado para o uso de fonte de carbono para produção de betacaroteno.

## **2.4 Purificação de Carotenóides.**

A produção industrial de carotenóides naturais por fermentação já é estabelecida e vem se expandindo. O processo de recuperação dos carotenóides, que possuem natureza intracelular, é um significativo fator nos custos de produção. Logo, a sua recuperação de forma eficiente vem chamando atenção em tempos recentes (AKSU E EREN, 2007).

Os processos de purificação de produtos biotecnológicos podem ser divididos em 4 etapas principais: separação de células e seus fragmentos do meio de cultivo (clarificação); concentração e/ou purificação de baixa resolução, a qual compreende a separação da molécula alvo; purificação de alta resolução, a qual compreende a separação de classes de moléculas com algumas características físico-químicas semelhantes; e finalmente, operações para acondicionamento final do produto.

Além disso, para o aproveitamento de produtos associados às células, é necessário efetuar o rompimento celular, processo que é efetuado sobre o adensado de células obtidos após a clarificação do meio de cultivo

### **2.4.1 Clarificação**

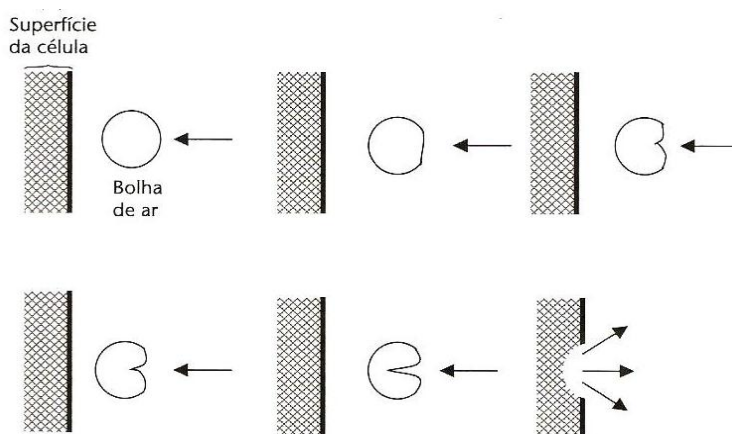
A separação de células suspensas de um meio de cultivo é a primeira operação unitária do processo de purificação. O meio resultante, isento de células, é denominado clarificado ou filtrado. A operação unitária de clarificação utilizada nesse trabalho foi a de centrifugação.

As células em suspensão em um meio líquido sofrem sedimentação por ação da força da gravidade, processo denominado sedimentação. A centrifugação consiste na aceleração da taxa de sedimentação, por ação de um campo gravitacional centrífugo. A clarificação de suspensões de leveduras por centrifugação é eficientemente realizada enquanto que, para as bactérias, a reduzida dimensão das partículas exige valores de  $F_c$ , que é o incremento da força da ação da gravidade na sedimentação forçada num campo centrífugo, significativamente maiores.

## 2.4.2 Extração e recuperação do betacaroteno

O aproveitamento de produtos associados às células requerem o rompimento destas por operações conduzidas sobre o adensado obtido após a clarificação. O tipo de rompimento depende de alguns fatores como: rendimento, especificidade, custo da operação unitária, entre outros. Os métodos de rompimento celular podem ser classificados como: mecânicos, não mecânicos, químicos e enzimáticos. (SCHUTTE E KULA, 1990)

Neste trabalho, utilizou-se para a extração e recuperação do betacaroteno o método de extração com solventes orgânicos (acetona e etanol), e foi avaliado a extração com esses solventes associados ao método mecânico de rompimento com ultrassom (Figura 2.3).



**Figura 2.3:** Provocada pelo ultrassom, deformação de uma bolha simples em colapso com a superfície a ser rompida.

Foi também utilizado o método de extração com dimetilsulfóxido (DMSO) com a mistura de éter de petróleo e acetato de etila (1:1) (v/v) para diferentes diluições do meio de suco de caju.

## 2.4.3 Espectrofotometria

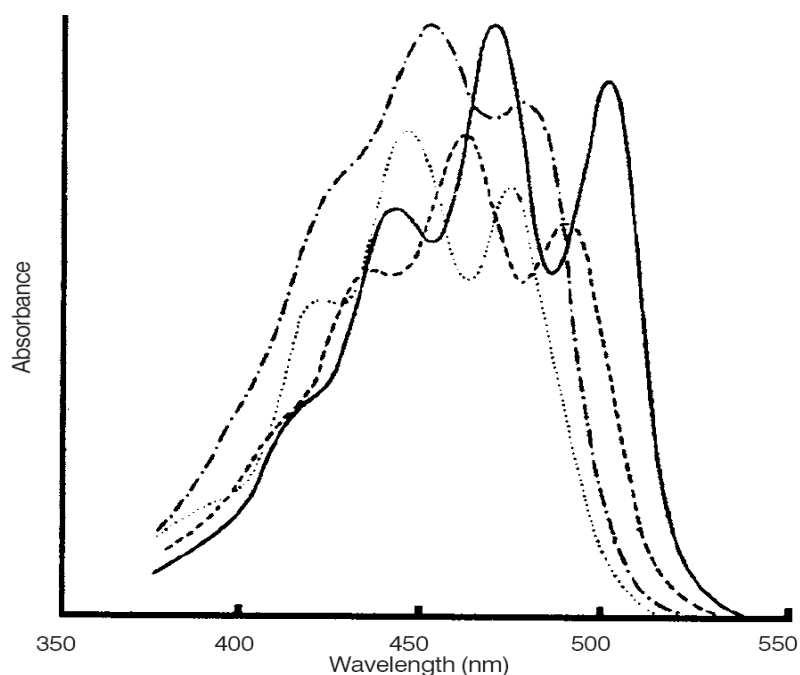
O sistema de ligação dupla conjugada constitui o cromóforo que absorvem luz que dá aos carotenóides sua cor atraente e fornece o visível espectro de absorção, que serve como base para a sua identificação e quantificação.



