



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

JULIANNE RIBEIRO DOS SANTOS

**UTILIZAÇÃO DE GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO PARA OBTENÇÃO DE
CAROTENÓIDES DE *Rhodotorula glutinis***

FORTALEZA - CE

2010

JULIANNE RIBEIRO DOS SANTOS

**UTILIZAÇÃO DE GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO PARA OBTENÇÃO DE
CAROTENÓIDES DE *Rhodotorula glutinis***

Trabalho de conclusão de curso submetido a 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.

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira

FORTALEZA - CE

2010

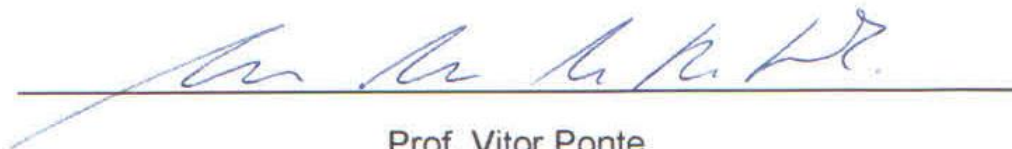
JULIANNE RIBEIRO DOS SANTOS

UTILIZAÇÃO DE GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO PARA OBTENÇÃO DE
CAROTENÓIDES DE *Rhodotorula glutinis*

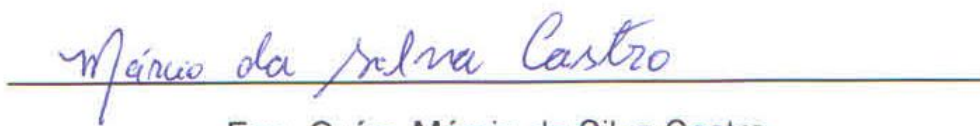
Trabalho de conclusão de curso submetido a
Coordenação do Curso de Graduação em
Engenharia Química, da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial para a obtenção do
grau de Bacharel em Engenharia Química.

Aprovada em 10/12/2010

BANCA EXAMINADORA



Prof. Vitor Ponte
Universidade Federal do Ceará - UFC



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



Eng. de Alimentos Patrícia da Silva Almeida
Universidade Federal do Ceará - UFC

FORTALEZA - CE

2010

Aos meus pais Asnaldo e Mauricia e a minha irmã Jamille pelo amor, dedicação, esforço, apoio e estímulo, dando-me força para vencer mais esta etapa da minha vida.

Ao meu noivo Márcio pelo amor, carinho, paciência, compreensão e dedicação, encorajando-me em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pelo dom da vida e oportunidades no decorrer dela, por ser meu principal auxílio em todos os momentos.

Aos meus pais Asnaldo e Mauricia por esquecerem de si, buscando incansavelmente dar-me o melhor sempre.

A minha irmã JAMILLE pelo amor, preocupação e entusiasmo dedicado.

Aos meus familiares, em especial as minhas tias MARILENE e MAURICEIA, ao meu tio MAURICIO e ao meu 'primão' NATHAN LUCAS, por tudo o que me ensinam e por torcerem por mim incondicionalmente.

A minha amada e saudosa avó FRANCISCA (in memorian) que com certeza intercede por mim em todos os momentos da minha vida.

Ao meu noivo MÁRCIO pela ajuda, amor e companhia em todas as horas.

À minha orientadora ANDREA LOPES DE OLIVEIRA FERREIRA, pela orientação, por todo conhecimento passado, apoio, tranquilidade, confiança e acima de tudo amizade durante todos os momentos destes anos.

Ao GRUPO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS pela infra-estrutura disponibilizada para realização de todas as pesquisas.

A todos os funcionários e professores da UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, pelos conhecimentos transmitidos que de alguma forma contribuíram para minha formação.

Aos meus eternos amigos CRISTIANO RÉGIS, DANIEL DAVID, FELIPE SÁ, FILIPI XAVIER, JEANN e JOÃO FELIPE, pela amizade, carinho, paciência e esclarecimentos de dúvidas.

As minhas eternas amigas e companheiras de todas as horas CAROLINY, NAIALA, REGIANE e TAMIRES pela preocupação, amizade, colaboração, apoio, carinho e por todos os inesquecíveis momentos vividos juntas.

Aos amigos e colegas conquistados no decorrer da vida pelo companheirismo e pelos momentos de descontração.

“A melhor maneira que o homem dispõe para se aperfeiçoar, é aproximar-se de Deus.”

(Pitágoras)

UTILIZAÇÃO DE GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO PARA OBTENÇÃO DE CAROTENÓIDES DE *Rhodotorula glutinis*

Julianne Ribeiro dos Santos

Novembro/2010

Orientadora: Andrea Lopes de Oliveira Ferreira

Carotenóides são pigmentos naturais de grande importância, responsáveis pela coloração amarela, laranja, vermelha e roxa que são encontrados em fungos, bactérias, animais, em tecidos verdes de plantas e em órgãos não fotossintéticos como frutas, flores, sementes e raízes. São produtos de alto valor agregado com uma enorme expansão. Sua função biológica mais fundamentada é a atividade provitamínica A. Este trabalho descreve processo de produção através do cultivo submerso em glicerol. Foi testado o glicerol P.A. e o glicerol Bruto como fonte de carbono para o cultivo da levedura *Rhodotorula glutinis* que foi utilizada na fermentação. Após o cultivo, a biomassa foi separada do sobrenadante por centrifugação e em seguida, foram realizadas as análises de pH, concentração de biomassa, consumo de glicerol e colorimetria. Testaram-se diferentes concentrações (10 g.L^{-1} , 20 g.L^{-1} e 30 g.L^{-1}) de ambos os gliceróis (glicerol P.A e glicerol bruto) que foram adicionados ao meio, para que houvesse uma comparação entre os resultados e assim determinar qual destes seria o mais adequado para esta finalidade. Os resultados mostraram uma maior obtenção da concentração de biomassa e pigmentação quando o glicerol bruto foi utilizado, significando que este pode se destacar na utilização para a bioprodução.

Palavras chaves: Carotenóides, Fonte de carbono, Glicerol, Colorimetria.

**USING GLYCEROL AS CARBON SOURCE FOR OBTENTION OF CAROTENOIDS
FROM *Rhodotorula glutinis***

Julianne Ribeiro dos Santos

Novembro/2010

Orientadora: Andrea Lopes de Oliveira Ferreira

Carotenoids are important natural pigments, responsible for yellow, orange, red, and purple colors from fungi, bacteria, animals, green tissues of plants, non-photosynthetic organs like fruits, flowers, seeds, and plant roots. They have also a huge incorporated value and aplicability. Its major biological function is the pro-vitaminic activity. This work describes the production process of some specific carotenoids through cultivation under glycerol. Pure analytical glycerol and raw glycerol were employed as carbon sources for the *Rhodotorula glutinis* yeast used in the fermentation process. Once the fermentation is finished, the biomass is separated by centrifugation and some analyses are carried out, such as: PH determination, biomass concentration, glycerol consumption, and colorimetry. Different concentrations were tested (10, 20, 30) for both glycerol (glycerol PA and raw glycerol) that were added to the mean, for a comparison between the results, and so, determine weach of these would be more adequate for this purpose. The results showed a higher concentration of biomass and pigmentation when raw glycerol was used, therefore raw glycerol can be used for bioproduction.

Key-Words: Carotenoids, carbon source, Glycerol, Colorimetry

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Estrutura química de alguns carotenóides: (a) Xantofilas – zeaxantina, luteína, criptoxantina e astaxantina; (b) Carotenos – neurosporeno, licopeno, β -caroteno e α -caroteno, respectivamente (SILVA, 2004).....	16
Figura 2 Fluxograma resumido dos estágios da biossíntese de carotenóides (SILVA, 2004)	17
Figura 3 Estrutura química e clivagem do β -caroteno (AMBROSIO et al., 2006).....	18
Figura 4 Reação de síntese do propeno (MOTA et al., 2009).....	21
Figura 5 Estrutura do glicerol.....	21
Figura 6 Setores industriais de utilização da glicerina. (Mota et al., 2009).....	22
Figura 7 <i>Rhodotorula glutinis</i> cultivada através da técnica de subcultura.....	23
Figura 8 Inóculo após 48 horas de crescimento em agitador orbital a 150 rpm e 30 °C...25	
Figura 9 Representação de cor no espaço $L^*a^*b^*$ (MANUAL DO COLORÍMETRO MINOLTA CR-300).....	29
Figura 10 Erlenmeyers, após inoculados, são colocados em agitador orbital 96 horas em agitador orbital a 150 rpm e 30 °C.....	30
Figura 11 Concentração de biomassa utilizando meio preparado com glicerol PA e glicerol bruto com concentrações de 10. g.L ⁻¹ , 20 g.L ⁻¹ e 30 g.L ⁻¹	32
Figura 12 Comparação entre a concentração de biomassa utilizando meio preparado com glicerol bruto e glicerol P.A. com a concentração de 10 g.L ⁻¹	32
Figura 13 Comparação entre a concentração de biomassa utilizando meio preparado com glicerol bruto e glicerol P.A. com a concentração de 20 g.L ⁻¹	33
Figura 14 Comparação entre a concentração de biomassa utilizando meio preparado com glicerol bruto e glicerol PA com a concentração de 30 g.L ⁻¹	33
Figura 15 Comparação entre o consumo de glicerol utilizando glicerol bruto e glicerol P.A. com a concentração de 10 g.L ⁻¹	34

