

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

Jéssica de Souza

**Extração de corantes produzidos por *Rhodotorula glutinis* empregando
como substrato farinha de mandioca de varredura hidrolisada**

Trabalho de Conclusão de Curso

Campo Mourão
2015

Jéssica de Souza

Extração de corantes produzidos por *Rhodotorula glutinis* empregando como substrato farinha de mandioca de varredura hidrolisada

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado a disciplina de Trabalho de Diplomação, do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Campo Mourão, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos.

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Mirela Vanin dos Santos Lima

Campo Mourão

2015



TERMO DE APROVAÇÃO

EXTRAÇÃO DE CORANTES PRODUZIDOS POR *RHODOTORULA GLUTINIS*
EMPREGANDO COMO SUBSTRATO FARINHA DE MANDIOCA DE
VARREDURA HIDROLISADA

POR

JÉSSICA DE SOUZA

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado em 30/11/2015 às 10:20 como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Tecnologia em Alimentos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Prof^a. Dr^a. Mirela Vanin dos Santos Lima
Orientadora

Prof. Dr. Bogdan Demczuk Junior
Membro da banca

Profa. Dr^a. Tanatiana Ferreira Guelbert
Membro da banca

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma contribuíram para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível.

A Deus, meu Mestre, que me fez perseverar, me deu ânimo e fez com que eu chegasse onde estou.

A professora doutora Mirela Vanin dos Santos Lima, orientadora deste trabalho, pela orientação, confiança, pelos conhecimentos transferidos, pela sabedoria e companheirismo.

Aos meus pais, José e Nair, pela dedicação, carinho, incentivo e apoio em todos os momentos. Dedico essa conquista também a vocês.

Ao meu namorado, Gustavo, por todo amor, paciência, por ter compartilhado das minhas angustias e alegrias e, por ter estado sempre ao meu lado.

As minhas irmãs, Josiani e Jeicielle, pelo carinho e apoio sempre.

A Thaynara Ferrari, pela amizade. Por sempre que possível ter me auxiliado na realização deste trabalho e pelo companheirismo ao longo desses anos.

A todos os amigos que conquistei durante esse caminho, e que serão levados comigo por onde eu for. Pela diversão, amizade, aprendizado e convivência que me estimularam nessa jornada.

Aos membros da banca examinadora pelas contribuições.

A esta universidade, seu corpo docente, direção e administração.

A todos que torceram por mim e contribuíram, para minha formação, meu muito obrigado.

SOUZA, Jéssica. Extração de corantes produzidos por *Rhodotorula glutinis* empregando como substrato farinha de mandioca de varredura hidrolisada. 2015. 43 f. (Trabalho de conclusão de curso de graduação em Tecnologia de Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2015.

Resumo

Os corantes são amplamente utilizados nas indústrias alimentícias, principalmente em alimentos industrializados. Existe uma grande preocupação com a disseminação da utilização de corantes sintéticos, já que vários estudos apontam que a utilização destes a longo prazo pode trazer prejuízos à saúde humana. Esse fato tem incentivado pesquisas para produção de corantes naturais, uma vez que estes ainda possuem valor elevado, se comparado aos sintéticos, tornando-os pouco vantajosos para as indústrias. Neste sentido, este trabalho objetivou avaliar a possibilidade do uso do caldo de farinha de mandioca de varredura hidrolisado, como meio de cultivo para a levedura *Rhodotorula glutinis* na produção de carotenoides, visto que este subproduto das farinheiras é de baixo custo e possui em sua composição nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo. Para tanto, foram realizados três experimentos em triplicata variando a concentração do caldo de farinha de mandioca de varredura hidrolisado no meio fermentativo e após as fermentações para produção dos carotenoides, dois métodos de extração com solvente foram avaliados: acetona e éter de petróleo 1:1 (v/v); acetona e éter de petróleo 1:1 (v/v) associado ao ultrassom. Para a avaliação do processo fermentativo foram realizadas análises de pH, quantificação da biomassa, determinação de açúcar redutor e concentração de microrganismos, no início e ao término da fermentação; e, para avaliar a extração dos carotenoides foi realizada análise em espectrofotômetro (UV-VIS) à 450 nm seguindo-se o cálculo da quantificação dos carotenoides pela Lei de Lambert Beer. Analisando os resultados observou-se uma diminuição dos valores de pH ao final do processo de fermentação, bem como, a diminuição da concentração de açúcares redutores dos meios. Houve também, aumento na concentração de microrganismos e conseqüentemente da biomassa, sugerindo que a farinha de mandioca de varredura hidrolisada é adequada como meio de cultura para obtenção de carotenoides; e após a extração e quantificação dos carotenoides foi possível perceber que o processo de extração associado ao ultrassom proporcionou melhor extração dos carotenoides.

Palavras-Chave: Carotenoides. *Rhodotorula glutinis*. Farinha de mandioca de varredura. Fermentação. Extração com solvente.

SOUZA, Jéssica. **Dyes extraction produced by *Rhodotorula glutinis* using as substrate cassava flour of hydrolyzate scan**. 2015. 43 f. Completion of course work (Food Technology) - Federal Technological University of Paraná. Campo Mourão, 2015.

Abstract

The dyes are widely used in food industry, especially in processed foods. There is great concern about the spread of the use of synthetic dyes, as several studies show that the long-term of their use can be harmful to human health. This fact has encouraged research to produce natural colors, since these still have a high value when compared to synthetic, becoming disadvantageous for industries. Thus, this study aimed to assess the possibility of using cassava flour broth of hydrolyzate scan as culture medium for *Rhodotorula glutinis* yeast in the production of carotenoids, as this is a byproduct of flour industry it has low cost and a composition with the nutrients necessary for the growth of the microorganism. Therefore, were conducted three experiments in triplicate by varying the concentration of the cassava flour broth of hydrolyzate scan in the fermentation middle, after fermentations for production of carotenoids two methods of extraction solvent were evaluated: acetone and petroleum ether 1: 1 (v / v); acetone and petroleum ether 1: 1 (v / v) associated with the ultrasound. To evaluation of the fermentation process were performed with pH analyzes, quantification of biomass, determination of reducing sugar and concentration of microorganisms, at the beginning and at the end of fermentation; and to evaluate the extraction of the carotenoid a spectrophotometer analysis (UV-VIS) was performed at 450nm followed by calculating the quantification of carotenoids by Lambert Beer Law. Analyzing the results was observed a decrease in pH values at the end of the fermentation process, as well as, a decrease of the concentration reduced sugars of the means. There was also an increase in the concentration of microorganisms and consequently of the biomass, suggesting that the cassava flour broth of hydrolyzate scan is suitable as a culture medium for obtaining carotenoids; and after extraction and quantification of carotenoids it was observed that the extraction process associated with ultrasound provided better extraction of carotenoids.

Keywords: Carotenoids. *Rhodotorula glutinis*. Cassava Flour of Hydrolyzate Scan. Fermentation. Solvent Extration.