Perda ou alteração de cor em qualquer momento durante a análise dá uma indicação imediata da degradação ou alteração estrutural. A cor permite o acompanhamento visual da separação de carotenóides em cromatografia de coluna aberta e principalmente por esta razão esta técnica clássica ainda é um opção viável para a análise quantitativa de carotenóides.

O espectro ultravioleta e visível é a primeira ferramenta de diagnóstico para a identificação dos carotenóides. O comprimento de onda de absorção máxima ( $\lambda_{\max}$ ) e a forma do espectro (estrutura fina do espectro) são característicos do cromóforo, que são a parte ou conjunto de átomos de uma molécula responsável por sua cor. A estrutura-relação do espectro tem sido amplamente discutida.

A maioria dos carotenóides pode absorver ao máximo de três comprimentos de onda, resultando em três espectros de pico. Quanto maior o número de duplas conjugadas obrigações, maiores os valores  $\lambda_{\max}$ . Assim, o insaturado acíclico licopeno, com 11 conjugados ligações duplas, é vermelho e absorve o mais longo comprimento de onda ( $\lambda_{\max}$ , 444, 470 e 502 nm). Assim,  $\zeta$ - caroteno é amarelo claro. E os bicíclicos  $\beta$ -caroteno, embora possuindo o mesmo número de ligações duplas conjugadas como licopeno, é amarelo alaranjado e tem  $\lambda_{\max}$  a 450 e 477 nm, uma inflexão simples (ombro), a 425 nm como mostrado na Figura 2.4. (Britton's, 1995)



**Figura 2.4:** Espectros de absorção visível do licopeno (---),  $\gamma$ -caroteno (- - -),  $\beta$ -caroteno (-.-.-) e  $\alpha$ -caroteno (...) em éter de petróleo. (Britton's, 1995)

## Capítulo III

### Materiais e Métodos

#### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

##### 3.1 Microrganismos e Técnicas de manutenção

O microrganismo utilizado foi a levedura *Rhodotorula glutinis* doada pela Embrapa Agroindústria Tropical (Ceará), o meio de manutenção apresenta composição contendo ágar, peptona e dextrose (3:2:4). Após pesar os reagentes estes foram dissolvidos em água destilada e aquecidos para a sua total dissolução, o meio foi colocado em tubos de ensaio com rosca (25 x 150 mm) e esterilizados a 121 °C durante 15 minutos em autoclave (PHOENIX AV-50). Após a esterilização, o meio foi inclinado em bancada até completo resfriamento.

Após a inoculação no ágar, o crescimento (Figura 3.1) ocorreu em uma estufa de crescimento bacteriológico (ECB 1.3) a 30°C durante 3 a 5 dias. Posteriormente os tubos foram estocados no refrigerador (PRATICE 240 - CONSUL).



**Figura 3.1** - *Rhodotorula glutinis* em ágar inclinado

##### 3.2 Reagentes

Todas as soluções foram preparadas com componentes de grau analítico. Água obtida por osmose reversa Milli-Q water (18M $\Omega$ ) da Millipore (EUA) foi usada em todas as soluções e diluições. Os solventes (acetona, etanol, dimetilsulfóxido, acetato de etila, éter de petróleo) foram obtidos da Vetec e os padrões de betacaroteno foram obtidos da Sigma- Aldrich Chemical Co.

### 3.3 Preparação dos meios de cultura

#### 3.3.1 Meio de Inóculo e Propagação

O meio de inóculo utilizado nesse trabalho foi composto de 10 g/L de peptona bacteriológica e 20 g/L de dextrose dissolvidos em água destilada em um volume de 250 ml, distribuídas em 2 erlenmeyers cada um com 125 mL de meio. Após o preparo do meio, o mesmo foi esterilizado em autoclave durante 10 min em 110°C.

Com uma alça de inoculação foi transferida assepticamente uma amostra do microorganismo mantido no ágar inclinado para o meio de inóculo contido no erlenmeyer. O meio foi então incubado para o shaker orbital (TECNAL TE-420) por 48 horas a 30°C e 150 rpm (Figura 3.2). Em seguida, foi retirada uma amostra de 10 mL do fermentado e centrifugado (HATTICH- 1707) a 6000 rpm durante 10 minutos a temperatura de 10°C. O sobrenadante foi descartado e a biomassa foi novamente centrifugada com água destilada por mais duas vezes. A amostra foi transferida para um balão volumétrico de 250 mL e completado o volume, tendo então uma diluição de 25.

A amostra foi analisada em espectrofotômetro (GENESYS 20) a 600 nm, no qual foi possível determinar a concentração de biomassa no meio de ativação com o fator de diluição, a absorbância e o fator da curva de crescimento padrão do microorganismo onde:  $a^{-1}$  é o coeficiente angular da curva de crescimento padrão do microorganismo e tem valor de 0,994835 (Anexo 1). Obtida essa concentração determinou-se o volume necessário de inóculo correspondente a concentração inicial de 0,01 mg/mL para as fermentações.



