RECUPERAÇÃO DE CAROTENOIDES MICROBIANOS ASSISTIDO POR ONDAS ULTRASSÔNICAS

MICHELLE BARBOZA NOGUEIRA[1], CAROLINE FURTADO PRESTES[2], JANAINA FERNANDES DE MEDEIROS BURKERT[3]

RESUMO

Phaffia rhodozyma é uma levedura carotenogênica capaz de produzir intracelularmente pigmentos naturais a partir de cultivos microbianos. Neste estudo foi avaliada a cinética de produção de carotenoides em cultivos submersos, bem como sua recuperação através de ruptura celular assistidas por ondas ultrassônicas, promovendo alterações nas relações biomassa:solvente utilizadas. A maior concentração de biomassa e produção dos compostos de interesse foi observada em torno de 168 h de cultivo, cujo extrato carotenogênico apresenta a astaxantina como carotenoide majoritário. Um incremento de 2,35 vezes na recuperação dos carotenoides foi obtido na relação biomassa:solvente 0,0167 g mL^{-1}, como a mais adequada para determinações analíticas e 0,042 g mL^{-1} para ser usada visando menor gasto energético no processo.

PALAVRAS- CHAVES: ASTAXANTINA; CULTIVOS MICROBIANOS; PIGMENTOS; RUPTURA MECÂNICA.

RECOVERY OF MICROBIAL CAROTENOIDS ASSISTED BY ULTRASONIC WAVES

ABSTRACT

Phaffia rhodozyma is a carotenogenic yeast capable of producing intracellularly natural pigments from microbial cultures. This study evaluated the kinetics of carotenoid production in submerged cultures, as well as its recovery through ultrasonic wave assisted cell rupture, promoting changes in biomass: solvent ratios used. The highest concentration of biomass and production of the interest compounds were observed around 168 h of culture, whose carotenogenic extract presents astaxanthin as the major carotenoid. A 2.35-fold increase in carotenoid recovery was obtained in the biomass: solvent ratio 0.0167 g mL^{-1}, as a solution for analytical determinations and 0.042 g mL^{-1} to be used for lower energy expenditure in the process.

KEY WORDS: ASTAXANTHIN; MICROBIAL CULTURES; PIGMENTS; MECHANICAL DISRUPTION.

1. INTRODUÇÃO

[1]Discente – Universidade Federal do Rio Grande (FURG)/EQA/PPG-ECA – e-mail: mimibnogueira@gmail.com
[2]Discente – Universidade Federal do Rio Grande (FURG)/EQA/PPG-ECA – e-mail: carolinepresteseng@hotmail.com
[3]Docente – Universidade Federal do Rio Grande (FURG)/EQA/PPG-ECA – e-mail: jfmb@vetorial.net

Carotenoides são pigmentos naturais que podem estar presentes em vegetais, animais e micro-organismos, e conferem cores que variam do amarelo ao vermelho [10]. Apresentam em sua estrutura ligações duplas conjugadas responsáveis por sua ação antioxidante, devido a sua capacidade de receber elétrons de espécies reativas, neutralizando radicais livres [9], e alguns deles são capazes de serem convertidos em vitamina A, desempenhando importante papel nutricional [9,21].

Grande parte da produção destes compostos, visando atender à demanda de indústrias de alimentos, tanto destinadas ao homem quanto a animais, para a aplicação em seus produtos, é obtida sinteticamente por processos químicos [23]. No entanto, existe um interesse crescente em carotenoides obtidos naturalmente por processos biotecnológicos, diante da preocupação quanto ao uso de aditivos químicos em alimentos [24], destacando-se a levedura *Phaffia rhodozyma* certificada como GRAS (*Generally Recognized as Safe*), capaz de produzir intracelularmente carotenoides naturais por cultivos microbianos [15,22].

A maioria dos estudos relacionados à obtenção de extratos carotenogênicos provenientes de cultivos da *P. rhodozyma* realizam ruptura celular química, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO), por ser o método de maior extratibilidade, porém sua elevada toxicidade impede que os compostos de interesse sejam aplicados em alimentos [5,19,22]. Desta maneira, a técnica mecânica de ruptura celular através da ação de ondas ultrassônicas, embora promova menor recuperação dos compostos de interesse [13,15] possibilita a aplicação dos extratos em produtos alimentícios.

O presente trabalho objetiva produzir carotenoides empregando cultivo da levedura *P. rhodozyma*, estudando sua cinética de produção e o incremento na recuperação dos compostos de interesse utilizando a técnica de ruptura celular assistida por ondas ultrassônicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo e preparo do inóculo

A levedura *Phaffia rhodozyma* NRRL-Y 17268, proveniente do Northern Regional Research Laboratory (Peoria, IL, USA) e certificada como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) foi utilizada neste estudo. O micro-organismo foi mantido em ágar inclinado em meio extrato de malte e levedura (YM) com (g L^{-1}): 3 de extrato de levedura, 3 de extrato de malte, 5 de peptona, 10 de glicose, adicionados de 0,2 g L^{-1} de KNO_3 a 4ºC [17]. Para a reativação, a partir das culturas estoques foram realizados

repiques para tubos de ensaio com o mesmo meio e incubados por 48 h a 25ºC. Após foi realizada uma ressuspensão celular em 1 mL de água peptonada (0,1%) e adicionada em 9 mL de meio YM, sendo incubados nas mesmas condições descritas anteriormente.