Lista de ilustrações

Figura 1. Estrutura química de alguns carotenoides: (a) Xantofilas – zeaxantina, luteína, criptoxantina e astaxantina; (b) Carotenos – neurosporeno, licopeno, β -caroteno e α -caroteno, respectivamente.	14
Figura 2. Fluxograma dos estágios da biossíntese de carotenóides.....	16
Figura 3. Estrutura do betacaroteno.....	17
Figura 4. Levedura <i>Rhodotorula glutinis</i>	18
Figura 5. Fluxograma das metodologias utilizadas.	21
Figura 6. Processo de hidrólise da farinha de mandioca de varredura.	23
Figura 7. Meios em banho termostático sob agitação.	24
Figura 8. Curva de calibração de Açúcar Redutor.....	29
Figura 9. Meios de cultivo após 120 horas de fermentação.	31
Figura 10. Biomassa concentrada por centrifugação antes do processo de extração, nas concentrações 12,5%, 25% e 37,5% respectivamente (em triplicata), de caldo de farinha de mandioca hidrolisada.....	32
Figura 11. Biomassa depois do processo de extração com acetona/ éter de petróleo, em triplicata nas concentrações 12,5%, 25% e 37,5% de farinha de mandioca hidrolisada respectivamente.	32
Figura 12. Biomassa depois do processo de extração com acetona/ éter de petróleo associados ao ultrassom, em triplicata nas concentrações 12,5%, 25% e 37,5% respectivamente.	33

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	OBJETIVOS.....	11
2.1	Objetivo geral.....	11
2.2	Objetivos específicos.....	11
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1	Corantes.....	12
3.2	Carotenoides.....	13
3.2.1	Funções e estruturas química dos carotenoides.....	13
3.2.2	Microrganismos produtores de carotenoides.....	15
3.2.3	Betacaroteno.....	16
3.3	Levedura <i>Rhodotorula glutinis</i>	17
3.4	Fermentação.....	18
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1	Materiais.....	21
4.2	Ativação do Microrganismo.....	21
4.3	Preparação do inóculo.....	22
4.4	Meio de Cultivo e Fermentação.....	22
4.4.1	Preparo dos meios de cultivo:.....	23
4.4.2	Fermentações.....	24
4.5	Metodologias analíticas utilizadas para o caldo fermentado.....	25
4.5.1	Determinação de pH.....	25
4.5.2	Determinação de biomassa (massa celular seca).....	25
4.5.3	Determinação da Concentração de Microrganismo.....	26
4.5.4	Determinação de açúcares redutores – Metodologia DNS.....	26
4.6	Extração dos carotenoides.....	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	29
5.1	Extração dos carotenoides.....	31
6	CONCLUSÃO.....	36
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, boa parte dos alimentos é proveniente de regiões longínquas e necessitam frequentemente de aditivos para manter a sua integridade. Além disso, a variedade e a apresentação dos alimentos são preocupações constantes das indústrias alimentícias. Tudo isto tem motivado as indústrias de engenharia e tecnologia de alimentos a utilizarem agentes químicos para conservar, colorir ou aromatizar os alimentos, com o objetivo de atrair cada vez mais os consumidores (ANTUNES; ARAUJO, 2000).

A ampla utilização de corantes naturais ou sintético, em alimentos e a preocupação sobre a “segurança” dos corantes nos alimentos têm direcionado o interesse dos pesquisadores e das indústrias para a identificação e uso dos corantes naturais (AGARWAL *et al.*, 1994).

Dentro do grupo dos corantes os carotenóides são denominados corantes naturais responsáveis pelas cores amarelas, laranja e vermelho, utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica, de cosméticos e ração. Além de seu amplo uso como corantes e no enriquecimento de alimentos, também são utilizados devido a sua atividade pró-vitamínica 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 (certos tipos de câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular e catarata) (NIIZU, 2003 apud VALDUGA *et al.*, 2009).

Muitos microrganismos produzem carotenóides, porém nem todos são industrialmente interessantes. As leveduras destacam-se pelo seu uso como fonte proteica, capacidade de crescimento em substratos de baixo custo e alto teor de açúcar (VALDUGA *et al.*, 2009).

Dentre os estudos realizados, destaca-se a produção de carotenóides pelos microrganismos *Rhodotorula*, *Phaffia rhodozyma*, *Sporobolomyces*, *Blakeslea trispora*, *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis*, sendo que os carotenóides naturais mais investigados são a astaxantina, β -caroteno, cantaxantina, toruleno e licopeno (VALDUGA *et al.*, 2009).

Então, a produção biotecnológica de carotenóides é de crescente interesse, especialmente os carotenóides de origem microbiana; sendo a

Rhodotorula glutinis conveniente para a produção em grande escala por via fermentativa, devido à sua elevada taxa de crescimento e baixas necessidades nutricionais (WANG *et al.*, 2008).

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo estudar o processo de obtenção de carotenóides por fermentação descontínua, utilizando a levedura *Rhodotorula glutinis* como biocatalisador do processo, empregando o caldo de farinha de mandioca de varredura hidrolisada como meio de cultivo para o microrganismo e avaliar a influência da concentração de açúcar redutor nos meios para produção de carotenóides.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a viabilidade da técnica de bioprodução de carotenoides por fermentação descontínua, empregando o caldo de farinha de mandioca de varredura hidrolisada como meio de cultivo e a levedura *Rhodoturula glutinis* como biocatalisador deste processo.

2.2 Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo geral deste trabalho, os objetivos específicos foram propostos:

- Avaliar a possibilidade de uso de farinha de mandioca de varredura hidrolisada como meio de cultura para o processo fermentativo.
- Realizar a hidrólise da farinha de varredura.
- Ativar e realizar a manutenção do microrganismo durante o período de realização da pesquisa.
- Avaliar a influência da quantidade de açúcares redutores iniciais sobre a obtenção de carotenoides por via fermentativa.
- Avaliar dois métodos de recuperação de carotenoides: acetona/ éter de petróleo 1:1 (v/v) e acetona/ éter de petróleo 1:1 (v/v) associados ao ultrassom.
- Quantificar os carotenoides obtidos ao final do processo fermentativo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Corantes

“Considera-se corante a substância ou a mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração de alimento (e bebida)” (ANVISA, 1977).

Existem três categorias de corantes permitidas na legislação para o uso em alimentos, os corantes naturais, o corante caramelo e os artificiais. Segundo o artigo 10 do Decreto nº55 871, de 26 de março de 1967, considera-se corante natural o pigmento ou corante inócuo extraído de substância vegetal ou animal. Corante caramelo é o produto obtido a partir da reação de Maillard de açúcares. Já o corante artificial é a substância obtida por processo de síntese (com composição química definida) (REVISTA ADITIVOS & INGREDIENTES, 2011).

Os corantes naturais têm sido utilizados há anos, sendo que alguns apresentam solubilidade em óleo, proporcionam matizes suaves e conferem ao produto aspecto natural, o que aumenta a aceitação pelo consumidor (REVISTA ADITIVOS & INGREDIENTES, 2009).

Já os corantes artificiais têm sido objeto de críticas, pois seu uso em alimentos se justifica apenas por questões de hábitos alimentares. Entretanto, ainda existem diferentes opiniões quanto à inocuidade dos diversos corantes artificiais (PRADO; GODOY, 2003).

Os corantes artificiais permitidos no Brasil são o amarelo crepúsculo, azul brilhante FCF, bordeaux S ou amaranto, eritrosina, indigotina, ponceau 4R, tartrazina e o vermelho 40 (REVISTA ADITIVOS & INGREDIENTES, 2009).

Em virtude do aumento no número de compostos com poder corante e de seu uso estendido aos alimentos e bebidas, tornou-se necessário o controle de suas aplicações e surgiu uma maior preocupação com possíveis efeitos à saúde humana (PRADO; GODOY, 2003).

3.2 Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos naturais responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelho, presentes na natureza (UENOJO *et al.*, 2007). O organismo humano não é capaz de sintetizar carotenoides; assim, frutas e hortaliças constituem suas principais fontes. Alfa e β -carotenos, β -criptoxantina, luteína, zeaxantina e licopeno consistem nos principais carotenoides presentes na alimentação (ALALUF *et al.*, 2002).

Na indústria de alimentos, os carotenoides 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).

Carotenoides são os compostos bioativos dos alimentos (CBAs) mais estudados em vários de seus aspectos, incluindo a elucidação de suas propriedades físico-químicas, estabilidade e alterações durante o processamento e estocagem, biossíntese e metabolismo, bem como biodisponibilidade, implicações na saúde humana, e relação entre estrutura e função biológica. Além disso, são amplamente utilizados no desenvolvimento de produtos alimentícios enriquecidos, devido às suas propriedades como corantes naturais, antioxidantes e fontes de vitamina A (ISHIDA & CHAPMAN, 2009).

A produção industrial de carotenoides naturais por fermentação já é estabelecida e vem se expandindo. O processo de recuperação dos carotenoides, 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; EREN, 2007).