Figura 16 Comparação entre o consumo de glicerol utilizando meio preparado com glicerol bruto e glicerol P.A. com a concentração de 20 g.L ⁻¹	34
Figura 17 Comparação entre o consumo de glicerol utilizando meio preparado com glicerol bruto e glicerol P.A. com a concentração de 30 g.L ⁻¹	35
Figura 18 Perfil de pH em diferentes concentrações de glicerol P.A. e glicerol Bruto.....	36
Figura 19 Comparação entre o Parâmetro a* (pigmentação vermelha) obtido através da análise de colorimetria da biomassa obtida utilizando meio preparado com glicerol PA e glicerol bruto com concentrações de 10. g.L ⁻¹ , 20 g.L ⁻¹ e 30 g.L ⁻¹	37
Figura 20 Comparação entre o Parâmetro b* (pigmentação amarela) obtido através da análise de colorimetria da biomassa obtida utilizando meio preparado com glicerol PA e glicerol bruto com concentrações de 10. g.L ⁻¹ , 20 g.L ⁻¹ e 30 g.L ⁻¹	37
Figura 21 Aspecto visual da coloração do meio fermentado após 96 horas de cultivo utilizando o glicerol P.A. e o glicerol Bruto indicando presença de carotenóides.....	37
Figura 22 Curva de calibração de Fósforo.....	44
Figura 23 Curva de calibração de Enxofre.....	44
Figura 24 Curva padrão de Concentração de Biomassa.....	45
Figura 25 Curva padrão de Glicerol.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Microrganismos e carotenóides produzidos biotecnologicamente (TATSCH, 2008).....	19
Tabela 2 Condições experimentais para cada elemento analisado por espectrometria de absorção atômica.....	27
Tabela 3 Resultado da caracterização do glicerol bruto.....	31
Tabela 4 Resultados da análise de concentração de biomassa nas concentrações testadas.....	47
Tabela 5 Resultados da análise do consumo de glicerol.....	47
Tabela 6 Resultados da análise do acompanhamento de pH.....	47
Tabela 7 Resultados da análise de colorimetria.....	47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICAS.....	15
2.1 Carotenóides.....	15
2.1.1 Importância e funções de carotenóides.....	15
2.1.2 Estrutura química e propriedades.....	16
2.1.3 Microrganismos produtores de carotenóides.....	18
2.1.4 Aspectos industriais de produção.....	19
2.2 Glicerol.....	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 Microrganismos e manutenção.....	22
3.2 Preparação dos meios de cultura.....	23
3.2.1 Caldo para o inóculo.....	23
3.2.2 Meio de Cultivo.....	23
3.3 Preparação do inóculo.....	24
3.4 Avaliações da concentração inicial da fonte de carbono.....	25
3.5 Caracterização do glicerol bruto.....	25
3.5.1 Determinação de K e Na.....	26
3.5.2 Determinação de P e S.....	26
3.5.3 Determinação de Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn.....	26
3.6 Testes de comparação entre glicerol P.A. e glicerol bruto.....	27
3.7 Determinações analíticas.....	28
3.7.1 Pigmentação.....	28
3.7.2 Quantificação de biomassa.....	28
3.7.3 Quantificação do glicerol.....	29
3.7.4 Acompanhamento do pH.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1 Caracterização do Glicerol Bruto.....	30
4.2 Concentrações de biomassa utilizando o Glicerol PA e o Glicerol Bruto.....	31
4.3 Consumo de glicerol.....	33
4.4 Análise de pH.....	35

4.5 Análise Colorimétrica.....	35
5 CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
ANEXOS.....	43

1 INTRODUÇÃO

Carotenóides são corantes naturais de grande importância, responsáveis pela coloração amarela, laranja, vermelha e roxa que são encontrados em vegetais e microrganismos. Estes compostos são utilizados nas indústrias farmacêutica, alimentícia, de cosméticos e ração. Além da ampla utilização como corantes e no enriquecimento de alimentos, também são utilizados devido a sua atividade pró-vitâmica A e as propriedades que resultam em possíveis funções biológicas benéficas à saúde, tais como o fortalecimento do sistema imunológico e a diminuição do risco de doenças degenerativas (NIIZU, 2003).

A produção comercial de carotenóides a partir de processos utilizando microrganismos tem sido investigada destacando-se a produção pelas leveduras do gênero *Rhodotorula* (MALISORN & SUNTORNUSUK, 2007; LIU *et al.*, 2006), *Phaffia rhodozyma* (LIU *et al.*, 2006; VERDOES *et al.*, 2003), *Sporobolomyces* (MALDONADE *et al.*, 2008; BUZZINI *et al.*, 2007), *Blakeslea trispora* (MANTZOURIDOU *et al.*, 2002; LOPÉZ-NIETO *et al.*, 2004) e *Haematococcus pluvialis* (DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA *et al.*, 2004; LÓPEZ *et al.*, 2006). Este tipo de produção concorre principalmente com a produção sintética por processos químicos. Os carotenóides atualmente utilizados na indústria são obtidos por via química ou extração de algas e plantas. Porém, devido à preocupação com a utilização de aditivos químicos em alimentos, há um crescente interesse nos carotenóides obtidos naturalmente por processos biotecnológicos (VALDUGA *et al.*, 2009).

A produção de carotenóides através de microrganismo apresenta inúmeras vantagens. Dentre estas, as principais são que os microrganismos oferecem uma via de produção mais econômica, podendo ser obtidos em curto prazo e em qualquer época do ano, fornecendo uma alternativa à síntese química (BUZZINI & MARTINI 1999; FRENGOVA *et al.*, 1994). Em bactérias e leveduras os carotenóides são considerados metabólitos secundários, desempenhando certo papel na sobrevivência destes microrganismos, ajudando a encontrar novas estratégias para o estudo de organismos multiresistentes (PELZ *et al.*, 2005; CLAUDITZ *et al.*, 2006). Além disso, os carotenóides fornecem uma ampla gama de efeitos benéficos, reduzindo riscos de certos cânceres e doenças cardiovasculares (STRINGHAM & HAMMOND, 2005).

A ampla utilização de leveduras do gênero *Rhodotorula* na fermentação é devido a sua natureza unicelular, e as altas taxas de crescimento, sendo capaz de

produzir β -caroteno e torularodeno como produtos finais do seu metabolismo com uma taxa de produção dependente das condições de incubação. Além disso, não são patogênicas e possuem resistência em relação à desintegração (KAISER *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 1987).

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

Um aspecto importante no processo de fermentação é o desenvolvimento de um meio de cultura satisfatório para que a obtenção do produto desejado seja máxima utilizando um substrato barato, como por exemplo, resíduos agroindustriais. Neste contexto, o consumo de glicerol como fonte de carbono na produção de carotenóides em bioprocessos, pode se tornar uma solução para produção, pois este é um produto abundante derivado da produção de biodiesel (IMANDI *et al.*, 2006).

Os principais resíduos gerados na produção de biodiesel são tortas e farelos, oriundos da extração do óleo vegetal, e o glicerol, mais conhecido popularmente como glicerina, resultante da reação de transesterificação. Este subproduto é composto de 10 e 6% (m/m) do diéster e produções de etanol, respectivamente, assim podendo surgir um depósito importante de glicerol (BARBIRATO *et al.*, 1998). As principais aplicações de glicerol atualmente são: síntese de resinas, farmacêuticas, cosméticas e na indústria alimentícia, porém, busca-se novas aplicações devido ao grande volume disponíveis deste produto.

Este trabalho teve o objetivo de comparar o meio de cultura utilizando glicerol bruto e o glicerol P.A como fonte de carbono em diferentes concentrações para a máxima obtenção de biomassa e pigmentação de *Rhodotorula glutinis*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este item apresenta informações sobre a bioprodução de carotenóides, abordando definições, importância, aplicações, aspectos industriais de produção, microrganismos produtores e fatores que influenciam a biorreação. Apresenta também informações sobre leveduras do gênero *Rhodotorula* e informações sobre o glicerol, como sua estrutura, suas aplicações e sua crescente disponibilidade no mercado como fonte de carbono em bioprocessos.

2.1 Carotenóides

2.1.1 Importância e funções de carotenóides

Os carotenóides compõem um grupo de pigmentos naturais responsáveis pela coloração amarela, 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 uma grande diversidade de estruturas e funções. Estes compostos são muito utilizados como corantes naturais em indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética e de rações (MELENDEZ-MARTINEZ *et al.*, 2003).

Além de colorir, os carotenóides possuem atividades biológicas importantes, o que fez com que o interesse por tais compostos aumentassem consideravelmente nos últimos anos. Dentre estas funções podemos destacar a sua atividade pró-vitâmica A e a inibição de doenças onde radicais livres apresentam papel fundamental como propriedades biológicas, tais como arteriosclerose, catarata, degeneração muscular e catarata, esclerose múltipla, câncer, doenças degenerativas e doenças cardiovasculares (MALDONADE *et al.*, 2007; BHOSALE 2004; AKSU & EREN 2007).

Nas indústrias 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. Porém, recentemente aumentou-se o interesse pela saúde, e a

adição destes compostos aos alimentos também deve-se as suas atividades biológicas (TATSCH, 2008).

Industrialmente, os carotenóides como o β -caroteno e astaxantina são utilizados como corantes naturais para alimentos ou adicionados em ração para aquicultura (AKSU & EREN, 2007).

2.1.2 Estrutura química e propriedades

Os carotenóides são definidos como isoprenóides lipofílicos e são sintetizados por todos os microrganismos fotossintéticos, incluindo plantas, algas e cianobactérias, e também por algumas bactérias não-fotossintéticas e fungos. Os carotenóides são encontrados na natureza divididos em duas classes: os carotenos, tais como β -caroteno, que são caracterizados por serem hidrocarbonetos lineares que podem ter radicais cíclicos em uma ou ambas as extremidades da molécula; e os derivados oxigenados de carotenos denominados xantofilas, como luteína, violaxantina, neoxantina e zeaxantina (BOTELLA-PAVÍA & RODRIGUES-CONCEPCIÓN, 2006). A Figura 1 apresenta algumas estruturas de carotenóides.

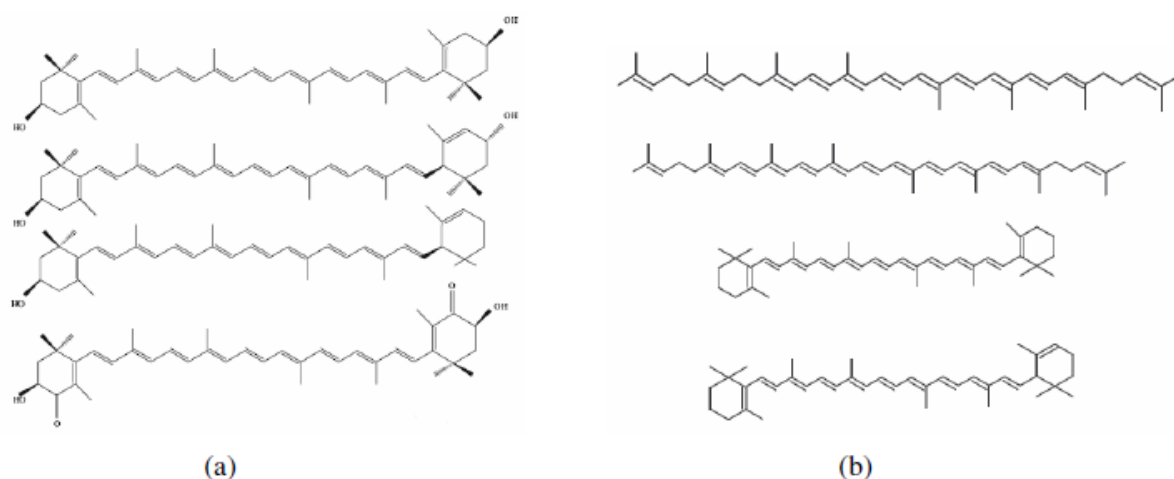


Figura 1: Estrutura química de alguns carotenóides: (a) Xantofilas – zeaxantina, luteína, criptoxantina e astaxantina; (b) Carotenos – neurosporeno, licopeno, β -caroteno e α -caroteno, respectivamente (SILVA, 2004).