**Figura 3.2:** Inóculo após 48 h de cultivo, a 150 rpm, em temperatura ambiente.

### **3.3.2 Meio de Cultivo**

#### **3.3.2.1 Clarificação do suco de caju**

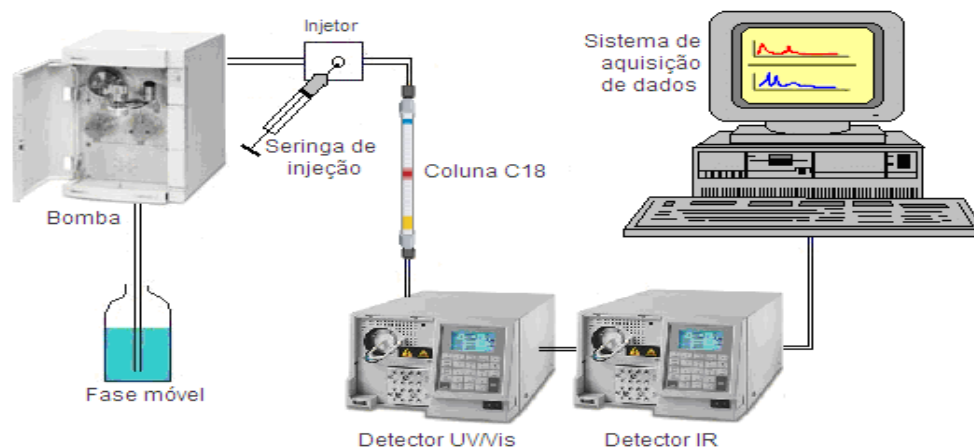
O suco de caju utilizado foi obtido junto à Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza-CE), que forneceu o suco já clarificado, sendo o mesmo caracterizado inicialmente quanto ao pH inicial (potenciometria direta) e açúcares redutores totais. A obtenção do suco a partir do pedúnculo, cultivado pela Embrapa no campo experimental de Pacajus – CE, foi realizada por prensagem mecânica. A clarificação do suco foi realizada através da adição de gelatina ao suco integral. A gelatina age como floculante de taninos e sólidos suspensos que interferem na fermentação, inibindo o crescimento microbiano.

O suco foi mantido em repouso por 12 horas em câmara fria (4°C) para decantação dos flocos formados, obtendo-se assim o suco clarificado. O suco clarificado, por não conter conservantes, foi mantido congelado (-20°C) até o momento de sua utilização. As etapas de processamento do pedúnculo para obtenção do suco integral, bem como sua clarificação foram realizadas na planta piloto da Embrapa Agroindústria Tropical.

#### **3.3.2.2 Cultivo em meio de suco de caju**

Um volume de meio de 100 mL contendo suco de caju clarificado foi colocado em um erlenmeyer de 250 ml, e esterilizados, durante 10 minutos a 110°C. Foi realizado diluições do suco de 25 %, 50%, 75 % para o estudo de quantidade de betacaroteno produzido em diferentes porcentagens de suco no meio. Posteriormente, na câmara de fluxo laminar, fez-se a inoculação do microrganismo em uma concentração de 0,01 mg/ml. Após a inoculação do meio de suco de caju o crescimento ocorreu em mesa agitadora, à temperatura constante de 30 °C, pH inicial de 7, velocidade de agitação de 150 rpm .

Após o crescimento do microrganismo foram feitas medições de absorbância através de curva de crescimento microbiano. Com o sobrenadante foram feitas medições de pH e quantificação de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Figura 3.3). E a biomassa foi submetida a extrações de betacaroteno quantificando por HPLC



**Figura 3.3:** Esquema ilustrativo do funcionamento de um HPLC (Sousa, 2007 com modificações).

### 3.4. Extração do betacaroteno

#### 3.4.1 Extração com Acetona

Foi testado primeiramente a acetona e para essa extração foi realizado o seguinte procedimento: foram centrifugados 5 mL do fermentado puro por 10 minutos a 6000 rpm, afim de concentrar as células do fermentado. Em seguida adicionou-se o solvente com razão de 1:1 (v/v) e foi centrifugado novamente por 10 minutos. Em intervalos de 15 minutos retirava-se uma amostra que foi submetida para análise em espectrofotômetro.

#### 3.4.2 Extração com solvente acoplado ao ultrassom

No procedimento com o ultrassom foi testado inicialmente com acetona e como foi notável uma maior liberação de carotenóides com o uso do ultrassom, foram testados também os solventes etanol e a mistura de acetona-etanol (1:1) (v/v) seguindo o mesmo procedimento descrito em 3.4.1 para efeitos comparativos.

#### 3.4.3 Extração com Dimetilsufóxido

Para a extração com DMSO foram testadas diferentes diluições do meio de suco de caju e foi realizado o seguinte procedimento: foram centrifugados 10 mL do meio fermentado por 10 minutos a 6000 rpm, sendo o sobrenadante descartado. Com a

biomassa foi adicionado 2,5 mL de DMSO, aquecido a 55°C em Banho Maria (TECNAL-TE 0541). Então foi levado ao agitador de tubos (Phoenix- AP 56) por 1 minuto e centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos. Guarda-se o sobrenadante e adiciona-se na biomassa 5 ml da mistura de éter de petróleo e acetato de etila de 1:1 (v/v) e agita-se por 1 minuto. Centrifuga-se então a 3000 rpm em 5 minutos. Retira-se o sobrenadante e mistura com o que foi anteriormente guardado. Esse procedimento é repetido mais 2 vezes, até que o sobrenadante guardado fique com coloração rosa e a biomassa ao perder o betacaroteno se torne branca.

### **3.5 Análise do betacaroteno**

#### **3.5.1 Análise em Espectrofotômetro**

Os carotenóides extraídos foram medidos como betacaroteno. Realizou-se um branco (2,9 mL do solvente com 0,1 mL de água destilada) e as amostras (2,9 mL do solvente com 0,1 mL do fermentado centrifugado) foram medidas em espectrofotômetro a 450 nm após realização de curva de calibração.

As amostras foram analisadas em microscópio para ter certeza de que todo betacaroteno havia sido extraído da levedura pelo processo de ultrassom e solvente. Amostras do meio foram retiradas antes e durante sua extração e foram analisadas em microscópio da marca Olympus CX21 com aumento de 100 × na objetiva. Uma câmera digital foi utilizada para capturar as imagens de 760 × 560 × 24 pixels com níveis de cinza do 0 (preto) ao 255 (branco). O parâmetro de medida foi a área (diâmetro) do microrganismo. Para cada amostra foram retirados o processo foi repetido três vezes usando posições diferentes da lâmina.

#### **3.5.2 Análise em HPLC**

Foram analisadas as amostras em HPLC, onde foram recolhidos 0,5 mL dos sobrenadantes extraídos. A fase móvel utilizada na curva de calibração e na quantificação das amostras era composta de metanol puro grau HPLC, com vazão de 1 mL/min em temperatura ambiente, numa coluna C18 Waters: Nova-Pak, 60Å, 5 µm de diâmetro, 3,9 × 150 mm. Para leitura do espectro de absorção dos carotenóides foi utilizado o detector de UV com comprimento de onda  $\lambda = 450$  nm. Como mostrado pela figura 2.4 este é o comprimento de onda máximo para identificar o betacaroteno.