3.2.1 Funções e estruturas química dos carotenoides

Além de colorir, os carotenoides possuem atividades biológicas importantes destacando-se a inibição de doenças onde os radicais livres apresentam papel fundamental, como arteriosclerose, catarata, degeneração

macular, esclerose múltipla, câncer, doenças degenerativas e cardiovasculares (VALDUGA *et al.*, 2009).

Os carotenos se caracterizam por serem hidrocarbonetos lineares que podem ser ciclizados em uma ou ambas as extremidades da molécula, como por exemplo o β -caroteno. Xantofilas são derivados oxigenados de carotenos, como luteína, violaxantina, neoxantina e zeaxantina (BOTELLA-PAVÍA; RODRIGUES-CONCEPCIÓN, 2006). A Figura 1 apresenta algumas estruturas moleculares de carotenoides.

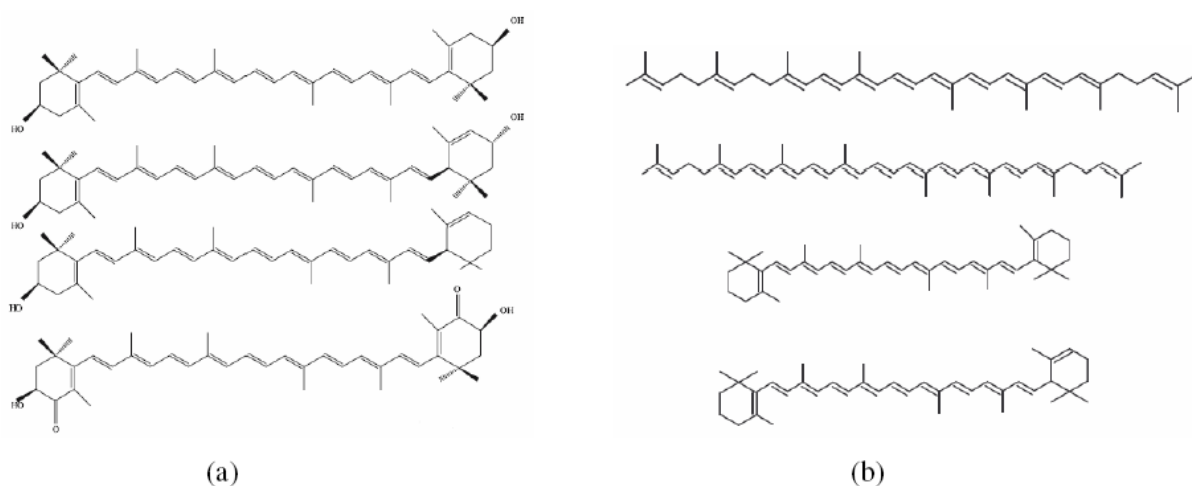


Figura 1. Estrutura química de alguns carotenoides: (a) Xantofilas – zeaxantina, luteína, criptoxantina e astaxantina; (b) Carotenos – neurosporeno, licopeno, β -caroteno e α -caroteno, respectivamente (SILVA, 2004).

A maioria dos carotenoides são tetraterpenoides C40 compostos de 8 unidades isoprenoides, 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 (VALDUGA *et al.*, 2009).

A característica de absorção de luz destes pigmentos dá-se devido à cadeia de duplas ligações conjugadas que atua como cromóforo, sendo necessário, aproximadamente, sete ligações duplas conjugadas para que os carotenoides apresentem coloração (VALDUGA *et al.*, 2009).

3.2.2 Microrganismos produtores de carotenoides

Os carotenoides podem ser biossintetizados por microrganismos fotossintetizantes, como algas e cianobactérias, e por microrganismos não fotossintetizantes como bactérias, fungos e leveduras (JOHNSON; SCHROEDER, 1995).

Através de muitos microrganismos ocorre a produção de carotenoides, porém nem todos são industrialmente interessantes. As leveduras destacam-se por sua capacidade de produção de pigmento em substratos de baixo custo, alto teor de açúcar e como fonte proteica. Os gêneros capazes de produzi-los são *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces* e *Phaffia*. Outros trabalhos mostram o desenvolvimento da *R. glutinis* em substratos de origem agro-industrial como o soro e o ultrafiltrado do soro do leite, mosto de uvas concentrado rectificado, em melação de beterraba, extrato de farinha de soja, mosto de uva, xarope de glucose, extrato de farinha de trigo, melação de cana de açúcar e xarope de milho (ANDRADE, 2010).

A síntese natural de carotenoides produzidos por algumas leveduras, como as do gênero *Rhodotorula*, tem sido considerada como potenciais produtoras de pigmentos (LIBKIND; BROOCK, 2006). Estes pigmentos microbianos apresentam-se como uma alternativa viável aos pigmentos de origem animal ou vegetal, não apresentando problemas de sazonalidade, além de terem produtividade alta (BRANCO, 2010).

De acordo com Silva (2004), o caminho de biossíntese de carotenoides, pode ser dividido em cinco etapas: estágios iniciais, formação de fitoeno, desaturação, ciclização e formação de xantofilas, como descrito 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 carotenoide 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 (OLIVIER & PALOU, 2000 *apud* SANTOS, 2010).



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

3.2.3 Betacaroteno

O β-caroteno é o caroteno mais abundante nos alimentos e o mais interessante economicamente, pois apresenta maior atividade vitamínica (AMBRÓSIO; CAMPOS; FARO 2006).

Industrialmente, os carotenoides, 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 e preparações multivitamínicas (BHOSALE; GRADE, 2001).

Segundo Stahl e Sies (2003), os carotenoides fazem parte do sistema de defesa antioxidante em humanos e animais. Devido a sua estrutura (Figura 3), atua protegendo as estruturas lipídicas da oxidação por sequestro de radicais livres gerados no processo foto-oxidativo.

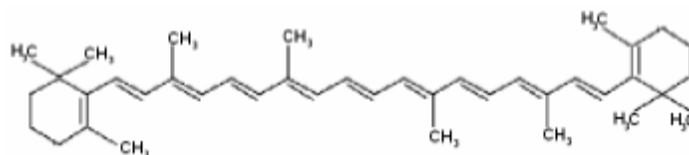


Figura 3. Estrutura do betacaroteno (AMBRÓSIO; CAMPOS; FARO, 2006)

3.3 Levedura *Rhodotorula glutinis*

O gênero *Rhodotorula* caracteriza-se pela presença de pigmentos carotenóides, reproduzindo-se exclusivamente por gemulação sem produção de esporos. São microrganismos estritamente aeróbios. Os pigmentos presentes neste gênero são α - e β - carotenos, toruleno e torularrodina. Neste gênero estão incluídas espécies como: *R. glutinis*, *R. aurantiaca*, *R. rubra*, *R. minuta*, *R. lactosa*, *R. graminis*. São espécies bem distribuídas na natureza, sendo encontradas em ambientes marinhos, aquáticos e no solo, inclusive no trato gastrointestinal do homem, devido a sua característica oportunista (COSTA, 1992).

Os microrganismos do gênero *Rhodotorula* são conhecidos por produzir quantidades consideráveis de carotenoides. Este gênero tem sido estudado devido a seu potencial para produção industrial, uma vez que oferecem vantagens sobre os outros gêneros em termos de taxa de crescimento elevada e uso de substratos de baixo custo. O seu crescimento pode ocorrer através da utilização de matéria-prima barata, como caldo ou melaço de cana-de-açúcar, soro do leite, mosto, farinha de feijão hidrolisada, extratos de soja e farinha de milho (MALISORN; SUNTORNSUK, 2008).

Dentre os microrganismos produtores de pigmentos, a *Rhodotorula glutinis* (Figura 4) além de acumular carotenoides como β -caroteno, toruleno e torularrodina como produtos finais da biossíntese de carotenoides também é rico em lipídios, proteínas e vitaminas, que a tornam um adequado aditivo (BHOSALE; GRADE, 2001).