A maioria dos carotenóides são tetraterpenóides de quarenta carbonos, formado por oito unidades isoprenóides de cinco carbonos, ligados de tal forma que a molécula é linear e simétrica, com a ordem invertida no centro. A estrutura básica acíclica

C₄₀ pode ser modificada por hidrogenação, desidrogenação, ciclização ou oxidação, conforme demonstrado na Figura 2. A característica de absorção de luz destes pigmentos dá-se devido à cadeia de duplas ligações conjugadas que atua como cromóforo. São necessárias, aproximadamente, 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. O sistema de duplas ligações conjugadas também confere a estes pigmentos alta reatividade química, podendo ser facilmente isomerizados e oxidados (PFANDER, 1987; OLIVIER & PALOU, 2000).



Figura 2: Fluxograma resumido dos estágios da biossíntese de carotenóides (SILVA, 2004).

Devido à alta taxa de insaturação, fatores como o calor, luz e ácidos ocasionam isomerização dos carotenóides *trans*, que é a forma mais estável na natureza, para a forma *cis*, o que ocasiona uma ligeira perda de cor e atividade pró-vitamínica. Os carotenóides também são susceptíveis às oxidações enzimáticas ou não enzimáticas, que dependem da estrutura do carotenóide, da disponibilidade de oxigênio, da presença de enzimas, de metais, alta temperatura e exposição à luz (TATSCH, 2008).

O β-caroteno é o caroteno mais abundante nos alimentos e o mais interessante economicamente, pois apresenta maior atividade próvitamínica (AMBROSIO *et al.*, 2006). É o único carotenóide que apresenta dois radicais β-ionona, que ao romper-se forma duas moléculas de pró-vitamina A como pode ser observado na Figura 3.

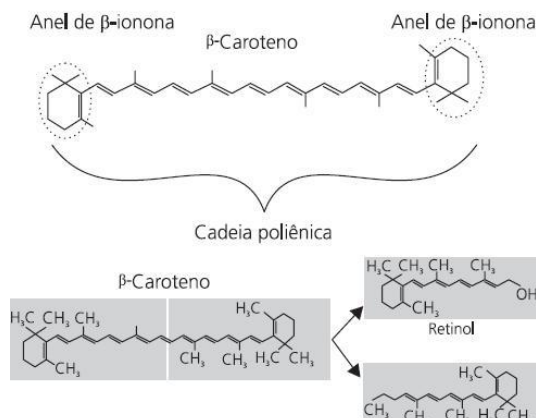


Figura 3: Estrutura química e clivagem do β-caroteno (AMBROSIO *et al.*, 2006).

2.1.3 Microrganismos produtores de carotenóides

Os carotenóides podem ser biossintetizados por microrganismos fotossintetizantes, como algas e cianobactérias azuis ou verdes, e por microrganismos não fotossintetizantes como bactérias, fungos e leveduras (JOHNSON & SCHROEDER, 1995). 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).

Os carotenóides podem ser obtidos a partir de microrganismos como bactérias do gênero *Flavobacterium* e *Micrococcus*, algas *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis*, fungo *Blakeslea trispora* (NELIS & ENHEER, 1991; LAMPILA *et al.*, 1985), e leveduras do gênero *Phaffia*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces* (SIMPSON *et al.*, 1964; HAYMAN *et al.*, 1974). Os carotenóides mais investigados são a astaxantina, β-caroteno, cantaxantina, toruleno e licopeno.

Inúmeros microrganismos produzem carotenóides, porém nem todos são interessantes para a produção industrial. A utilização de leveduras é destaque pelo seu uso como fonte protéica e pela sua capacidade de crescimento em substratos de baixo custo e alto teor de açúcar. Leveduras tais como *Xanthophyllomyces dendrorhous* (FONTANA *et al.*, 1996), *Rhodotorula glutinis* (AKSU & EREN, 2007; TINOI *et al.*, 2005), *Rhodotorula mucilaginosa* (AKSU & EREN, 2007), *Sporobolomyces* (DAVOLI *et al.*, 2004) e *Phaffia* (LIU *et al.*, 2007), estão sendo estudadas com a finalidade de maximizar e/ou otimizar a bioprodução de carotenóides, visando sua utilização industrial. O estudo da produção de carotenóides por processos biotecnológicos teve um aumento, tendo

destaque a produção comercial de β -caroteno pelo fungo *Blakeslea trispora* (FEOVILA, 1994) e pelas microalgas marinhas *Dunaliella* (BOROWITZKA *et al.*, 1989).

A Tabela 1 mostra os microrganismos com potencial para serem empregados na produção industrial de carotenóides.

Tabela 1: Microrganismos e carotenóides produzidos biotecnologicamente (TATSCH, 2008).

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

2.1.4 Aspectos industriais de produção

O mercado de corantes naturais tem se mostrado muito promissor, devido à tendência em se evitar alimentos que contenham aditivos artificiais, pois além da coloração este enriquecer o produto alimentício. Os carotenóides também são fontes de pigmentação encontrados em peixes e crustáceos, sendo este, atualmente, o setor agropecuário com maior crescimento (JOHNSON & SCHROEDER, 1995).

Como corantes e suplementos nutricionais nas indústrias de alimentos, os carotenóides apresentam um mercado global estimado em US\$ 935 milhões/ano (FRASER & BRAMLEY, 2004).

A produção biotecnológica de carotenóides vem se destacando devido a fatores tais como possibilidade de utilização de substratos de baixo custo para a bioprodução; por serem substâncias naturais, portanto possuindo uma melhor aceitação do consumidor; por utilizar um espaço pequeno 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).

2.2 Glicerol

Em 1779, o glicerol (1,2,3 propanotriol) popularmente conhecido como glicerina, foi descoberto por Scheele durante o processo de saponificação do azeite de oliva. Em 1858, Pasteur também observou a sua formação como um subproduto da fermentação alcoólica, em concentrações de 2,5 - 3,6% do conteúdo de etanol (REHM, 1998), assim, o glicerol pode ser o segundo maior produto formado durante a fermentação alcoólica (TOSETTO & ANDRIETTA, 2003).

O glicerol ocorre naturalmente em formas combinadas, como em triglicerídeos, em todos os óleos oriundos de animais e vegetais, sendo isolado quando estes óleos são saponificados com hidróxido de sódio ou potássio, no processo de manufatura de sabões.

Desde 1949, o glicerol tem sido produzido comercialmente pela síntese do propileno como ilustrada na Figura 4. Esta rota atualmente representa 25% da capacidade de produção dos EUA e 12,5% da capacidade de produção mundial, porém muitas unidades estão sendo desativadas em virtude da grande oferta de glicerol obtido da

produção de biodiesel. Estima-se que a produção mundial de glicerol alcançará 1,2 milhões de toneladas por volta de 2012, devido ao aumento da produção de biodiesel (MOTA *et al.*, 2009).

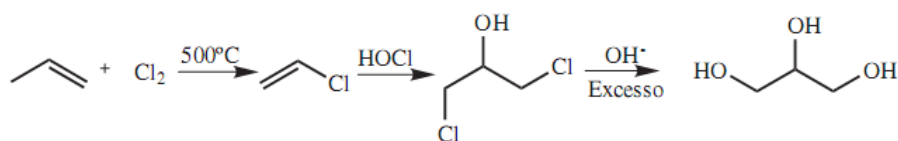


Figura 4: Reação de síntese do propileno (MOTA *et al.*, 2009).

A produção microbiológica do glicerol é conhecida há 150 anos, no entanto, a sua produção comercial ocorre através da síntese de propileno desde 1949, devido ao baixo rendimento do processo microbiológico em relação ao processo químico e à dificuldade de sua extração e purificação dos caldos fermentados.

O glicerol é um poliálcool de fórmula estrutural apresentada na Figura 5.

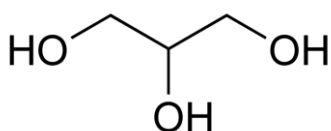


Figura 5: Estrutura do glicerol.

O termo glicerol aplica-se somente ao composto puro, 1,2,3-propanotriol, enquanto o termo glicerina aplica-se à purificação de compostos comerciais que contém normalmente quantidades maiores ou iguais a 95% de glicerol (MORRISON, 1994).

Há vários níveis e designações de glicerina que estão disponíveis comercialmente. Eles diferem em seu conteúdo de glicerol e em outras características, tais como cor, odor e impurezas (KNOTHE *et al.*, 2006).

O glicerol tornou-se uma fonte de carbono barata e abundante, devido à inevitável geração como subproduto da produção de biodiesel. Em todo o mundo o excedente de glicerol pode levar ao encerramento das instalações dedicadas à sua produção ou refino, além disso, a viabilidade econômica da indústria de biodiesel tem sido muito afetada (YAZDANI & GONZALEZ, 2007). Na Figura 6 apresenta os principais setores de utilização da glicerina.

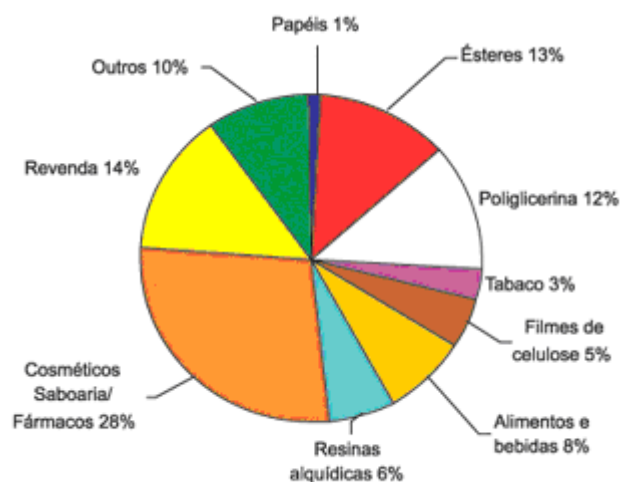


Figura 6: Setores industriais de utilização da glicerina. (Mota *et al.*, 2009).