## Capítulo IV

### Resultados e Discussão

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma etapa importante para a extração do betacaroteno foi a escolha do processo de separação, uma vez que o produto é intracelular e operações muito drásticas poderiam degradar o produto, pois o betacaroteno é uma molécula com fácil oxidação pela luz, temperatura e pH.

Assim, operações clássicas como moinhos de bolas foram excluídas por apresentarem localmente altas temperaturas, o que degradaria a molécula de betacaroteno. Além disso pelo o microrganismo se tratar de uma levedura, processos como filtração se tornaram inviáveis pelo fato de causarem severos problemas com entupimentos.

A despeito da natureza altamente lipolítica dos carotenóides, o betacaroteno é citosólico, ou seja, apresenta certo grau de hidrofília. Portanto, a seleção do método para a extração do betacaroteno produzido por cultivo submerso de *Rhodotorula glutinis* apresentou-se como o passo mais importante e difícil deste trabalho.

#### 4.1 Extração do betacaroteno

##### 4.1.1 Extração com acetona e etanol

Os solventes escolhidos foram acetona, etanol e acetona-etanol 1:1 (v/v) estes solventes apresentavam baixa toxicidade e valores de log  $P_o/w$  superiores a 4, ou seja, eram biocompatíveis. Inicialmente, testou-se como solvente a acetona, por apresentar baixa temperatura de vaporização e, portanto, fácil separação do produto recuperado. Foi testado então a extração com acetona acoplada ao ultrassom, afim de que se rompessem mais células, aumentando a concentração de betacaroteno e com

isso aumentando o rendimento. A Tabela 4.1 apresenta os resultados para extração com acetona com e sem o uso do ultrassom analisadas em espectrofotômetro

**Tabela 4.1:** Concentração de Betacaroteno utilizando somente acetona e acetona com o ultrassom

Tempo (min)	Concentração de betacaroteno (mg/L)	
	Extração com Acetona	Extração com Acetona acoplada a ultrassom
0	0	0
15	2,5	12,1
30	3,7	19,2
45	4,2	21,5
60	3,3	19,1

Através da Tabela 4.1 observa-se que a técnica de extração com o auxílio do ultrassom tornou o processo de extração mais eficiente, com base nesta observação foram testados os solventes etanol e acetona-etanol 50:50 (v/v), utilizando o ultrassom conforme metodologia descrita anteriormente. A Tabela 4.2 apresenta os resultados obtidos com os solventes testados.

**Tabela 4.2:** Concentração de betacaroteno extraído com solvente associado à técnica de ultrassom.

Tempo (min)	Solvente (mg/L)		
	Acetona	Etanol	Acetona/Etanol
0	0	0	0
15	12,1	9,2	8,4
30	19,2	11,3	7,9
45	21,5	12,0	4,5
60	19,1	10,5	9,1

Pode-se observar que foi necessário apenas 15 minutos para o betacaroteno do microrganismo ficar em solução em todos os solventes utilizados. A Tabela 4.2



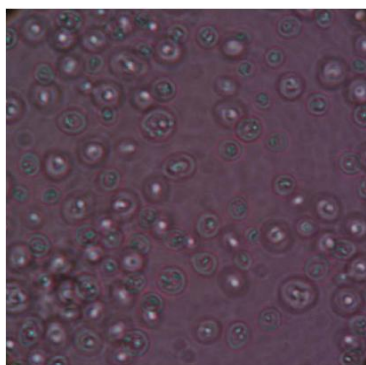
também mostra que no tempo de 45 minutos obteve-se o maior grau de recuperação do betacaroteno quando se utilizou acetona como solvente associado ao ultrassom, e para essas condições a concentração obtida foi de 21,5 mg/L.

Observa-se que os resultados obtidos para a mistura de acetona-etanol não foram muito satisfatórios, mostrando que houve uma influência negativa dessa combinação provavelmente por esses solventes possuírem estruturas moleculares muito diferentes.

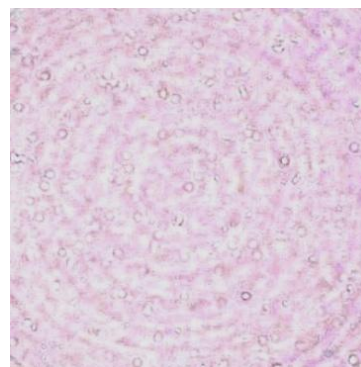
#### 4.1.2 Análises no microscópio

Antes e após a operação de extração com os solventes acetona, etanol e acetona-etanol foram analisadas amostras em microscópio para verificar a ruptura dos microrganismos. Verificou-se um baixo rendimento no processo de extração do betacaroteno. Assim, associada a técnica de extração com solvente, utilizou-se a técnica de ultrassom. A utilização desta técnica possibilitou maior eficiência na recuperação do betacaroteno.

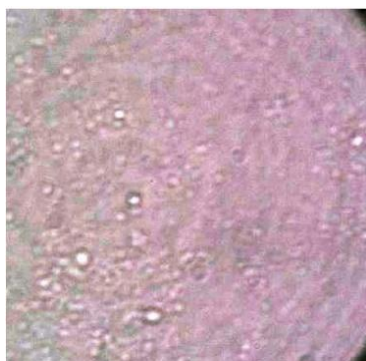
A Figura 4.1 mostra a amostra de *Rhodotorula glutinis* antes da adição do solvente, trata-se do fermentado puro e pode-se ver a levedura viável com coloração, observando as figuras 4.2, 4.3, 4.4 vê-se as amostras após o processo de extração com solventes (acetona, etanol, acetona com etanol) com o ultrassom. As figuras 4.2, 4.3 e 4.4 mostram que a levedura foi rompida e os carotenóides extraídos e tornando o meio com coloração bordô, cor característica do betacaroteno.