As propriedades antígenotóxicas e anticarcinogênicas do β -caroteno foram avaliadas, demonstrando que a *Rhodotorula glutinis* é segura e não tóxica quando utilizada em alimentação animal (BHOSALE; GRADE, 2001).



Figura 4. Levedura *Rhodotorula glutinis* (RIBEIRO, 2008).

3.4 Fermentação

A fermentação é um processo de obtenção de energia utilizado por algumas bactérias e outros organismos. Ele ocorre com a quebra da glicose (ou outros substratos como o amido) em piruvato, que depois é transformado em algum outro produto, como o álcool etílico e lactato, definindo fermentação alcoólica e láctica (a fermentação também pode ser butílica, oxálica, acética). Este tipo de obtenção de energia não necessita do oxigênio como receptor final de elétrons. Por isso, é chamada de respiração anaeróbica. Porém, ele é dezoito vezes menos eficiente em termos de energia, gerando apenas dois trifosfatos de adenosina (ATPs) por molécula de glicose (CASADEI, 2012).

As fermentações descontínuas são as mais empregadas para obtenção de vários produtos fermentados e são conhecidas por fermentações por batelada ou processo descontínuo de fermentação (BRANCO, 2010).

A fermentação descontínua apresenta menores riscos de contaminação (quando comparados com processos contínuos de fermentação), grande flexibilidade de operação, devido ao fato de poder utilizar os fermentadores para fabricação de diferentes produtos, a possibilidade de realizar fases sucessivas no mesmo recipiente, condição de controle mais estreito da estabilidade genética do microrganismo, assim como a capacidade de identificar todos os materiais relacionados quando se está desenvolvendo um determinado lote de produto. Este processo é o mais utilizado na indústria de alimentos para produção de iogurte, chucrute, picles, cerveja, vinho, entre outros (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

Vários subprodutos agroindustriais são utilizados como substratos para a produção de enzimas. Inúmeros fatores favorecem o emprego destes tais como: disponibilidade, fonte alternativa com baixo valor comercial, características físicas e químicas que favorecem o crescimento de inúmeros microrganismos, dentre outros. Estes contribuem para a redução do custo operacional da produção enzimática (COUTO; SANROMÁN, 2005).

De acordo com Pandey (2000), o processo de fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais pode ser um processo vantajoso, pela conversão destes resíduos em produtos de alto valor agregado, como as enzimas.

Além desse tipo de aplicação, alguns subprodutos agroindustriais também podem ser destinados para a utilização como substratos para meios de fermentação, é o caso da farinha hidrolisada de resíduo de feijão e extrato de batata doce, que segundo Tinoi, (2005), servem como fontes de nitrogênio e carbono para os microrganismos, e já foram demonstradas na bioprodução de carotenoides por *Rhodotorula glutinis*.

Outro subproduto que está sendo avaliado, quanto a utilização como substrato em meios de fermentação é a farinha de mandioca de varredura, que de acordo com Caldas Neto, *et al.* (2000), nada mais é do que o resíduo da limpeza das farinhas, sendo composto principalmente de farinha de mandioca suja.

A farinha de mandioca caracteriza-se num alimento de alto valor energético, rico em amido, contém fibras e alguns minerais como potássio, cálcio, fósforo, sódio e ferro (CEREDA; VILPOUX, 2003). Devido a essas

características se torna um meio favorável para o crescimento de microrganismos, principalmente por ter em sua composição glicose, que serve de alimentos aos mesmos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Os reagentes Peptona, caldo Sabouraud, ágar Sabouraud, hidróxido de sódio, ácido clorídrico, α -amilase (Sigma), amiloglicosidase (Sigma), ácido dinitrosalicílico, solução de tartarato duplo de sódio e potássio, acetona e éter de petróleo e os equipamentos, estufa bacteriológica (Marca: ACB LABOR. Modelo: Incubadora tipo B.O.D), autoclave, câmara de fluxo laminar, banho termostático (Marca: Dist. Modelo: MOD- DI - 950M), pHmetro (Marca: Tecnopon), microscópio, câmara de Neubauer, espectrofotômetro UV-VIS (Marca: OceanOptics. Modelo: USB 650), vortex (Marca: Biomixer. Modelo: QL- 901), centrifuga refrigerada (Marca: Nova técnica. Modelo: NT 825) e ultrassom (Marca: Cristófoli. Modelo: Ultron2), estavam disponíveis nos laboratórios da UTFPR Campus Campo Mourão.

O microrganismo utilizado na realização deste estudo foi a levedura da espécie *Rhodotorula glutinis*, adquirida da Fundação André Tosello.

Aquisição da farinha de mandioca de varredura por doação da Pinduca Indústria Alimentícia Ltda.

O desenvolvimento da pesquisa se deu da seguinte forma:

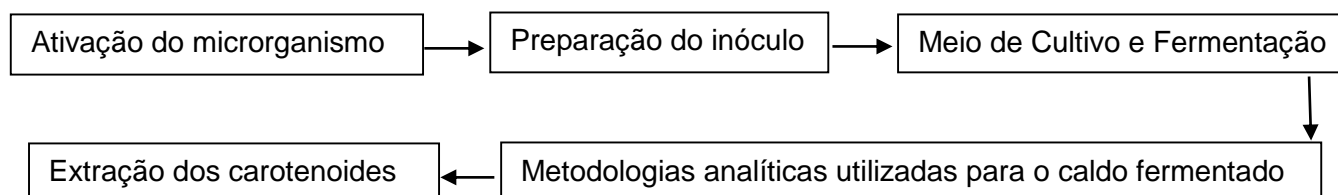


Figura 5. Fluxograma das metodologias utilizadas.

4.2 Ativação do Microrganismo

Foi preparado 1 tubos de ensaio de 20mL com tampa, contendo 2 mL de água peptonada 0,1%, o mesmo foi esterilizado por 15 minutos a 121 °C.

Preparou-se também 2 tubos de ensaio de 20 mL com tampa, contendo 10 mL de caldo Sabouraud estéril.

Em ambiente estéril, transferiu-se assepticamente com o auxílio de alça de platina, metade da cepa liofilizada para o tubo contendo 2mL de água peptonada 0,1% estéril, aguardou-se a hidratação e solubilização da cepa, misturando levemente. Após a total solubilização, transferiu-se metade do conteúdo do tubo (contendo a cepa) de forma asséptica para um tubo com o caldo Sabouraud, e a outra metade para o outro tubo. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica (Marca: ACB LABOR. Modelo: Incubadora tipo B.O.D), à 30 °C, por 24 horas, então foram utilizados para a preparação do inóculo.

4.3 Preparação do inóculo

Foi transferido assepticamente o conteúdo de um tubo contendo o ágar Sabouraud e a cepa, preparado conforme item 3.2, para um erlenmeyer de 250 mL, contendo 90 mL de caldo Sabouraud estéril e em seguida o mesmo foi colocado em banho termostático (Marca: Dist. Moldelo: MOD- DI- 950M) a 30 °C, com agitação controlada a 150 rpm por 24 horas. O mesmo procedimento foi realizado para o outro tubo.

4.4 Meio de Cultivo e Fermentação

Foi utilizada farinha de mandioca de varredura hidrolisada como meio de cultura em três concentrações: 12,5%, 25% e 37,5%. As fermentações se realizaram em triplicata.

4.4.1 Preparo dos meios de cultivo:

- ❖ **Hidrólise da farinha de mandioca de varredura:** foi preparada uma solução aquosa à 18% (m/v) com farinha de mandioca de varredura (Figura 6), e água destilada. pH foi ajustado para 6,2 com adição de hidróxido de sódio e, adicionada a enzima α -amilase (Sigma). Então o sistema foi aquecido para 90-95 °C e mantido por 1 hora sob agitação constante; ao término deste período obteve-se o amido da farinha de varredura liquefeito, então a solução foi resfriada para 60 °C e o pH ajustado para 4,5 com adição de ácido clorídrico, em seguida acrescentou-se a enzima amiloglicosidase (Sigma) e este sistema foi mantido nestas condições por 15 horas sob agitação constante. Ao término deste processo de hidrólise as enzimas foram inativadas através da fervura do sistema por 10 minutos. A solução obtida foi filtrada e avaliada quanto à concentração de AR empregando a metodologia de DNS, descrito no item 4.5.4.