Atualmente, o glicerol é um dos ingredientes mais utilizados na indústria farmacêutica na composição de cápsulas, supositórios, anestésicos, xaropes e emolientes para cremes e pomadas, antibióticos e anti-sépticos. Por ser não-tóxico, não-irritante, sem cheiro e sabor, o glicerol tem sido aplicado como emoliente e umectante em pastas de dente, cremes de pele, loções pós-barba, desodorantes, batons e maquiagens. O glicerol pode ser usado como umectante e para conservar bebidas e alimentos tais como refrigerantes, balas, bolos, pastas de queijo e carne, ração animal seca. Outro mercado muito importante, e exclusivo, que provavelmente vai se desenvolver com a maior oferta de glicerol é a aplicação deste para a síntese de moléculas de alto valor agregado. (www.biodieselbr.com)

É importante ressaltar ainda que o glicerol também é assimilado por algumas leveduras e bactérias, e devido a isso ele foi escolhido como fonte de carbono na fermentação para a produção de carotenóides, visando uma possível utilização para o a grande quantidade disponível hoje no mercado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismos e manutenção

O microrganismo utilizado na fermentação foi a levedura *Rhodotorula glutinis*, doada da coleção de trabalho do Laboratório de Bioprocessos da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza/CE.

Foi realizada a manutenção da linhagem utilizando a técnica de subcultura em Agar Sabouraud, este meio apresenta 10,0 g.L⁻¹ de peptona, 15,0 g.L⁻¹ de agar e 40,0 g.L⁻¹ de dextrose. A preparação do meio foi obtida dissolvendo os componentes em água destilada, porém, para que todos os componentes fossem dissolvidos completamente, este foi aquecido até 90°C. Após o preparo, foram adicionados em tubos de ensaio rosqueados 10 mL do meio, estes foram então esterilizados em autoclave vertical (PHOENIX) a 110°C por 10 minutos. Após a esterilização, os tubos foram mantidos inclinados até a completa solidificação e armazenados a temperatura ambiente. Após a inoculação no Agar o crescimento ocorreu em estufa para cultura bacteriológica (ODONTOBRÁS ECB 1.3 DIGITAL) a 30°C durante 3 a 5 dias. No final destes procedimentos os tubos foram estocados sob refrigeração a 8°C por até 9 semanas.



Figura 7: *Rhodotorula glutinis* cultivada através da técnica de subcultura.

3.2 Preparação dos meios de cultura

3.2.1 Caldo para o inóculo

O meio preparado para o inóculo possui $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ de peptona e $20,0 \text{ g.L}^{-1}$ de dextrose na sua composição. Este foi preparado com a diluição dos componentes em água destilada. Após preparados, foram adicionados 100 mL de meio em Erlenmeyers de 250 mL.

3.2.2 Meio de Cultivo

O meio de cultivo utilizado possui em sua composição $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de extrato de levedura, $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de K_2HPO_4 e $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de MgSO_4 e foram testadas diferentes concentrações de glicerol (10, 20 e 30 g.L^{-1}). Para a preparação deste, os reagentes foram diluídos em água destilada e por fim, foram adicionados 100 mL de meio em erlenmeyers de 250 mL.

3.3 Preparação do inóculo

O preparo do inóculo é de extrema importância para a fermentação, pois é nesta fase onde se inicia o processo de adaptação do microrganismo ao meio. Ao iniciar a fermentação sem o preparo prévio do inóculo, teremos um atraso no crescimento do microrganismo devido a fase lag (fase de adaptação), pois nesta, não há reprodução das células.

Foi transferida assepticamente, com o auxílio de uma alça de inoculação, uma amostra da levedura estocada para o erlenmeyer contendo o meio anteriormente preparado e esterilizado. O inóculo foi então levado para o agitador orbital (TECNAL TE-420) por 48 horas a 30°C e 150 rpm. Após esse tempo, uma amostra de 10 mL foi retirada do inóculo e esta foi centrifugada (CENTRIFUGA HETTICH-ROTINA 38R) a 6000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e a biomassa foi transferida para um

balão volumétrico de 250 mL e aferido o volume com água destilada. Após homogeneizar a amostra, esta então foi inserida em uma cubeta para ser lida a absorbância em espectrofotômetro (SPECTRONIC 20 GENESYS) a 600 nm, e com o auxílio da curva padrão de concentração do microrganismo, foi possível determinar a concentração de biomassa no meio de ativação. Obtida essa concentração determinou-se o volume necessário de inóculo correspondente a concentração inicial de $0,01 \text{ g.L}^{-1}$ para as fermentações.



Figura 8: Inóculo após 48 horas de crescimento em agitador orbital a 150 rpm e 30 °C.

3.4 Avaliações da concentração inicial da fonte de carbono

As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 250 mL, contendo apenas 100 mL de meio, variando a quantidade inicial de carbono no meio, variando, portanto a concentração inicial de glicerol (10 , 20 , e 30 g.L^{-1}). Os outros constituintes permaneceram na mesma concentração: $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de extrato de levedura, $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de K_2HPO_4 e $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de MgSO_4 . Os meios foram esterilizados a 110°C por 10 minutos, inoculados com $0,01 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa de *Rhodotorula glutinis* e incubados em agitador orbital (30°C e 150 rpm) para uma fermentação de 96 horas onde amostras de 1 mL foram retiradas aproximadamente a cada 8 horas para as análises.

3.5 Caracterização do glicerol bruto

A caracterização foi realizada gentilmente pelo departamento de Solos e Água da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

Para a realização deste procedimento foi necessário a digestão da amostra seguindo os passos descritos a seguir: adicionou-se 1,0 g de glicerol bruto purificado (glicerina loira) oriundo da produção de biodiesel de soja cedido pela Fundação Núcleo de Tecnologia Industrial do Ceará (NUTEC) com 89,3% de pureza, em tubos de digestão, seguidos de 8 mL da solução ácida (3:1), 600 mL de HNO_3 65%, P.A. e 200 mL de HClO_4 72%, deixando os tubos a temperatura ambiente por 3 a 4 horas. Após este tempo, transferiram-se os tubos para o bloco digestor, elevando lentamente a temperatura até 120°C , permanecendo nesta temperatura até que houvesse todo o desprendimento de vapores castanhos. Após o desprendimento total do vapor castanho, elevou-se a temperatura para 200°C , a mesma sendo mantida de 3 a 4 horas, para que fosse eliminado todo vapor branco presente na amostra, o qual caracteriza o fim da digestão. Após o término da digestão, quando as amostras encontravam-se a temperatura ambiente, transferiu-se as amostras para balões volumétricos de 25 mL, completando-se o volume com água deionizada.

As amostras digeridas foram utilizadas para quantificação de P, K, Na, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn e Zn.

3.5.1 Determinação de K e Na

Para determinação de K e Na, utilizou-se um fotômetro de chama Digimed modelo DM-61. Calibrou-se o fotômetro e fez-se a leitura da curva padrão com amostras de 10 e 20 mg.L^{-1} .

Após verificação da estabilidade do equipamento realizou-se a leitura das amostras diluídas em água 1:10.

3.5.2. Determinação de P e S

Para determinação de P e S, utilizou-se um Espectrofotômetro FEMTO modelo 600 Plus. As curvas de calibração foram preparadas por diluição de soluções padrão de concentração 1000 ppm.

A curva padrão do fósforo foi preparada em erlenmeyers de 25 mL, transferindo-se 5 mL de cada um dos padrões, seguidos de 10 mL da solução diluída de molibdato de amônio e uma pequena quantidade de ácido ascórbico. As leituras foram realizadas após 30 minutos, em comprimento de onda de 660 nm.

Para o enxofre, a curva padrão e amostras foram preparadas em tubos de ensaio de 40 mL, transferindo-se 10 mL de cada um dos padrões de S. Adicionando, em seguida, 1 mL da solução de HCl 6,0 N contendo 20 mg.L^{-1} de S. Acrescentou-se cerca de 500 mg de cloreto de bário, esperando um minuto para a estabilização da amostra. Em seguida agitou-se por 30 segundos, até a dissolução do cloreto de bário, realizando-se leituras no comprimento de onda de 420 nm.

As curvas padrões obtidas encontram-se em anexo 1.

3.5.3. Determinação de Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn

Para determinação de Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn, utilizou-se um Espectrômetro de Absorção Atômica Perkin Elmer, modelo Analyst 300, através do método de atomização por chama ($\text{C}_2\text{H}_2/\text{ar}$), utilizando as condições que estão na Tabela 2:

Tabela 2: Condições experimentais para cada elemento analisado por espectrometria de absorção atômica.

Elementos	Fenda do monocromador (mA)	Comprimento de onda (λ) (nm)	Concentrações dos padrões (mg/L)
Cálcio	0,7	422,7	0 e 5
Magnésio	0,7	485,2	0 e 0,5
Cobre	0,5	324,7	0 e 0,5
Ferro	0,2	248,3	0 e 5
Manganês	0,5	279,5	0 a 0,5
Zinco	0,7	213,9	0 e 5

As curvas de calibração foram preparadas por diluição de soluções padrão estoque de concentração 1000 ppm para cada metal.

3.6 Testes de comparação entre glicerol P.A. e glicerol bruto

As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo descrito no item 3.2.2, utilizando-se dois tipos de glicerol: o glicerol P.A., com 99,5% de pureza (VETEC) e o glicerol bruto. Foi utilizado glicerol P.A. com 99,5% de pureza (VETEC) e glicerol bruto. Os meios foram esterilizados a 110°C por 10 minutos, inoculados com 0,01 g.L⁻¹ de biomassa de *Rhodotorula glutinis* e incubados em agitador orbital (30°C e 150 rpm) para uma fermentação de 96 horas, onde amostras de 1 mL foram retiradas em intervalos aproximados de 8 horas para análises.