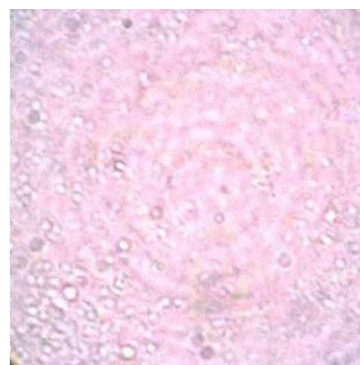
**Figura 4.1** – *Rhodotorula glutinis* após cultivo submerso em suco de caju, aumento de 100x



**Figura 4.2** – *Rhodotorula glutinis* após cultivo submerso em suco de caju, aumento de 100x após uso de ultrassom e solvente:acetona por 15 minutos



**Figura 4.3** – *Rhodotorula glutinis* após cultivo submerso em suco de caju, aumento de 100 x, após uso de ultrassom e solvente: etanol por 15 minutos.



**Figura 4.4**–*Rhodotorula glutinis* após cultivo submerso em suco de caju, aumento de 100 x após uso de ultrassom e solvente:acetona / etanol por 15 minutos.

Pelas Figuras apresentadas pode-se notar que para um mesmo tempo há menores partículas da levedura *Rhodotorula glutinis* com o solvente acetona do que dos demais solventes, confirmando que há mais células rompidas e mais betacaroteno liberado.

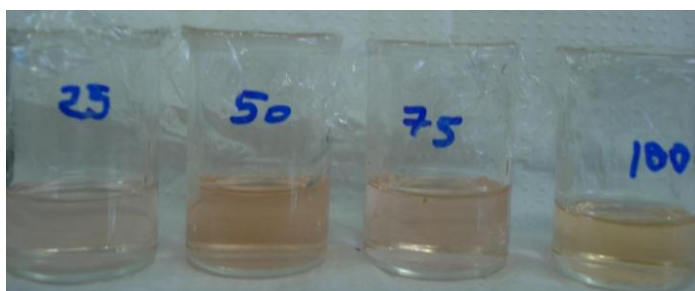
#### 4.1.3 Extração com Dimetilsufóxido (DMSO)

A extração com DMSO foi utilizada por este ser um reagente que possui baixa toxicidade e juntamente com a mistura de éter de petróleo e acetato de etila age na parede celular, rompendo-a e liberando o betacaroteno. Foram avaliados diferentes porcentagens de suco de caju no meio (25%,50%,75% e 100%)(Figura 4.5) afim de estudar a quantidade de betacaroteno que poder ser produzido e extraído.



**Figura 4.5:** Fermentado contendo 25%, 50%, 75%, 100% de suco de caju respectivamente.

Ao longo da extração notou-se que ao adicionar a mistura de éter de petróleo e acetato de etila e seguido da centrifugação das amostras, o sobrenadante adquiriu coloração correspondente ao betacaroteno e a biomassa ia perdendo sua pigmentação, mostrando que essa mistura extraia o betacaroteno e o DMSO apenas rompia as células para que o betacaroteno fosse liberado. A figura 4.6 mostra o sobrenadante para as diferentes porcentagens do meio (25, 50, 75 e 100%, respectivamente) com os reagentes DMSO, éter de petróleo e acetato de etila.



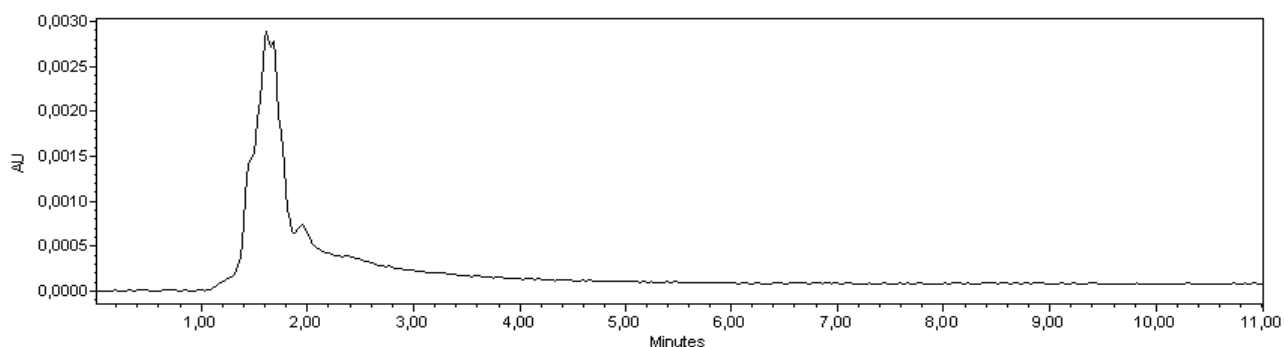
**Figura 4.6:** Carotenóides liberados no sobrenadante contendo DMSO, éter de petróleo e acetato de etila, para diferentes porcentagens de suco no meio.

#### 4.1.4 Análise por HPLC

Anteriormente a análise do betacaroteno produzido por do cultivo submerso de *Rhodotorula glutinis* em suco de caju, foram realizados testes com diferentes composições da fase móvel (acetona, álcool isopropílico e metanol), de acordo com trabalhos reportados na literatura, utilizando os padrões de betacaroteno.

Alguns critérios foram selecionados para a escolha da fase móvel mais adequada, entre eles, solubilidade, estabilidade da amostra no solvente escolhido, e o tempo de retenção. A fase móvel metanol foi a que se mostrou a mais adequada, dentro dos critérios levados em consideração.