Figura 6. Processo de hidrólise da farinha de mandioca de varredura.

- ❖ **Meio de cultivo teste:** o teste foi realizado com base na metodologia de Barbato (2014), com modificações. Foram preparadas (em triplicata) três

soluções aquosas de concentrações 12,5%; 25% e 37,5% (v/v) com a solução de farinha de varredura hidrolisada, o pH ajustado para 7 com adição de hidróxido de sódio; após, 135 mL do meio de cultivo foi adicionado em um erlenmeyer de 250 mL e esterilizado, por 15 minutos à 121 °C em autoclave e resfriados em fluxo laminar. Os meios foram caracterizados através da determinação de açúcares redutores pelo método de DNS.

4.4.2 Fermentações

Para esse procedimento foi utilizado como base a metodologia de Barbato (2014), com modificações.

Para os 3 meios de cultura preparados em triplicata, foram adicionados 15 mL do inóculo preparado conforme item 4.3 em câmara de fluxo laminar. Após a inoculação, os frascos foram tampados com “tampões de algodão” e permaneceram em banho termostático (Marca: Dist. Modelo: MOD- DI - 950M) representado pela Figura 7, mantido à temperatura constante de 30 °C, e sob agitação na velocidade de 150 rpm, por 120 horas para que a fermentação ocorresse.



Figura 7. Meios em banho termostático sob agitação.

4.5 Metodologias analíticas utilizadas para o caldo fermentado

No início do período de fermentação (logo após a adição do inóculo aos meios) foram realizadas análises de pH, biomassa, açúcares redutores e concentração de microrganismos. E ao final do processo, após 120 horas, as mesmas análises foram repetidas, seguindo a mesma metodologia, para comparação de resultados.

4.5.1 Determinação de pH

A determinação do pH ocorreu por meio eletrométrico, através do pHmetro da marca Tecnopon, previamente calibrado, de acordo com técnica preconizada pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

4.5.2 Determinação de biomassa (massa celular seca)

Um tubo de ensaio com tampa foi seco em estufa a 105 °C e resfriado em dessecador, então realizou-se a pesagem do tubo vazio. Posteriormente, foi retirado 10 mL dos meios em fermentação e adicionado no tubo, que foi submetido a centrifugação por 20 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi guardado para a determinação da concentração de AR. O precipitado foi lavado com água destilada e centrifugado por mais duas vezes. Então o tubo com o precipitado foi colocado em estufa a 105 °C por 24 horas para a secagem da biomassa, o mesmo foi resfriado em dessecador e pesado periodicamente até peso constante. Essa metodologia foi realizada para todas as amostras de meios em fermentação. A massa celular seca foi calculada pela diferença de massa do tubo com biomassa seca e do tubo vazio.

4.5.3 Determinação da Concentração de Microrganismo

Para a realização dessa análise, utilizou-se 1 mL do meio em fermentação, deste volume retirou-se uma alíquota para a contagem das células por visualização em microscópio através da câmara de Neubauer. No final do processo de fermentação procedeu-se da mesma forma, porém, como havia uma quantidade de microrganismos nos meios superior á que possibilita a contagem, realizou-se a diluição do caldo, na proporção 1:30, em água destilada e, procedeu-se a contagem. Os cálculos para a determinação da concentração de microrganismos se deu pela seguinte formula:

$$n^{\circ} \text{ total de células} = \frac{n^{\circ} \text{ total de células/mL}}{n^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} * \text{fator de diluição} * 10.000$$

4.5.4 Determinação de açúcares redutores – Metodologia DNS

Para a construção da curva de calibração de AR, foi empregada a metodologia de DNS (MALDONE, CARVALHO & FERREIRA, 2013), onde preparou-se o reagente DNS (ácido dinitrosalicílico), solução de tartarato duplo de sódio e potássio e solução padrão de glicose a 1,0 g/L. A partir da solução padrão de glicose foram preparadas 10 soluções diluídas com concentrações conhecidas. Após o preparo das soluções, 1 mL de cada solução foi adicionada em um tubo de ensaio, em seguida, se adicionou 1 mL do reagente de DNS. Os tubos foram agitados e aquecidos em banho-maria a 100 °C (em ebulição) por 5 minutos. Os tubos foram resfriados em banho com gelo por 5 minutos; então se adicionou 16 mL da solução de tartarato duplo de sódio e potássio, homogeneizou-se e então foi realizada a análise destes por absorvância em UV-VIS a 540 nm. O branco consistiu em substituir o volume de solução de glicose por água.

Com as leituras de absorvância para as dez concentrações preparadas, foi construída uma curva de calibração de concentração de AR por absorvância, obtendo-se uma correlação linear. Foi gerada uma equação da reta utilizada para a determinação da concentração de açúcar redutor no caldo de farinha de mandioca de varredura hidrolisada antes e após a fermentação. Para tanto, foi utilizado o sobrenadante da amostra utilizada na determinação de biomassa. Foi adicionado em um tubo de ensaio 1 mL do sobrenadante e adicionado o reagente DNS, então o tubo foi agitado e aquecido em banho-maria a 100°C (em ebulição) por 5 minutos; resfriado em banho com gelo por 5 minutos, e adicionado 16 mL da solução de tartarato duplo de sódio e potássio homogeneizado e então realizou-se a análise por absorvância em espectrofotômetro UV-VIS a 540 nm. O branco consistiu em substituir o volume de amostra por água. Com o valor da absorvância obtido para a amostra e a curva de calibração foi possível determinar a quantidade de AR no caldo fermentado.

4.6 Extração dos carotenoides

As metodologias de extração utilizada neste estudo são baseadas em Oliveira (2010).

Ao final da fermentação dos caldos, foi realizada a extração dos carotenoides empregando 2 metodologias afim de se verificar a mais eficiente.

- ❖ Extração com acetona e éter de petróleo: Foram centrifugados 20 mL de cada meio fermentado, por 30 minutos a 6000 rpm à 10 °C em centrífuga refrigerada (Marca: Nova técnica. Modelo: NT 825), afim de concentrar as células do fermentado. O sobrenadante foi descartado e adicionados 10 mL de água destilada, agitado em vortex (Marca: Biomixer. Modelo: QL-901) e centrifugado novamente por 30 minutos, descartando novamente o sobrenadante. Finalmente foi adicionado ao precipitado 10 mL do solvente na razão 1:1 (v/v) acetona/éter de petróleo agitado em vortex por

1 minuto e centrifugado por 30 minutos. Os sobrenadantes foram armazenados em tubos de ensaio com tampa para a determinação de carotenoides. Esse processo se repetiu por mais duas vezes, para que houvesse uma maior eficiência da extração, e até que a biomassa alcançasse coloração clara, indicando que os carotenoides haviam sido extraídos.

- ❖ Extração com acetona e éter de petróleo e ultrassom (Marca: Cristófoli. Modelo: Ultron2): Ocorreu da mesma forma que a extração com acetona e éter de petróleo. A diferença entre os dois métodos, foi que após adicionado o solvente na biomassa e agitado em “vortex”, este permaneceu em banho ultrassom por 15 minutos, com o objetivo de melhorar a extração dos carotenoides.