3.7 Determinações analíticas

3.7.1 Pigmentação

A pigmentação está relacionada com o parâmetro **a***, um dos parâmetros indicados para a identificação de pigmentos, no caso carotenóides, obtido por análise colorimétrica utilizando colorímetro do fabricante Minolta CR-300, o qual emite um feixe de luz sobre o material e, em seguida, captura a luz refletida, fornecendo três variáveis: **L*** (luminosidade, varia do preto ao branco), **a*** (varia do verde ao vermelho) e **b*** (varia do azul ao amarelo), na escala padrão de cromaticidade na faixa de -60 até +60 para os parâmetros **a*** e **b***, (Figura 9).

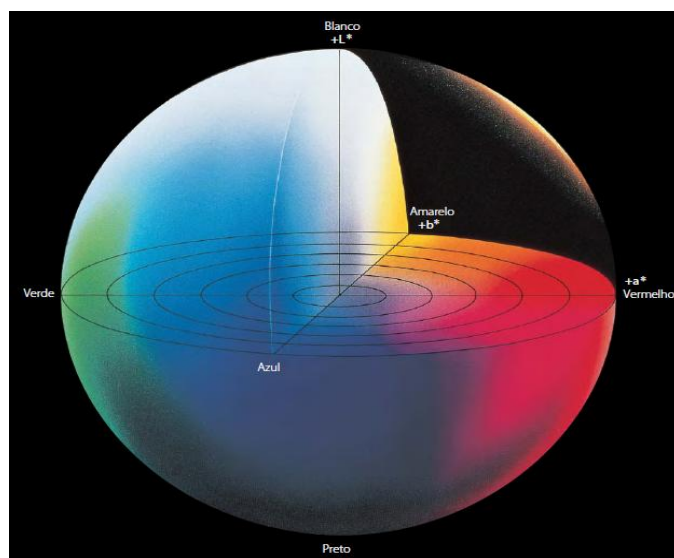


Figura 9: Representação de cor no espaço $L^*a^*b^*$ (MANUAL DO COLORÍMETRO MINOLTA CR-300)

3.7.2 Quantificação de biomassa

Foi coletado 1,0 (um) mL do meio fermentado e centrifugado (MICROCENTRIFUGA HT CM-610) a 6000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi separado e estocado sob refrigeração (REFRIGERADOR CONSUL-PRATICE 240) para a análise de glicerol. O precipitado foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL com água destilada, onde o volume foi aferido com água destilada. Após a homogeneização, a biomassa foi determinada espectrofotometricamente no comprimento de onda de 600 nm com o auxílio da curva padrão de peso seco previamente estabelecida, apresentada no anexo 2.

3.7.3 Quantificação do glicerol

O glicerol foi determinado através de uma curva padrão apresentada no anexo 3, obtida pela análise em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) ou High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Waters) composto por duas bombas (Waters modelo 1525) e dois detectores: índice de refração (Waters modelo 2414) e UV-Vis (Waters modelo 2487). A coluna cromatográfica analítica utilizada foi: supelcogel C -

610H, 30 cm × 7,8 mm, e uma pré- coluna supelcogel 9 µm, 5 cm × 4,6 mm. A temperatura da coluna foi mantida em 30°C com volume de injeção da amostra de 10,0 µL, com H₃PO₄ 0,1M como fase móvel a uma vazão de 0,5 mL.min⁻¹, em um período de 20 minutos.

3.7.4 Acompanhamento do pH

Acompanhou-se o pH da fermentação com amostras retiradas a cada 24 horas, sendo determinado potenciométricamente em pHmetro (TECNAL TEC-3MP).



Figura 10: Erlenmeyers após inoculados, são colocados em agitador orbital por 96 horas a 150 rpm e 30 °C.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do Glicerol Bruto

Na Tabela 3 pode-se observar o resultado da caracterização do glicerol bruto (Glicerol de soja), realizada conforme descrito na seção 3.5.

Tabela 3: Resultado da caracterização do glicerol bruto

Substâncias	Concentração (mg/kg)
Cálcio	4,2
Magnésio	1,2
Potássio	2312,5
Enxofre	160
Sódio	4987,5
Ferro	6,6
Cobre	-
Zinco	-
Fósforo	193,3
Manganês	-

O objetivo da caracterização foi verificar a presença ou ausência de elementos que pudessem inibir ou ativar a produção de carotenóides, uma vez que os microrganismos necessitam de minerais para desenvolver seu metabolismo.

4.2 Concentrações de biomassa utilizando o Glicerol PA e o Glicerol Bruto

Após a inoculação do meio de cultura que foi preparado, foi observado se este seria favorável ao crescimento da levedura utilizada, sob temperatura e agitação controlada. Assim, pode-se observar o comportamento dos valores de concentração celular (biomassa) e analisá-lo conforme descrito na seção 3.7.2.

Os resultados obtidos para o crescimento da *Rhodotorula glutinis* no meio contendo os dois tipos de glicerol como fonte de carbono apresentou uma similaridade que pode ser visualizada na Figura 11, o que indica um crescimento significativo de biomassa, os valores utilizados para a construção desta figura encontram-se no anexo 4. Pode-se observar que os resíduos contidos no glicerol bruto não interferem no crescimento microbiano.

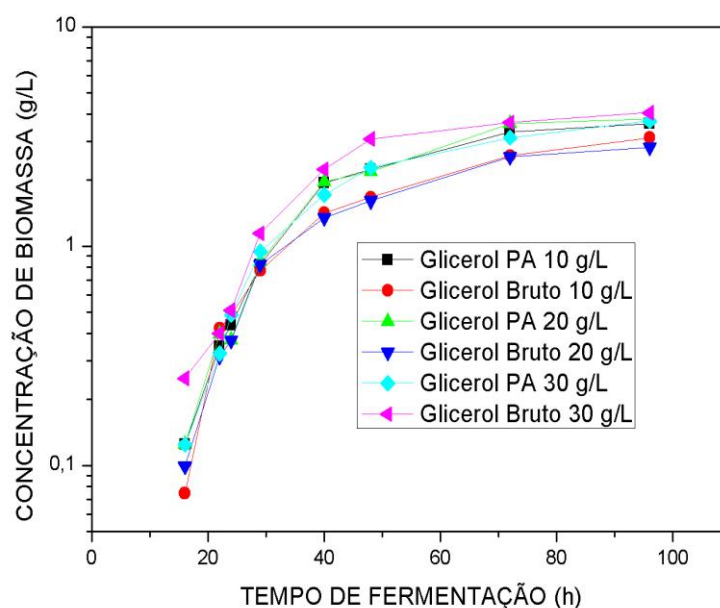


Figura 11: Concentração de biomassa utilizando meio preparado com glicerol PA e glicerol bruto com concentrações de 10. g.L⁻¹, 20 g.L⁻¹ e 30 g.L⁻¹.

Com o objetivo de viabilizar a utilização do glicerol bruto para esta produção, gerando aplicabilidades para este subproduto, realizou-se uma análise individual das concentrações, para uma melhor visualização deste crescimento.

Nos meios contendo as concentrações de 10 g.L⁻¹ e 20 g.L⁻¹ observou-se que houve uma maior concentração de biomassa utilizando o glicerol P.A. como pode ser observado nas Figuras 12 e 13.

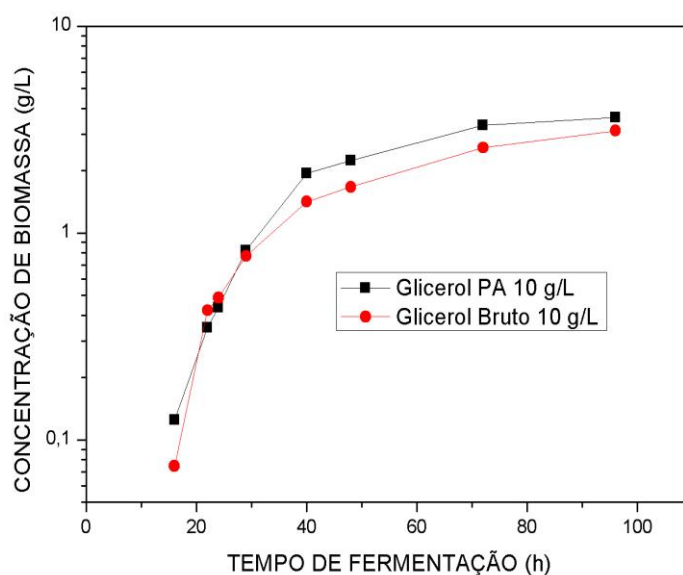


Figura 12: Comparação entre a concentração de biomassa utilizando meio preparado com glicerol bruto e glicerol P.A. com a concentração de 10 g.L⁻¹.

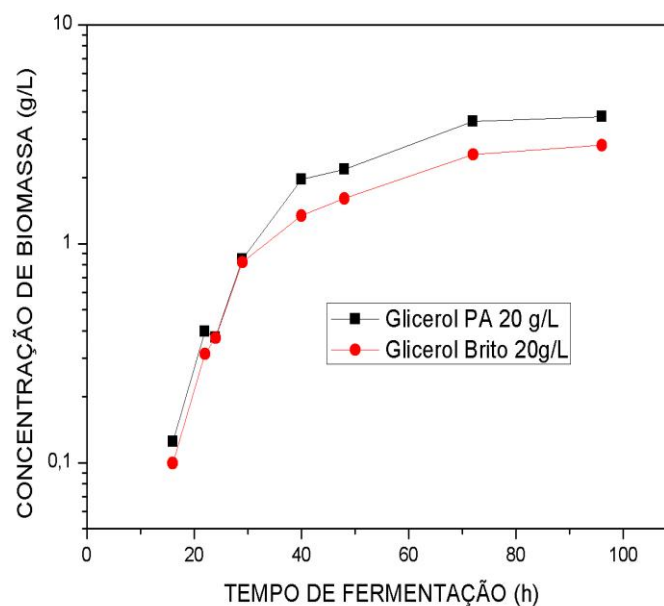


Figura 13: Comparação entre a concentração de biomassa utilizando meio preparado com glicerol bruto e glicerol PA com a concentração de 20 g.L^{-1} .

Porém, quando a concentração de 30 g.L^{-1} de glicerol bruto foi utilizada, obteve-se uma concentração de biomassa ligeiramente maior, conforme mostra a Figura 14. Este fato pode ser justificado pela presença dos micronutrientes descritos na seção 4.1 que, com o aumento da sua concentração podem ter favorecido o crescimento. A maior concentração de biomassa ($4,05 \text{ g.L}^{-1}$) foi obtida nesta concentração de glicerol bruto após 96 horas de fermentação no meio inoculado com *Rhodotorula glutinis*.