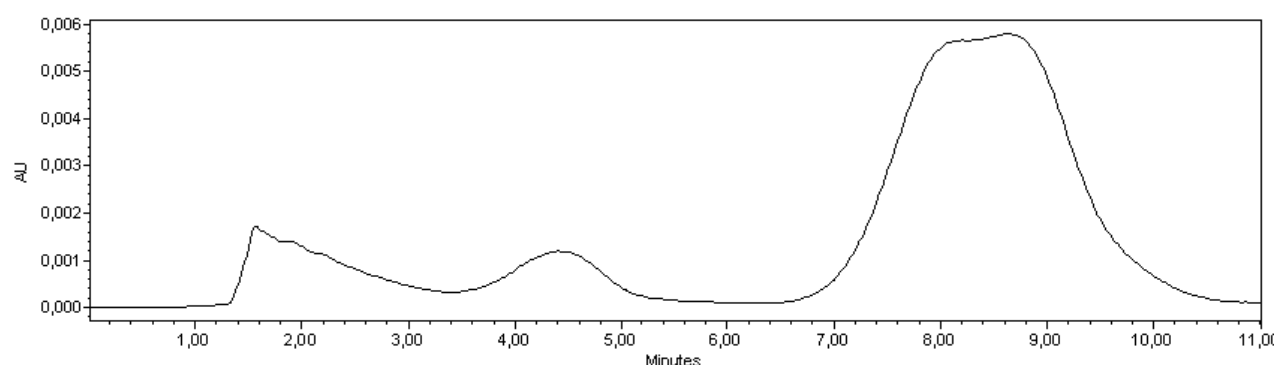
O betacaroteno obtido do cultivo submerso de *Rhodotorula glutinis* em suco de caju foi analisado em HPLC. A Figura 4.7 mostra o cromatograma obtido da análise para a quantificação do betacaroteno obtido pelo cultivo em suco de caju após a etapa de extração com acetona em ultrassom.



**Figura 4.7** – Cromatograma obtido da análise para a quantificação do betacaroteno obtido de cultivo submerso de *R. glutinis* em suco de caju após purificação por ultrassom e solvente acetona

De acordo com o que foi visto nas análises espectrofotométricas pôde-se observar que a levedura *R. glutinis* produziu carotenóides, porém no cromatograma surge apenas um pico em aproximadamente 1,5 minutos que está caracterizando a acetona que foi usada como solvente e não surge nenhum pico no tempo característico do betacaroteno (aproximadamente em 8 minutos) que foi determinado pela curva de calibração do betacaroteno (Figura 4.8).

O HPLC é a técnica mais sensível para a caracterização, portanto, pode-se estar produzindo outros carotenóides e pigmentos que também são identificados por espectrofotômetro, mas não foi identificado na análise em HPLC.



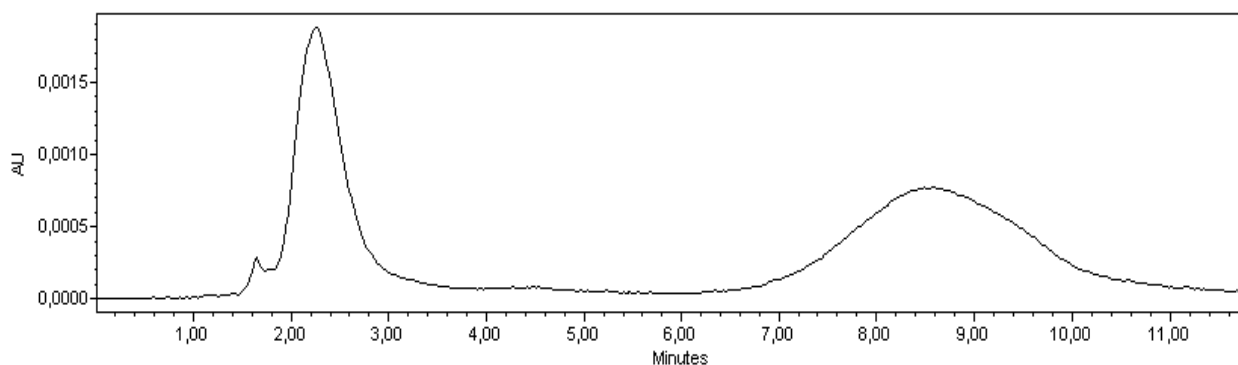
**Figura 4.8:** Análise do padrão do Betacaroteno por HPLC.

Nas análises no HPLC com o betacaroteno extraído pelo uso de DMSO associado com éter de petróleo e acetato de etila (Figura 4.9) surgiram 3 picos: o primeiro em aproximadamente em 1,5 minutos que se trata dos solventes, pois DMSO e acetona possuem estrutura molecular muito semelhante. O segundo pico resulta da mistura dos solventes e o ultimo pico surgiu no tempo característico de identificação do

betacaroteno, isto é em aproximadamente em 7 minutos, para todas as diluições do meio.

Esse último pico apresentou simetria e não apresentou efeito de cauda, indicando uma boa eficiência de separação dos compostos. O tempo de retenção encontrado foi relativamente baixo, diminuindo assim, o tempo de análise das amostras e percebeu-se ainda que há uma completa separação entre os dois compostos, tornando assim esse método de extração viável.

Pode-se observar que a área de betacaroteno extraído com DMSO, éter de petróleo e acetato de etila foi pequena, mas isso deve-se o fato deste estar muito diluído nos solventes, já que foram necessários fazer 3 extrações e em cada uma adiciona-se 7,5 mL de reagentes. Foram feitos os cálculos para saber quanto de betacaroteno foi extraído nessa quantidade de reagente, através da equação 3 (Anexo 2) que fornece a relação da concentração pela área obtida no HPLC, e daí pra saber o quanto haviam nos 10 mL centrifugados do meio, este resultado mostrado na Tabela 4.3



**Figura 4.9:** Cromatograma de betacaroteno obtido de cultivo submerso de *Rhodotorula glutinis* em suco de caju após purificação por uso de DMSO, éter de petróleo e acetato de etila.

A tabela 4.3 mostra a concentração de betacaroteno obtido através desse método de extração nas diferentes diluições do suco de caju. Observa-se que a quantidade de suco é relevante pra produzir o betacaroteno, no meio que é composto de 100% de suco temos que a concentração de betacaroteno extraído é bem maior e coloração é mais intensa nessa quantidade de suco do que nas demais, como foi ilustrado na Figura 4.5 e 4.6.