Após os processos de extração as amostras foram submetidas a análise em espectrofotômetro UV- VIS (Marca: OceanOptics. Modelo: USB 650) à 450 nm para a quantificação de carotenoides produzidos e extraídos. A concentração de carotenoides totais foi calculada através da Lei de Lambert Beer, utilizando a seguinte fórmula:

$$CT \left(\frac{\mu g}{100g} \right) = 100 \left(\frac{A * V * 10^4}{E^{1\%}_{1cm} * m} \right)$$

Onde:

A = absorvância a 450 nm

V = volume final da amostra (mL)

m = massa da amostra (g)

$E^{1\%}_{1cm}$ = coeficiente de extinção molar do betacaroteno em éter de petróleo

= 2592 (CARVALHO, 2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para a determinação de açúcares redutores (AR) no meio de fermentação inicial e final foi necessário construir uma curva de calibração conforme descrito no item 4.5.4. Como resultado deste procedimento obteve-se a curva de calibração e equação apresentadas na Figura 8. Analisando a Figura 8 é possível perceber uma correlação linear entre as absorvâncias e as concentrações das soluções de glicose padrão preparadas, assim pode-se dizer que a curva pôde ser utilizada para a quantificação de AR nos caldos de fermentação.

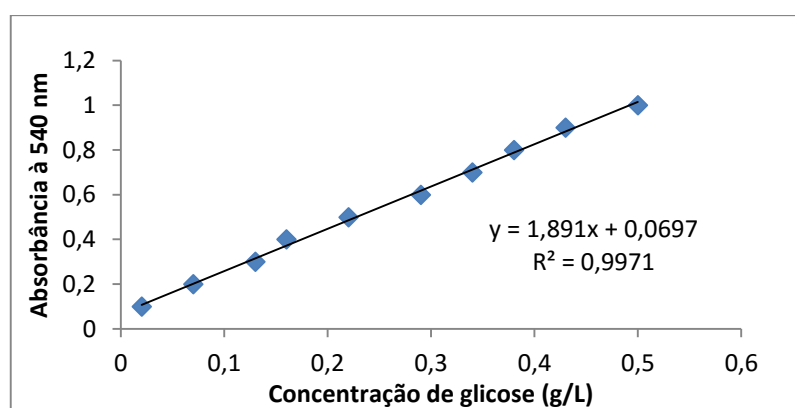


Figura 8. Curva de calibração de Açúcar Redutor.

Os resultados das análises de pH, AR, biomassa e contagem celular realizadas antes e após o processo de fermentação dos meios estão apresentados nos Quadros 1 e 2.

Quadro 1 – Resultado de pH e concentração de AR, no início e no final da fermentação.

Concentração de caldo nos meios	pH Inicial	pH Final	AR Inicial (g/L)	AR Final (g/mL)
12,5%	7,0	4,4±0,15	390,1±12,7	203,7±50,8
25%	7,0	4,4±0,06	450,9± 17,6	294,6±13,2
37,5%	7,0	4,3±0,06	666,3± 148,9	392,8±32,6

Quadro 2 - Resultado de biomassa seca e contagem de células, no início e no final da fermentação.

Concentração de caldo nos meios	Biomassa Inicial (mg/mL)	Biomassa Final (mg/mL)	Células Iniciais (cel/mL)	Células Finais (cel/mL)
12,5%	0,002±0,0006	0,007±0,002	2,17x10 ⁵ ±5,7 x10 ³	3,49x10 ⁷ ±1,2x10 ⁶
25%	0,002±0,0006	0,010±0,002	2,2x10 ⁵ ±15,2 x10 ³	3,42x10 ⁷ ±4,0x10 ⁶
37,5%	0,003	0,013±0,003	2,4x10 ⁵ ±15,2 x10 ³	3,7x10 ⁷ ±3,2x10 ⁶

Em relação ao pH, observou-se que durante o processo de fermentação ocorreu uma diminuição nos valores, para todas as amostras, sem grandes variações entre elas. De acordo Frengova, Simova, Pavlova (1994), mudanças de pH na fermentação são naturalmente ocasionadas através da biossíntese de carotenoides que decresce nas primeiras 72 horas de bioprodução, seguindo de uma elevação durante a fase intensa de carotenogênese.

Embora haja exceções, bactérias usualmente crescem no intervalo de pH de 4 a 8, leveduras de 3 a 6, mofos de 3 a 7 e células superiores na faixa de 6,5 a 7,5. Como uma consequência, o pH pode ser usado para selecionar preferencialmente as leveduras sobre as bactérias e diminuir a susceptibilidade a contaminação bacteriana (RIBEIRO, 2010).

Observando os resultados da quantidade de açúcar redutor nos meios, observa-se que o processo de hidrólise ocorreu de forma eficiente, comparando por exemplo ao trabalho de Barbato (2014), que utilizou como substrato o melaço de caldo-de-cana e obteve valores iniciais de AR em torno de 200 mg/mL, utilizados para o processo de fermentação.

Ainda de acordo com os resultados, verifica-se uma queda nos valores de AR, uma vez que este foi utilizado pelas leveduras durante o processo de fermentação, como fonte de alimentação, demonstrando que as leveduras se adaptaram ao substrato de forma positiva. A concentração de açúcar redutor nos meios diminuiu respectivamente em relação a quantidade inicial presente nos mesmos.

De acordo com o Quadro 2, pode se observar um aumento na quantidade de biomassa no final do processo, sendo que, os meios com concentração de 37,5% obtiveram valores pouco mais elevados para biomassa, porém, sem grandes diferenças na contagem final de células, com relação aos demais meios.

Com relação a concentração de microrganismos nos meios, observou-se uma elevação na quantidade de leveduras no final do processo de fermentação, sugerindo uma boa adaptação dessas aos meios.

5.1 Extração dos carotenoides

Após o processo fermentativo foi possível observar a mudança de cor nos meios que se apresentaram mais alaranjados conforme mostra a Figura 9, comparando com os meios iniciais que possuíam coloração mais clara, sugerindo a síntese dos carotenoides.



Figura 9. Meios de cultivo após 120 horas de fermentação.

Foram avaliados meios de cultivo com diferentes concentrações de AR, quanto a produção de carotenoides por *Rhodotorula glutinis*. De acordo com Figura 10, pode se observar que não houve diferença significativa com relação a coloração das biomassas concentradas por centrifugação no final do processo de fermentação.

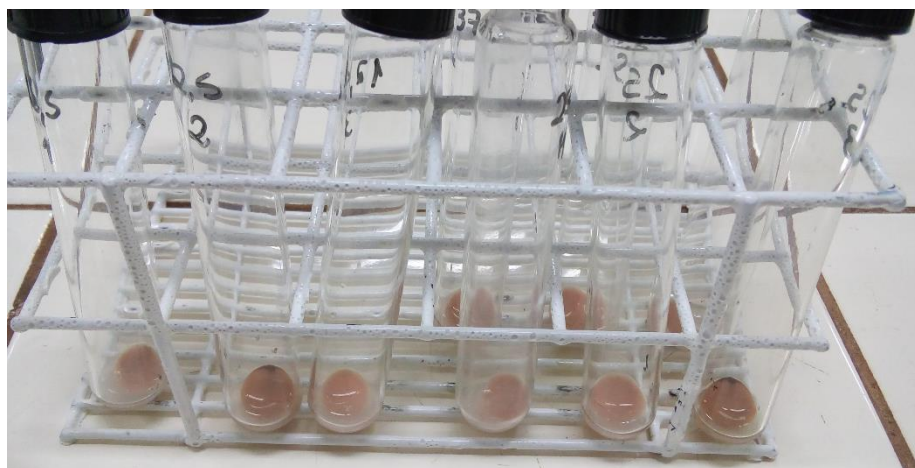


Figura 10. Biomassa concentrada por centrifugação antes do processo de extração, nas concentrações 12,5%, 25% e 37,5% respectivamente (em triplicata), de caldo de farinha de mandioca hidrolisada.

Durante a extração foi possível observar que o solvente adquiria levemente a coloração correspondente aos carotenoides, sugerindo a presença do componente no meio. Após 3 ciclos de extração tanto com acetona/éter de petróleo, quanto com acetona/éter de petróleo associados ao ultrassom, a biomassa final não se apresentou totalmente descolorida, como pode ser observado pelas Figuras 11 e 12, sugerindo que os solventes e o ultrassom não conseguiram agir nas paredes celulares, rompendo-as e liberando totalmente os carotenoides.