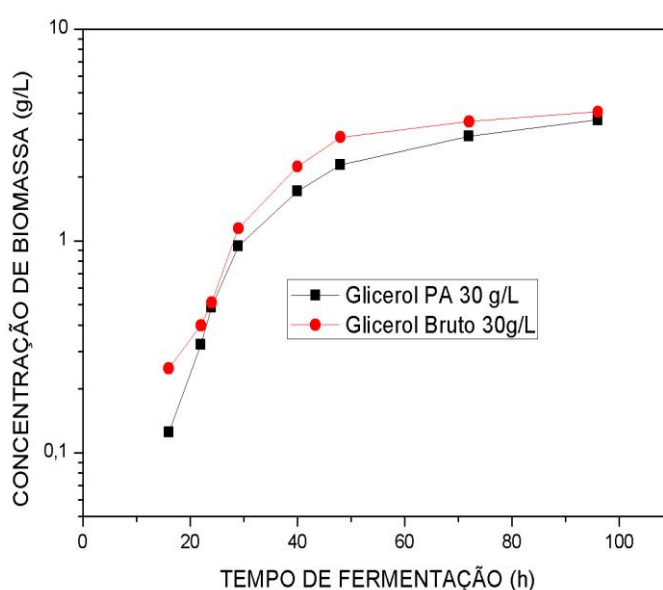


Figura 14: Comparação entre a concentração de biomassa utilizando meio preparado com glicerol bruto e glicerol PA com a concentração de 30 g.L^{-1} .

4.3 Consumo de glicerol

Para a determinação da quantidade de glicerol consumido, foram realizadas as análises descritas na seção 3.7.3. Pode-se observar que no cultivo houve o consumo de ambos os gliceróis, portanto este pode ser utilizado como fonte de carbono para a obtenção de carotenóides de *Rhodotorula glutinis*.

Os resultados obtidos e utilizados para a construção dos gráficos encontram-se no anexo 4, com estes foi possível analisar que o consumo de glicerol P.A. foi maior quando a concentração do meio foi de 10 g.L^{-1} e 20 g.L^{-1} como pode ser observado nas Figuras 15 e 16, justificando uma maior concentração de biomassa nestas, como descrito na seção 4.2.

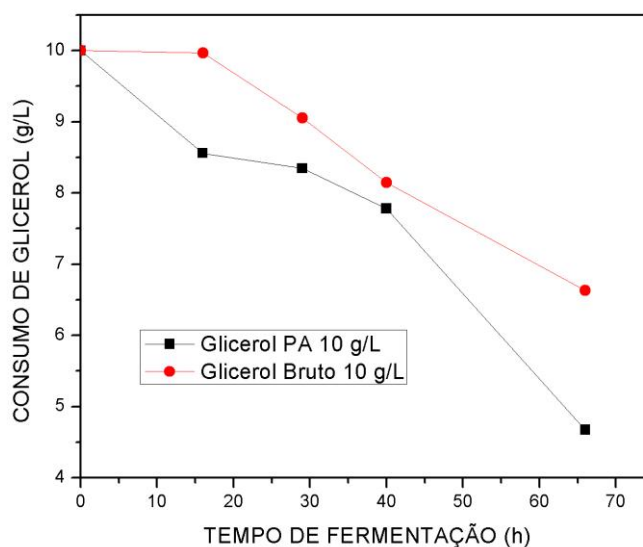


Figura 15: Comparação entre o consumo de glicerol utilizando meio preparado com glicerol bruto e glicerol PA com a concentração de 10 g.L^{-1} .

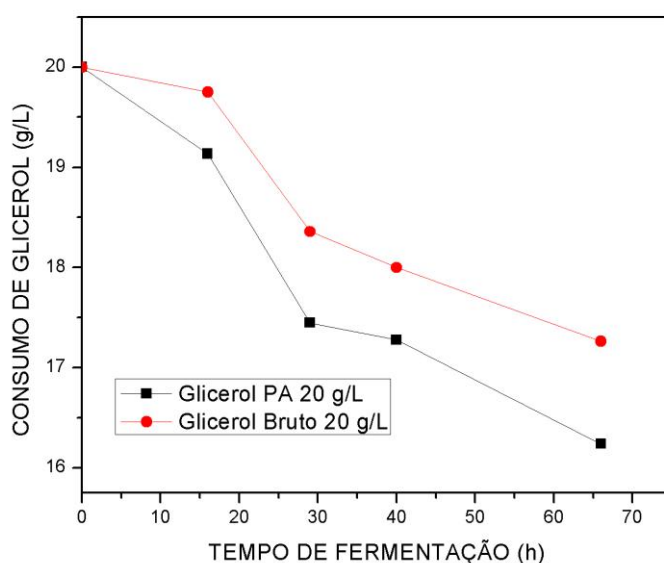


Figura 16: Comparação entre o consumo de glicerol utilizando meio preparado com glicerol bruto e glicerol PA com a concentração de 20 g.L^{-1} .

Porém, um maior consumo de glicerol bruto foi obtido quando a concentração do meio foi de 30 g.L^{-1} , fato que também pode ser justificado pelo que foi descrito na seção 4.2. Na Figura 17 pode-se observar que o consumo do glicerol bruto foi maior, favorecendo a possível utilização deste para a obtenção de carotenóides, fazendo-se necessário o estudo em concentrações acima destas para realizar esta análise. Entretanto, não foi obtido o valor de glicerol no final da fermentação (96 horas), para nenhuma das concentrações estudadas, pois não se dispôs de tempo para a realização da análise destas amostras.

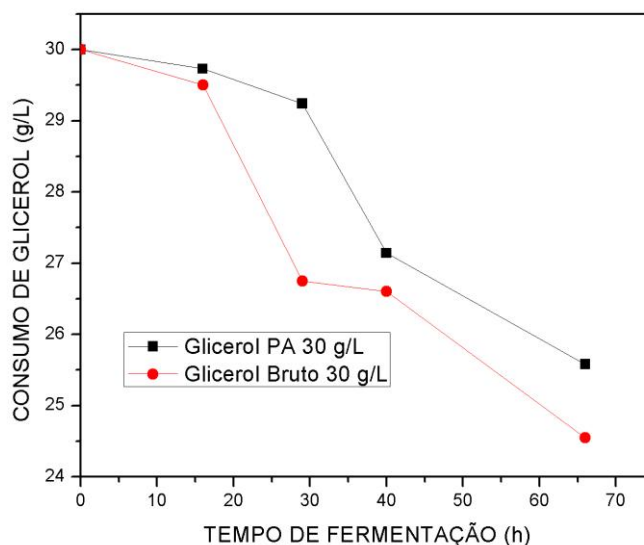


Figura 17: Comparação entre o consumo de glicerol utilizando meio preparado com glicerol bruto e glicerol PA com a concentração de 30 g.L^{-1} .

4.4 Análise de pH

A análise de pH é de fundamental importância, pois o controle deste é necessário para que haja o crescimento desejável da levedura, e consequentemente a produção de carotenóides. Ao iniciar as fermentações o meio teve seu pH ajustado para 7,0, como pode-se observar na Figura 18. Os resultados obtidos ao decorrer da fermentação foram utilizados para a construção do gráfico, encontram-se no anexo 4, com os quais notou-se que houve uma queda neste no valor a partir de 48 horas do tempo de fermentação. Entretanto, esta variação aparentemente não comprometeu o crescimento da *Rhodotorula glutinis*.

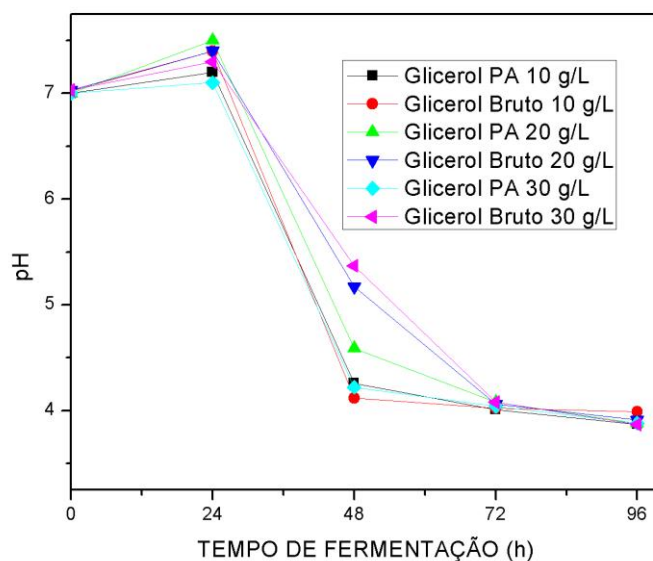


Figura 18: Perfil de pH em diferentes concentrações de glicerol P.A. e glicerol Bruto.

4.5 Análise Colorimétrica

O interesse industrial na obtenção dos carotenóides é o fato deles serem pigmentos naturais e possuírem atividade pró-vitaminica A. Foi necessária a análise colorimétrica para a comparação da pigmentação obtida durante a fermentação, o que indica a presença destes compostos. Os valores de a^* e b^* (pigmentação vermelha e amarela respectivamente) não apresentaram aparentemente uma relação direta com o aumento de biomassa, pois como descrito na seção 4.2, apesar da obtenção de uma maior concentração desta utilizando o glicerol P.A. nas concentrações de 10 g.L⁻¹ e em 20 g.L⁻¹, os valores dos parâmetros de pigmentação sempre foram superiores no meio preparado com glicerol bruto, indicando maior quantidade de carotenóides (Figura 19 e 20). Pode-se observar um aumento considerável no valor de a^* e b^* após o término do tempo de análise do cultivo, os valores obtidos apresentam-se no anexo 4. O resultado obtido condiz com os observados por COSTA *et al.* (1987), que relatam que a formação de carotenóides ocorre durante a fase estacionária, por serem metabólitos secundários. Portanto, o glicerol bruto apresentou um maior potencial de produção de carotenóides, devido à pigmentação de seus meios (Figura 21).