**Tabela 4.3:** Concentração de betacaroteno produzido em diferentes porcentagens de suco de caju no meio.

% de suco no meio de cultivo	Concentração de betacaroteno (mg/L)
25	187,71
50	317,82
75	359,83
100	607,38

As concentrações de betacaroteno são maiores nesse método de extração do que as produzidas com o uso dos outros solventes com o ultrassom, podendo ser possível identificá-lo e quantificá-lo, comprovando que o betacaroteno foi realmente produzido em uma boa quantidade.

Infelizmente não foi possível testar outras combinações de solventes com o DMSO, pois não houve disponibilidade de equipamentos.

## Capítulo V

### Conclusões

#### 5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados experimentais obtidos neste trabalho foi possível concluir que:

- A técnica de extração apenas com solvente extraiu uma pequena quantidade de carotenóides e pôde ser melhorada com a utilização do ultrassom. Observou-se a pigmentação por espectrometria e por análises em microscópio, mas o betacaroteno não foi identificado em HPLC.
- O método de extração com DMSO aliada com éter de petróleo e acetato de etila, permitiu a liberação do betacaroteno para o solvente vista pela liberação da coloração rosada nos reagente e a perda de cor da biomassa durante o processo .
- Foi possível identificar e quantificar o betacaroteno extraído por HPLC sendo constatado que a extração com DMSO, éter de petróleo e acetato de etila teve melhor desempenho na extração e purificação de betacaroteno que no método de solvente (acetona, etanol, acetona-etanol) acoplado ao ultrassom.
- A quantidade de suco no meio influencia na quantidade produzida do betacaroteno no meio, e observou-se que quanto este se encontra mais concentrado produz uma maior quantidade do produto desejado e possui visualmente uma maior pigmentação.
- As concentrações para a extração por DMSO, éter de petróleo e acetato de etila foram elevadas, e o estudo do uso DMSO com outros reagentes para extração seria necessário para avaliar o melhor método de purificação.

## Capítulo VI

### Referências Bibliográficas

- AKSU, Z.; EREN, A. T. (2007), Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, p. 107-113
- AMBROSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, Z. P. (2006), Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, v. 19, p. 233-243.
- BARNHART, S.; SAMMAR, S. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *J. Med.* v. 334, p. 1150–1155, 1996.
- BAUERNFIEND, J. C. *Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors*. Nova Iorque: Academic Press, p. 835–836, 1981a.
- BAUERNFIEND, J. C. *Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors*. Nova Iorque: Academic Press, p. 1–319, 1981b.
- BHOSALE, P.; GADRE R. V. Beta-Carotene production in sugarcane molasses by a *Rhodotorula glutinis* mutant. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 26, p. 327–32, 2001.
- BOTELLA-PAVÍA, P; RPDRIGUEZ- CONCEPCIÓN, M. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. **Physiologia Plantarum**, v. 126, p. 369-381, 2006.
- BRITTON G (1995) UV/visible spectroscopy. In Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (eds), *Carotenoids: spectroscopy*, vol 1B. Birkhäuser Verlag, Basel, pp 13-63
- CAMPBELL, M.K. *Bioquímica*. Artmed Editôra, 3a Edição, São Paulo, 2000.
- CHEN, F.; LI, H.-B.; WONG, R. N.-S.; JI, B.; JIANG, Y. Isolation and purification of the bioactive carotenoid zeaxanthin from the microalga *Microcystis aeruginosa* by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1064, p. 183-186, 2005.
- CHEW, B. P.; PARK, J. S.; WONG, M. W.; WONG, T. S. *Anticancer Res.*, v. 19, p. 1849-1857, 1999.
- COSTA, I.; MARTELLI H. L.; DA SILVA J. M.; POMEROY D. (1987), Production of  $\beta$ -carotene by a *Rhodotorula strain*. **Biotechnology Letters**, v. 9, p. 373-375.
- DAVOLI, P. *et al.* Carotenoids and fatty acids in red yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.40, n.4, p 392-397, 2004.
- ESTEVEZ, Paulo César Dantas; ESTEVES, Anete Correa; BARLETA, Valéria Calmeto N.. Extração de  $\beta$ -Caroteno por Cromoterapia em Coluna em Cenouras (*daucus carota* L.) **Cadernos UniFOA**, Volta Redonda, ano 1, n. 1, jul. 2006.



FLEISCHMANN, P.; STUDER, K.; WINTERHALTER, P. Partial purification and kinetic characterization of a carotenoid cleavage enzyme from quince fruit (*Cydonia oblonga*). *J. Agrc. Food Chem.*, v. 50, 1677-1680, 2002.

FONTANA, J.D. et al. Bioproduction of carotenoids: The comparative use of raw sugarcane juice and depolymerized bagasse by *Phaffia rhodozyma*. **Bioresource Technology**, v.58, p.121-125, 1996.

FRASER, P. D.; PINTO, M. E. S.; HOLLOWAY, D. E.; BRAMLEY, P. M. (2000), Application of high performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids. **The Plant Journal**, v. 24, p. 551-558.

GORDON, H. T.; BAUERNFEIND, J. C. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition. *Carotenoids as Food Colorants*, v. 18, p. 59–97, 1982.

GROSS, J. **Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids**, New York, Published by Van Nostrand Reinhold, 1991.

HAYMAN, E. P.; YOKOYAMA, H.; CHICHESTER, C. O.; SIMPSON K. L. (1974), Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. **Journal of Bacteriology**, v. 120, p. 1339-1343.

HEINONEN, O. P. *et al.* (129 autores). The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study Group. *J. Med.* v. 330, p. 1029–1035, 1994.

HENNEKENS, C. H.; BURING, J. E.; MANSON, J. E.; STAMPFER, M.; ROSNER, B.; COOK, N. R.; BELANGER, C.; LAMOTTE, F.; GAZIANO, J. M.; *et al.* Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *J. Med.* v. 334, p. 1145– 1149, 1996.

JOHNSON, E. A. SCHROEDER W. A. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.18374 – 18379, 1995.