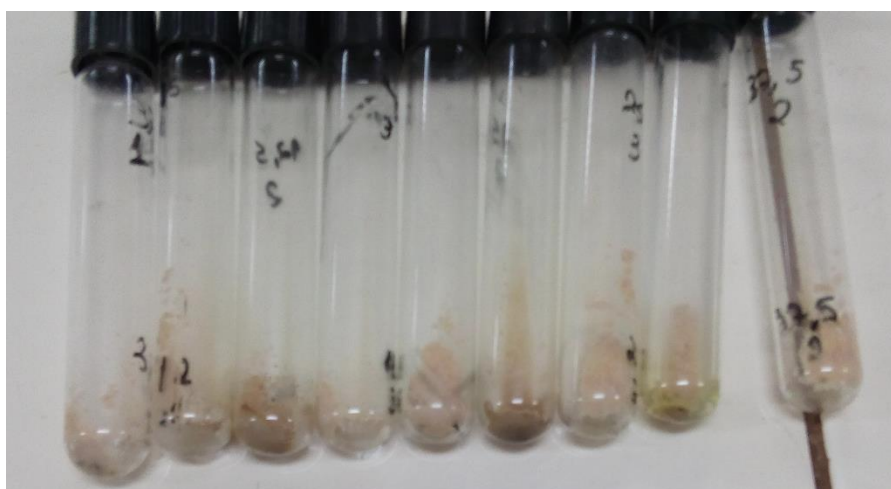


Figura 11. Biomassa depois do processo de extração com acetona/ éter de petróleo, em triplicata nas concentrações 12,5%, 25% e 37,5% de farinha de mandioca hidrolisada respectivamente.

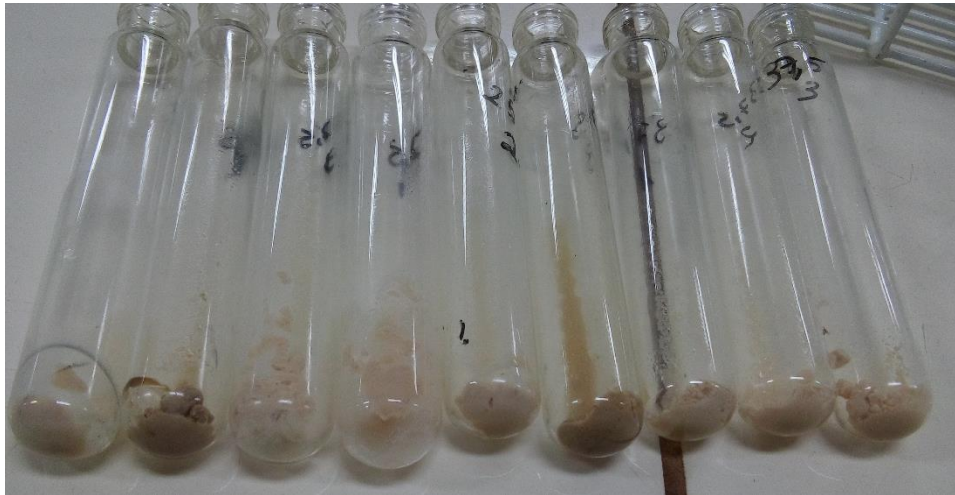


Figura 12. Biomassa depois do processo de extração com acetona/ éter de petróleo associados ao ultrassom, em triplicata nas concentrações 12,5%, 25% e 37,5% respectivamente.

Dessa forma, pode-se sugerir que seria necessário um tempo maior de fermentação, pois pode não ter havido tempo suficiente para a produção dos carotenoides, uma vez, que restou ainda uma quantidade grande de açúcar nos meios ao final do processo, e ainda que talvez fosse necessário maior tempo de contato das células com o solvente.

Ainda, segundo Costa (1992), as leveduras do gênero *Rhodotorula* são microrganismos estritamente aeróbios. Isso faz com seja necessário um processo de aeração durante a fermentação, processo esse que não foi realizado, podendo dessa forma, ter sido prejudicado o crescimento das leveduras e a formação do corante.

Os sobrenadantes obtidos da extração com os carotenoides, através do cultivo submerso de *Rhodotorula glutinis*, foram submetidos a análise em espectrofotômetro UV- VIS, à 450 nm para a quantificação dos carotenoides. Sendo a quantificação realizada através da equação de Lambert Beer apresentada do item 4.6.

O Quadro 3 apresenta os resultados da quantificação realizada.

Quadro 3. Resultado do cálculo de concentração de carotenoides utilizando acetona/éter de petróleo e acetona/éter de petróleo com o ultrassom.

Concentração de caldo nos meios	Concentração de carotenoides ($\mu\text{g/mL}$)	
	Extração acetona/éter de petróleo	Extração acetona/éter de petróleo com o ultrassom
12,5%	158.705,1 \pm 43.409,4	195.275,9 \pm 40.804,2
25%	167.716,6 \pm 42.722,2	208.976,3 \pm 20.077,8
37,5%	269.525,9 \pm 122.258,9	440.297,1 \pm 92.596,4

De acordo com os resultados obtidos através dos métodos de extração expressos no Quadro 3, pode-se observar que no processo de extração com acetona/éter de petróleo 1:1 (v/v), os meios com concentrações 37,5% foram os que apresentaram maior quantidade de carotenoides. O mesmo ocorreu no processo de extração com ultrassom.

Andrade (2010), cita que elevadas concentrações de glicose induzem à limitação do crescimento das leveduras pelo substrato. Visto que, meios com grandes concentrações de açúcar podem fazer com que haja menor desenvolvimento da levedura, por estresse osmótico. Com base nessa explicação, pode-se supor que, a concentração de AR presente nos meios contendo 37,5% de caldo de farinha de mandioca de varredura hidrolisada era ideal para o desenvolvimento da levedura, comparada com as demais concentrações, já que, favoreceu a produção de carotenoides.

Avaliando o estudo de Monks *et al.* (2013), verifica-se que os mesmos utilizaram a levedura *S. salmonicolor* para a produção de carotenoides e empregaram o método de ultrassom (4 ciclos de 10 min a 40 kHz em 4 °C), desse modo, obtiveram resultados de cerca de 6,072 $\mu\text{g/g}$ de carotenoides e ao combinar o método de ultrassom adicionando bicarbonato de sódio, a recuperação foi de cerca de 11,396 $\mu\text{g/g}$ de carotenoides específicos. Esses resultados são inferiores aos do presente estudo. Urnal (2014), explica que esta diferença pode estar relacionada a composição da parede celular das diferentes leveduras, uma vez, que os pigmentos se encontram nas mesmas de forma intracelular.

Barbato (2014), utilizou para a obtenção de carotenoides o processo de fermentação em melaço e caldo de cana-de-açúcar como meio de cultivo e a levedura *Rhodotorula* sp como biocatalisador do processo e realizou a extração

com solvente e banho de ultrassom por 20 minutos. A autora obteve resultados de cerca de 2,03 µg/mL de carotenoides. Resultados também inferiores aos apresentados neste estudo, porém empregou uma técnica analítica diferente para a quantificação.

Dessa forma, analisando o Quadro 3, observa-se que a técnica de extração com o auxílio do ultrassom tornou o processo de extração mais eficiente. Oliveira (2010) também testou uma técnica de extração com acetona acoplada ao ultrassom, e notou que obteve uma melhor extração do que com a extração utilizando somente solventes. Segundo Oliveira (2010), o ultrassom age nas paredes das células, afim de ajudar no rompimento das mesmas, aumentando a concentração de betacaroteno e com isso aumentando o rendimento.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados experimentais obtidos nesta pesquisa foi possível concluir que a farinha de varredura hidrolisada demonstrou ser um substrato adequado para o processo fermentativo, já que foi possível identificar um bom crescimento das leveduras no período de tempo do processo, 120 horas, apesar de não ter havido diferença na concentração de leveduras em função da concentração de AR.

É possível concluir ainda que a alta concentração de AR, influencia de maneira positiva o crescimento dos microrganismos e, portanto, diretamente proporcional a quantidade de carotenoides produzido; visto que, observou-se maior quantidade de carotenoides no meio contendo maior concentração de AR.