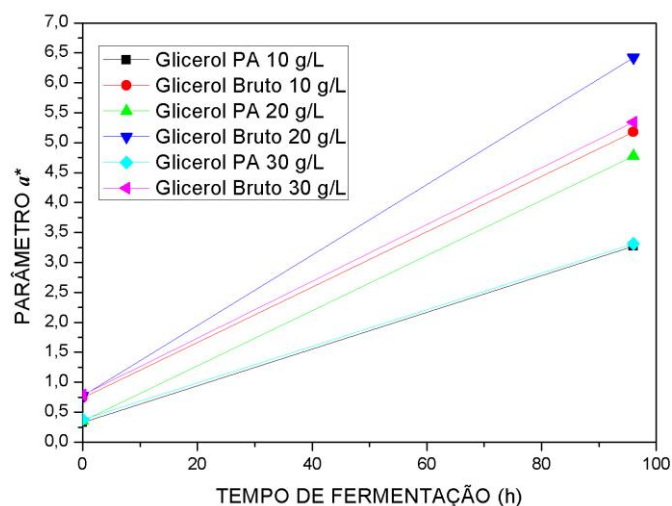


Figura 19: Comparação entre o Parâmetro a^* (pigmentação vermelha) obtido através da análise de colorimetria da biomassa obtida utilizando meio preparado com glicerol PA e glicerol bruto com concentrações de $10. \text{g.L}^{-1}$, 20g.L^{-1} e 30g.L^{-1}

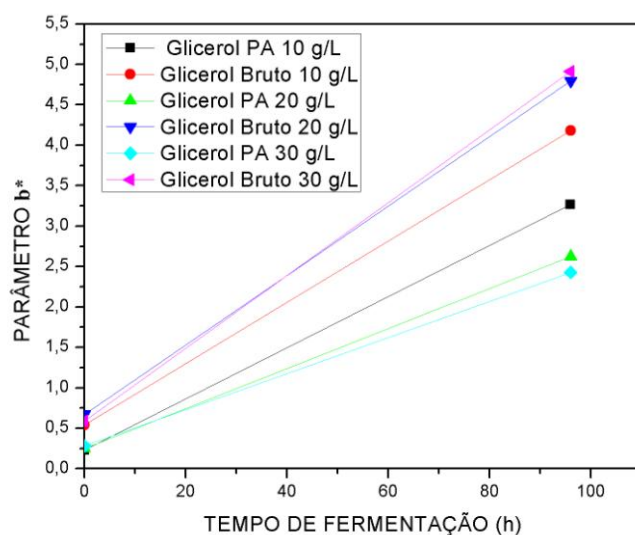


Figura 20: Comparação entre o Parâmetro b^* (pigmentação amarela) obtido através da análise de colorimetria da biomassa obtida utilizando meio preparado com glicerol PA e glicerol bruto com concentrações de $10. \text{g.L}^{-1}$, 20g.L^{-1} e 30g.L^{-1}



Figura 21: Aspecto visual da coloração do meio fermentado após 96 horas de cultivo utilizando o glicerol P.A. e o glicerol Bruto indicando presença de carotenóides.

5 CONCLUSÃO

- Visando a utilização do glicerol para a obtenção de moléculas de alto valor agregado os experimentos mostraram resultados satisfatórios. A produção de carotenóides utilizando glicerol como fonte de carbono mostrou-se viável para o crescimento do microrganismo utilizado, a levedura *Rhodotorula glutinis*, esta, adaptou-se ao meio e os resultados obtidos para a concentração de biomassa, mostraram que o meio utilizado forneceu os nutrientes necessários para a reprodução da levedura.
- A utilização do glicerol bruto, também apresentou resultados satisfatórios, o que indica que a presença de outros componentes além do glicerol não inibiu o crescimento do microrganismo. Foram testadas três concentrações de ambos os gliceróis (glicerol P.A. e glicerol bruto), 10 g.L⁻¹, 20 g.L⁻¹ e 30 g.L⁻¹, estas foram adicionadas ao meio de cultivo. O resultado onde obteve-se a maior concentração de biomassa, foi ao utilizar a maior concentração de glicerol bruto, no caso, 30 g.L⁻¹, o que pode ser justificado pelo fato de que com o aumento da concentração dos componentes encontrados no glicerol bruto, houve um aumento da concentração de nutrientes disponíveis e conseqüentemente houve uma maior reprodução do microrganismo.
- Os resultados obtidos através da análise colorimétrica, foram dados qualitativos utilizados para confirmar a presença dos carotenóides, pois estes são utilizados industrialmente como corantes, portanto sua pigmentação é de fundamental importância. Pode-se observar que a pigmentação, ou seja, a concentração de carotenóides não está associado ao crescimento de biomassa, o que é confirmado pelo fato destes serem metabólitos secundários, pois a maior quantidade de pigmentação vermelha foi encontrada quando o meio utilizado continha 20 g.L⁻¹ de glicerol bruto, já a maior quantidade de pigmentação amarela foi similar quando o meio utilizado continha 20 g.L⁻¹ e 30 g.L⁻¹ de glicerol bruto, mostrando que este se destaca nesta produção.
- Para uma melhor análise, é necessário um estudo mais aprofundado do comportamento da *Rhodotorula glutinis* em outras concentrações para possibilitar a máxima obtenção de carotenóides, observando os fatores que influenciam a sua produção e assim, possibilitar uma ampliação de escala da produção.

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.
- BARBIRATO, F., HIMMI, E. H., CONTE, T., BORIES A., **1,3-propanediol production by fermentation: An interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries**. Industrial Crops and Products. v. 7, p. 281–289, 1998.
- BHOSALE, P. (2004), **Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms**. Journal Applied Microbiology and Biotechnology, v. 63, p. 351-361.
- BOROWITZKA, L. J; BOROWITZKA, M. A. (1989), **β -carotene production with algae**. In: Vandamme, J. E. (ed). Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors, Elsevier Applied Science: New York, p. 15-26.
- BOTELLA-PAVÍA, P; RODRÍGUES-CONCEPCION, M. (2006), **Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improves foods**. Physiologia Plantarum, v.126, p. 369-381, 2006.
- BUZZINI, P *et al.* (2007), **Carotenoid profiles of yeast belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, and *Sporodiobolus***. Canadian Journal of Microbiology, v. 53, p. 1024-1031.
- BUZZINI, P.; MARTINI A. (1999), **Production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin**. Bioresource Technology, v. 71, p. 41-44.
- COSTA, I.; MARTELLI H. L.; DA SILVA J. M.; POMEROY D. (1987), **Production of β -carotene by a *Rhodotorula* strain**. Biotechnology Letters, v. 9, p. 373-375.
- DAVOLI, P. *et al.* (2004), **Carotenoids and fatty acids in red yeast *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis***. Applied Biochemistry and Microbiology, v. 40, n. 4, p. 392-397.

DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA, A. R. et al. (2004), **Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis***. Bioresource Technology, v. 92, p. 209-214.

FEOVILA, G. I. (1994), **Fungal carotenoids: their biological functions and practical use**. Applied Biochemical bioengineering, v. 30, p. 143-153.

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

FRASER, P. D.; PINTO, M. E. S.; HOLLOWAY, D. E.; BRAMLEY, P. M. (2004), **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.

Glicerina de biodiesel inunda mercado no país e derruba preços. 02 de Maio de 2007. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com>>. Acesso em: 15 de agosto de 2009.

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.

IMANDI, S. B.; BANDARU V. V. R.; SOMALANKA S. R.; GARAPATI H. R., (2006), **Optimization of medium constituents for the production of citric acid from byproduct glycerol using Doehlert experimental design**. Enzyme and Microbial Technology, v. 40, p. 1367-1372.

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

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.

KNOTHE, G.; VAN GERPEN, J.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. (2006), **Manual do Biodiesel**, Edgard Blücher: São Paulo, cap. 11.

LAMPILA, L. E.; WALLIN S. E.; DULERMAN L. B.; LOWRY S. R. (1985), **The effect of illumination of growth and β -carotene content of *Blakeslea trispora* grown in whey**. Lebensmittel Wiss Technol, v. 18, p. 370-373.

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

LÓPEZ, M. C. G. – M. *et al.* (2006), **Comparative analysis of the outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* in tubular and a bubble column photobioreactors.** Journal of Biotechnology, v. 123, p. 329-342.

LÓPEZ-NIETO, M. J. *et al.* (2004), **Biotechnological lycopene production by mated fermentation of *Blakeslea trispora*.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 66, p. 153-159.

MALDONADE, I. R. *et al.* (2008), **Carotenoids of yeast isolated from the Brazilian ecosystem.** Food Chemistry, vol.107, p. 145-150.

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

MALISORN, C; SUNTORNSUK, W. **Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM 28 in fermented radish brine.** Bioresource Technology, in press, 2007.

MANTZOURIDOU, F. *et al.* **Effect of the aeration rate and agitation speed on β -carotene production and morphology of *Blakeslea trispora* in a stirred tank reactor: mathematical modeling.** Biochemical Engineering Journal, vol. 10, p. 123-125, 2002.

MELENDEZ-MARTINEZ, A. J.; VICARIO, I. M. HEREDIA, F. J. (2003), **Application of Tristimulus Colorimetry To Estimate the Carotenoids Content in Ultrafrozen Orange Juices.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 51, p. 7266-7270.

MORRISON, L. R. (1994), **Glycerol.** Encyclopedia of Chemical Technology. New York: Wiley, p. 921-932.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. (2009), **Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da Glicerina de produção de biodiesel.** Química Nova, Vol. 32, No. 3, 639-648.

NELIS, H.; DE ENHEER A. P. (1991), **Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds.** Journal of Applied Bacteriology, v. 70, p. 181-191.

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

OLIVIER, J; PALOU, A. (2000), **Chromatographic determination of carotenoids in foods**. Journal of Chromatography A, v. 881, p. 543-555.

PELZ, A.; WIELAND, K.; PUTZBACH, K; HENTSCHEL, P.; ALBERT, A; GÖTZ, F. (2005), **Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus***. Journal of Biological Chemistry, v. 280, p. 32493-32498.

PFANDER, H. (1987), **Key to Carotenoids**, 2nd ed. BIRKHAUSER, BASEL.

REHM, H. (1988), **Microbial production of glycerol and other polyols. Biotechnology, Special microbial process**. Weinheim: VCH, vol. 6B , p. 52-64.

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

SIMPSON, K. L.; NAKAYAMA T. O. M.; CHICHESTER C. O. (1964), **Biosynthesis of yeast carotenoids**. Journal of Bacteriology, v. 88, p. 1688-1694.

STRINGHAM, J. M.; HAMMOND, B. R. (2005), **Dietary lutein and zeaxanthin: possible effects on visual function**. Nutrition Reviews, v. 63, p. 59-64.