KAISER, P.; SURMANN, P.; VALLENTIN, G.; FUHRMANN, H. (2007), A small-scale method for quantification of carotenoids in bacteria and yeasts. **Journal of Microbiological Methods**, v. 70, p. 142-149.

LEITE, L. A. A agroindústria do caju no Brasil: Políticas públicas e transformações econômicas. 1. ed. Fortaleza: Embrapa/CNPAT, 1994. 195 p

LIU, Y. S.; *et al.* Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p.331-335, 2006.

MALDONADE, I.R. *et al.* Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region, Brazil. **Brasilian Journal of Microbiology**, v.38, p.65-70, 2007.

NIIZU, P. Y. **Fontes de carotenóides importantes para a Saúde Humana**. Campinas, 2003. Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

OMENN, G. S.; GOODMAN, G. E.; THORNQUIST, M. D.; BALMES, J.; CULLEN, M. R.; GLASS, A.; KEOGH, J. P.; MEYSKENS, F. L.; VALANIS, B.; WILLIAMS, J. H.;

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Stability of carotenoids during the storage of foods In **Shelf life studies of foods and beverages - chemical, biological, physical and nutritional aspects**, Charalambous, F. (ed). Elsevier Science, Amsterdam, 1993b, p. 591-624

SCUTTE, H.; KULA, M-R. Pilot- and process-scale techniques for cell disruption. **Biotechnol. Appl. Biochem.** V. 12, p. 599- 620, 1990.

SILVA, M. C. **Alterações na biossíntese de carotenóides em Içveduras induzidas por agentes químicos.** Campinas, 2004. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

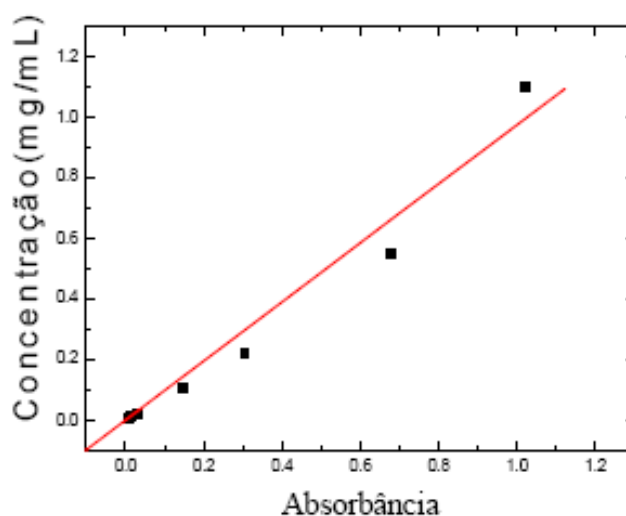
TATSCH, P. O. (2008), Produção de carotenóides em meio sintético por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em biorreator. **Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada – Campus de Erechim.**

TINOI, J. *et al.* Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. **Process Biochemistry**, v.40, p.2551-2557, 2005.

# ANEXOS

## ANEXO 1

### Curva padrão de concentração de biomassa



**Figura 7.1:** Curva padrão de crescimento do microorganismo.

Foram medidas as concentrações e as absorbâncias durante o crescimento do microorganismo e foi construído um gráfico de absorbância por concentração. Obteve-se uma correlação linear, através do programa Microcal Origin versão 7.0, e esta gerou coeficiente angular  $\alpha$  de 1,00519, que será utilizado na equação 1 para determinar a concentração do inóculo.

$$\text{Concentração (g/L)} = \text{Absorbância} \times \alpha \times \text{Diluição} \times a^{-1} \quad (1)$$

Com essa concentração calcula-se o volume de inóculo necessário para que o meio com 100 mL suco de caju fique com concentração de 0,01 g/L, através da equação abaixo.

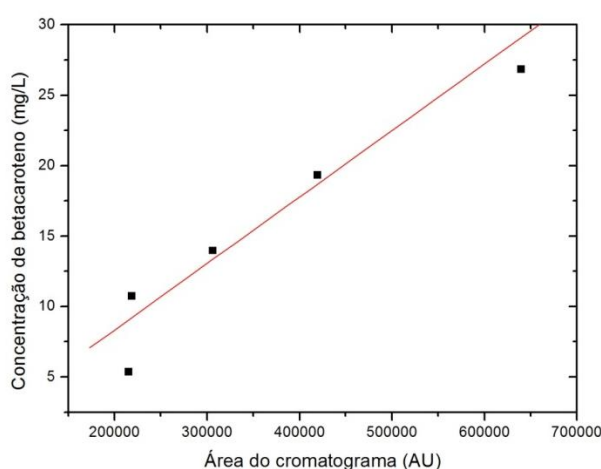
$$C_1 * V_1 = V_2 * C_2 \quad (2)$$

## ANEXO 2

## Curva de calibração do Betacaroteno

A curva de calibração do betacaroteno foi obtida através das soluções padrões de betacaroteno preparadas nas seguintes concentrações: 10,7; 14; 19,3; 21,5 e 26,9 mg/L, todas com absorvância inferior a 0,9 no comprimento de onda de 450 nm, as soluções-padrão foram preparadas por diluição em água deionizada de uma “solução mãe” de concentração 5,37 g/L.

As análises foram realizadas por UV com comprimento de onda de 450nm em HPLC. As condições cromatográficas utilizadas nas análises das soluções padrões foram: fase móvel de metanol a uma vazão de 1,0 mL/min, durante 12 min, com coluna C18 Waters: Nova-Pak, 60Å, 5 µm de diâmetro, 3,9 x 150 mm., a 30 °C, com volume de injeção das amostras de 20 µL e uma pré- coluna C18 Nova Pak 4 µm.



**Figura 7.2:** Correlação linear para o Betacaroteno

Obteve-se uma correlação linear, através do programa Microcal Origin versão 7.0, verificou-se através do  $R^2$  que os pontos estão bem ajustados, conforme observa-se na Figura 7.1, cuja equação é expressa na Equação 3.

$$\text{Concentração} \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = 1,10898 + 4,72119 * E - 5 \quad (3)$$