Além disso, conclui-se também que o ultrassom foi capaz de aumentar a eficiência do processo de extração dos carotenoides.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, K., MUKHERJEE, A., CHAKRABARTI, J. In vivo cytogenetic studies on mice exposed to natural food colourings. **Food and Chemical Toxicology**. Oxford, v. 32, n. 9, p. 837-838, 1994.

ALALUF, S.; HEINRICH, U.; STAHL, W.; Tronnier, H.; Wiseman, S. Dietary carotenoids contribute to normal human skin color and UV photosensitivity. **J Nutr**. 132:399-403. 2002.

AKSU, Z.; EREN, A. T. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, p. 107-113. 2007.

AMBROSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, Z. P. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, v. 19, p. 233-243. 2006.

ANDRADE, R. C. R.; Estudo do desenvolvimento e da produtividade lipídica da levedura *Rhodotorula glutinis* NCYC 921 em culturas descontínuas monitorizadas por citometria de fluxo. 2010. **Dissertação – Mestrado em Biotecnologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia Universidade Nova de Lisboa**. Monte de Caparica, 2010.

ANTUNES, L. M. G.; ARAÚJO, M. C. P. Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 13, n. 2, p. 81-88, maio/ ago. 2000.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n. 44, de 1 de fevereiro de 1977**, dispõe sobre as condições gerais de elaboração, classificação, apresentação, designação, composição e fatores essenciais de qualidade dos corantes empregados na produção de alimentos (e bebidas).

Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/44_77.htm>. Acesso em: 10. Ago. 2015.

BARBATO, J. Estudo da obtenção de carotenóides por fermentação empregando a levedura *Rhodotorula* sp em melaço e caldo de cana-de-açúcar como meio de cultura. 2014. 50 f. **Trabalho de conclusão de curso (graduação) – Curso de Tecnologia de Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.** Campo Mourão, 2014.

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; RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. **Physiologia Plantarum**, v. 126, p. 369-381, 2006.

BRANCO, L. S. C.; Estudo da ampliação de escala na produção de biomassa de *Rhodotorula* sp. CNPAT02 em processo batelada para obtenção de carotenóides. 2010. 76 f. **Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, 2010.

CALDAS NETO, S. F.; ZEOULA, L. M.; BRANCO, A. F.; PRADO, I. N.; SANTOS, G. T.; FREGADOLLI, F. L.; KASSIES, M. P.; DALPONTE, A. O. Mandioca e Resíduos das Farinheiras na Alimentação de Ruminantes: Digestibilidade Total e Parcial. **Revista brasileira de zootecnia**, v. 29, n. 6, 2000.

CARVALHO, P. G. B. **Caracterização de abóboras quanto aos teores carotenóides totais alfa e betacaroteno.** Embrapa Hortaliças. Brasília, 2011.

CASADEI, M. E. Processos fermentativos a partir da cana-de-açúcar. 2012. 38 f. **Trabalho de conclusão de curso (Graduação) - Curso Superior de Tecnologia em Biotecnologia, Faculdade de Tecnologia de Araçatuba.** Araçatuba, 2012.

CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F. **Tecnologias, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, v. 3, 711 p., 2003.

COSTA, I. Produção de β -caroteno por uma espécie do gênero *Rhodotorula*. 1992. 60 f. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Bioquímica) - Faculdade de Química**, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ, 1992.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry - A review. **Journal of Food Engineering**. v. 76, p. 291-302, 2005.

FRENGOVA, G.; SIMOVA, E.; PAVLOVA, K. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 888-894, 1994.

IAL, Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ISHIDA, B. K.; CHAPMAN, M. H. Carotenoid Extraction from Plants Using a Novel, Environmentally Friendly Solvent. **J Agric Food Chem**. 2009; 12 *in press*.

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.

LIBIKIND, D.; BROCK, M. V. Biomass and carotenoid pigment production by Patagonian native yeasts. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p. 687-692, 2006.

MALDONDE, I. R.; CARVALHO, P. G. B.; FERREIRA, N. A. **Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS**. Comunicado Técnico. 2013. Ministério da Agricultura e abastecimento. Embrapa 2013.

MALISORN, C.; SUNTORNSUK, W. Improved β -carotene production of *Rhodotorula glutinis* in fermented radish brine by continuous cultivation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, p. 27-32, 2008.

MONKS, L. M.; RIGO, A.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, J. V.; VALDUGA, E. Use of chemical, enzymatic and ultrasound-assisted methods for cell disruption to obtain carotenoids. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 165-169, 2013.

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. Campinas, 2003.

OLIVEIR, J; PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. **Journal of Chromatographic A**, v. 881, p. 543 – 555, 2000.

OLIVEIRA C. G.; Extração e caracterização do betacaroteno produzido por *Rhodotorula glutinis* tendo como substrato o suco de caju. 2010. 32 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – **Curso superior de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará**. Fortaleza, 2010.

PANDEY, A., SOCCOL, C. R., MITCHEL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocess and products. **Process Biochemistry**, v. 35: p. 1153-1169, 2000.

PRADO, M. A.; GODOY, H. T.; Corantes artificiais em alimentos. Departamento de Ciência de Alimentos. **Revista Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 14, n. 2, p. 237-250, 2003.

REVISTA ADITIVOS & INGREDIENTES. Os Corantes Alimentícios. **Revista Aditivos & Ingredientes**. Editora Insumos, n. 62. 2009. Disponível em:

<http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/edicoes_materias.php?id_edicao=39>. Acesso em: 07. Ago. 2015.

REVISTA ADITIVOS & INGREDIENTES. Corantes Naturais. **Revista Aditivos & Ingredientes**. Editora Insumos, n. 75, 2011. Disponível em: <http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/247.pdf>. Acesso em: 16. Set. 2015.

RIBEIRO, B. D.; Aplicação de tecnologia enzimática na obtenção de β -caroteno a partir de óleo de buriti (*Mauritia vinifera*). 2008. 119 f. **Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, 2008.

RIBEIRO. F. A. M. **Fermentação Alcoólica**. Apostila do Modulo II - Processamento na indústria sucroalcooleira da FAZU. Uberaba, 2010.

SANTOS, J. R. Utilização de glicerol como fonte de carbono para obtenção de carotenóides de *Rhodotorula glutinis*. 2010. 47 f. **Trabalho de conclusão de curso (Graduação) - Curso superior de Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará**. Fortaleza, 2010.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. **Biorreatores e Processos Fermentativos**. Biotecnologia Industrial; Engenharia Bioquímica. São Paulo; p. 179-192. v. 2, 2001.

SILVA, M. C. Alterações na biossíntese de carotenóides em leveduras induzidas por agentes químicos. 2004. 105 f. **Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas**, 2004.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Ascts of Medicine**. Elmsford, v. 24, n. 6, p. 345-351, 2003.

TATSCH, P.O.; Produção de carotenóides em meio sintético por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em biorreator. 2008. 94 f. **Dissertação (Mestrado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI**, Erechim, 2008.

TINOI, J.; RAKARIYATHAM, N.; DEMING, R. L. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2551 – 2557, 2005.

UENOJO, M.; MARÓSTICA, M. R. JR.; PASTORE, G. M. Carotenoides: Propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Revista Química Nova**. V. 30, n. 3, p. 616-622, 2007.

URNAL, L. Produção e recuperação de carotenoides de *Xanthophyllomyces dendrorhous* Y-10921. 2014. 65 f. **Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)** - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. Erechim, 2014.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMAN, L.; TREICHEL, H.; TONIOZZO, G.; ZENI, J.; DILUCIO, M. Produção de carotenoides: Microrganismos com fonte de pigmentos naturais. **Revista Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2429-2436. 2009.

WANG, S. L.; SUN, J. S.; HAN, B. Z.; WU, X. Z. Enhanced β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* using high hydrostatic pressure. **Korean J. Chem. Eng.** v. 25, p. 513-516, 2008.