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. (2005), **Simplex optimization of carotenoids production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean wast flour as substrate**. Process Biochemistry, v. 40, p. 2551-2557.

TOSETTO, M. G.; ANDRIETTA, S. R. (2003), **Cinética de produção de glicerol em processo de fermentação alcoólica utilizando diferentes matérias primas industriais**. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, Florianópolis. Anais do 14º SINAFERM, Florianópolis.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. H.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M. (2009), **Produção de carotenóides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais**. Química Nova, v. 32, nº 9, p. 2429-2436.

VERDOES, J. C. *et al.* (2003), **Metabolic engineering of the carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*)**. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 7, p. 3728-3738.

YAZDANI, S.S.; GONZALEZ, R. (2007), **Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry**. *Curr. Opin. Biotechnol*, v. 18, p. 213–219.

ANEXOS

ANEXO 1

Curva padrão do fósforo

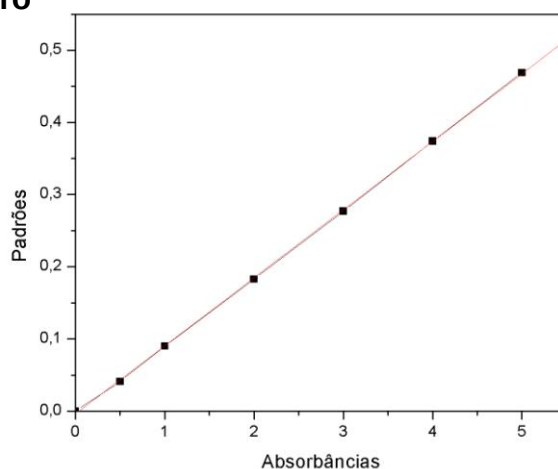


Figura 22: Curva de calibração de Fósforo.

Foi obtida uma correlação linear, através do programa Microcal Origin versão 8.0, cuja equação é expressa na Equação 4.

$$\text{Concentração}(\text{mg} / \text{kg}) = 0,040185 + 10,60464 * \text{absorbância} \quad (4)$$

Curva padrão do enxofre

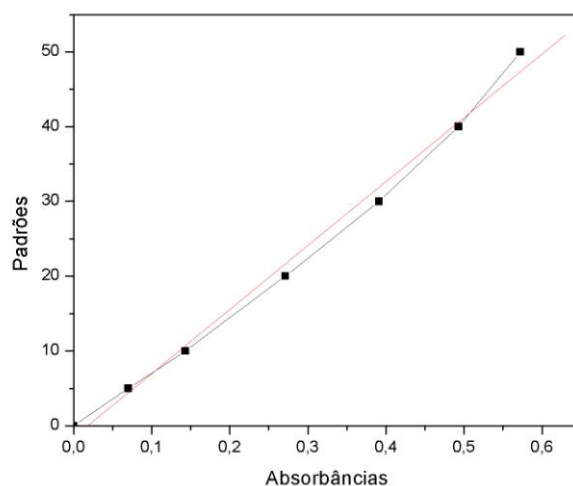


Figura 23: Curva de calibração de Enxofre.

Foi obtida uma correlação linear, através do programa Microcal Origin versão 8.0, cuja a equação da curva é expressa na Equação 5.

$$\text{Concentração}(\text{mg} / \text{kg}) = -1,54286 + 85,46394 * \text{absorbância} \quad (5)$$

ANEXO 2

Curva padrão de concentração de Biomassa

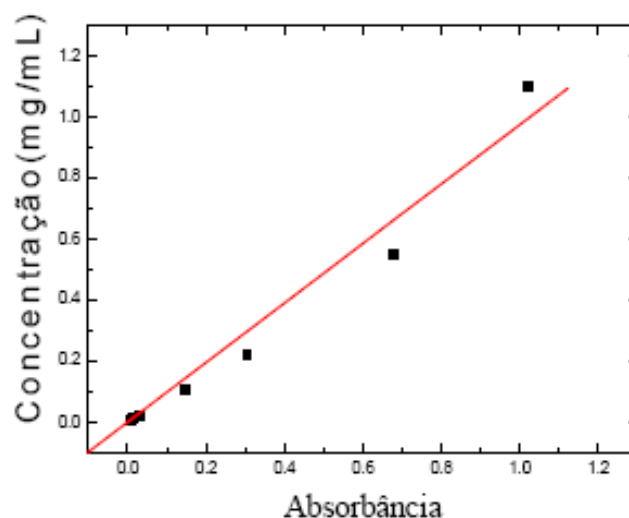


Figura 24: Curva padrão de Concentração de Biomassa.

A curva de calibração de concentração de biomassa foi obtida através das soluções preparadas em diversas diluições, através dos resultados obteve-se uma correlação linear, através do programa Microcal Origin versão 8.0, conforme pode-se observar na Figura 23, cuja equação é expressa na Equação 1.

$$Y = a * X + b \quad (1)$$

Sabendo que o X é a concentração e que o parâmetro b pode ser desconsiderado, pois seu valor é desprezível para a determinação desta, o fator de concentração é expresso na Equação 2.

$$\text{Fator de Concentração (mg / mL)} = f = \frac{1}{a} \quad (2)$$

E finalmente a concentração de biomassa pode ser calculada através da Equação 3.

$$\text{Concentração (g / L)} = 0,994835 * \text{Diluição} * \text{absorbância} \quad (3)$$

ANEXO 3

Curva de calibração do Glicerol

A curva de calibração do glicerol foi obtida através das soluções padrões de glicerol preparadas nas seguintes concentrações: 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20; 25; 30 g/L, todas estas em duplicata, possibilitando o cálculo da média e do desvio padrão. As soluções-padrão foram preparadas por diluição em água deionizada de uma “solução mãe” de concentração 30 g/L. As análises foram realizadas por IR em CLAE. As condições cromatográficas que se utilizaram nas análises das soluções padrões foram: solução de fase móvel ácido fosfórico 0,1 M a uma vazão de 0,5 mL/min, durante 30 min, com coluna supelcogel C - 610H, 30 cm × 7,8 mm (Supelco), a 30 °C, com volume de injeção das amostras de 10 µL e uma pré- coluna supelcogel 9 µm, 5 cm × 4,6 mm. Na Figura 25 temos o gráfico da curva de calibração do glicerol.

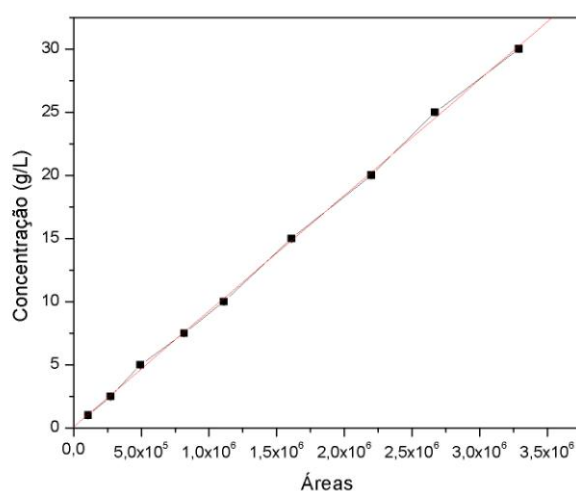


Figura 25: Curva padrão de Glicerol.

Obteve-se uma correlação linear, através do programa Microcal Origin versão 8.0, verificou-se através do R^2 que os pontos estão bem ajustados, cuja equação é expressa na Equação 6.

$$\text{Concentração(g / L)} = -0,59654 + 9,17E - 6 * \text{Área} \quad (6)$$

ANEXO 4

Tabela 4: Resultados da análise de concentração de biomassa nas concentrações testadas.

Tempo (h)	Glicerol P.A. 10 g.L ⁻¹	Glicerol bruto 10 g.L ⁻¹	Glicerol P.A. 20 g.L ⁻¹	Glicerol bruto 20 g.L ⁻¹	Glicerol P.A. 30 g.L ⁻¹	Glicerol bruto 30 g.L ⁻¹
16	0,12	0,08	0,12	0,10	0,12	0,25
22	0,35	0,42	0,40	0,31	0,32	0,40
24	0,44	0,49	0,37	0,37	0,49	0,51
29	0,82	0,77	0,85	0,82	0,95	1,14
40	1,94	1,42	1,96	1,34	1,72	2,24
48	2,24	1,67	2,19	1,61	2,28	3,08
72	3,31	2,59	3,62	2,55	3,12	3,66
96	3,62	3,12	3,81	2,81	3,72	4,05

Tabela 5: Resultados da análise do consumo de glicerol

Tempo (h)	Glicerol P.A. 10 g.L ⁻¹	Glicerol bruto 10 g.L ⁻¹	Glicerol P.A. 20 g.L ⁻¹	Glicerol bruto 20 g.L ⁻¹	Glicerol P.A. 30 g.L ⁻¹	Glicerol bruto 30 g.L ⁻¹
0	10,00	10,00	20,00	20,00	30,00	30,00
16	8,56	9,96	19,13	19,75	29,73	29,50
29	8,34	9,05	17,45	18,36	29,24	26,75
40	7,78	8,14	17,28	17,99	27,14	26,60
66	4,67	6,63	16,24	17,26	25,58	24,55

Tabela 6: Resultados da análise do acompanhamento de pH

Tempo (h)	Glicerol P.A. 10 g.L ⁻¹	Glicerol bruto 10 g.L ⁻¹	Glicerol P.A. 20 g.L ⁻¹	Glicerol bruto 20 g.L ⁻¹	Glicerol P.A. 30 g.L ⁻¹	Glicerol bruto 30 g.L ⁻¹
0	7,00	7,02	7,00	7,03	7,00	7,03
24	7,20	7,40	7,50	7,40	7,10	7,30
48	4,26	4,12	4,59	5,17	4,22	5,37
72	4,01	4,02	4,08	4,06	4,04	4,08
96	3,87	3,99	3,88	3,91	3,88	3,87

Tabela 7: Resultados da análise de colorimetria

Tempo (h)	Glicerol P.A. 10 g.L ⁻¹	Glicerol bruto 10 g.L ⁻¹	Glicerol P.A. 20 g.L ⁻¹	Glicerol bruto 20 g.L ⁻¹	Glicerol P.A. 30 g.L ⁻¹	Glicerol bruto 30 g.L ⁻¹
0	0,33	0,74	0,35	0,77	0,38	0,79
96	3,27	5,18	4,78	6,42	3,31	5,34