O inóculo utilizado na produção dos pigmentos foi realizado em erlenmeyers de 500 mL contendo 90 mL do caldo YM, e adicionado de 10 mL do cultivo oriundo da reativação, sendo incubado a 25°C, 150 rpm por 48 h ou tempo necessário para atingir $1x10^8$ cél.mL^{-1}, contadas através de câmara de Neubauer [19].

2.2 Produção dos carotenoides

A bioprodução de carotenoides foi realizada em erlenmeyers de 500 mL com 153 mL do meio de produção YM a pH inicial de 6,0, acrescidos de 10% de inóculo (10^8 cél.mL^{-1}), sendo as condições operacionais do processo 25ºC, 180 rpm por 168 h [19].

Alíquotas de 8 mL dos cultivos foram retiradas a cada 24 h, submetidas à centrifugação (1745 × *g*) por 10 min, o sobrenadante foi separado para determinação de pH [2], e o precipitado lavado com água destilada e ressuspendido em balão volumétrico para que a concentração celular fosse estimada, por leitura da absorvância a 620 nm, através de uma curva padrão de biomassa previamente construída [12].

A produção de carotenoides ao longo do cultivo foi acompanhada através da recuperação dos pigmentos com ruptura celular química usando dimetilsulfóxido (DMSO) [7], e após 168 h de cultivo foi utilizado o método de ruptura celular mecânica assistida por ondas ultrassônicas [14].

As biomassas obtidas ao final do cultivo (168 h) foram secas em estufa a 35ºC por 48 h, após, foram maceradas em gral e pistilo e os tamanhos das partículas foram padronizados através de peneira de Tyler 115, onde a fração passante corresponde ao tamanho de partícula inferior a 125 mm [4].

2.3 Extração e recuperação dos carotenoides

A ruptura celular química, utilizou 0,05 g de biomassa seca (48 h a 35ºC) e congelada (-18ºC por 48 h), com 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) previamente aquecido a 55ºC, homogeneizadas em vórtex com intervalos de 15 min, durante 1 h [7]. A recuperação dos pigmentos pela técnica de ondas ultrassônicas foi realizada aplicando 4 ciclos ultrassônicos de 40 kHz por 10 min, sendo a água do banho trocada

a cada ciclo [14], e avaliadas diferentes relações biomassa:solvente (0,005 a 0,083 g mL^{-1}).

Após a ruptura foram adicionados 6 mL de acetona para facilitar a extração dos carotenoides. A amostra foi centrifugada a 1745 × *g* por 10 min, o solvente foi separado e o procedimento de ruptura foi repetido até o branqueamento total da célula. Nas fases solventes, obtidas da centrifugação, foram adicionados 10 mL de solução de NaCl 20% (p/v) e 10 mL de éter de petróleo. Após agitação e separação de fases o excesso de água foi retirado com sulfato de sódio (Na_2SO_4), dando origem aos extratos carotenogênicos [15]. A determinação da concentração de carotenoides totais nos extratos foi realizada em espectrofotômetro (BIOSPECTRO SP-220) a 474 nm [20] e os valores da quantificação obtidos pela Equação 1, utilizando o coeficiente de absortividade específica para astaxantina em éter de petróleo [5,15,22].

$$CT = \frac{A * V * 10^6}{A_{1cm}^{1\%} * 100 * m_{amostra}} \quad (1)$$

onde: CT = concentração de carotenoides totais ($\mu g.g^{-1}$); A = absorvância; V = volume (mL); $m_{amostra}$ = massa celular seca (g); $A_{1cm}^{1\%}$ =absortividade específica.

2.4 Determinação do perfil carotenogênico do extrato

Com a aplicação da ruptura celular utilizando ondas ultrassônicas na biomassa oriunda do término do cultivo (168 h), foram obtidos os extratos carotenogênicos os quais foram identificados e quantificados [5], utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Shimadzu (Quioto, Japão) constituído por um sistema de bombas LC-20AT, desgaseificador DGU 20A5, controlador CBM-20A, injetor automático com alça de 20 µL e sistema de detecção espectrofotométrico SPD-20A em 450 nm. O controle do equipamento e aquisição dos dados foi feito pelo software LC Solution. As determinações foram realizadas utilizando-se uma coluna cromatográfica Fase Reversa Discovery Bio Wide Pore C8, 10 µm (25 cm x 4,6 mm), mantida a temperatura ambiente. Utilizando fase móvel acetonitrila:metanol:acetato de etila (70:30:0 v/v) no modo gradiente, com fluxo de 1 mL min^{-1}, e tempo total de corrida de 17 min. A quantificação foi realizada através das curvas: y= 127978,4x-32563,73 (astaxantina) e y= 287419,9x-17246,59 (luteína) [5].

2.5 Estabilidade da biomassa

A estabilidade da biomassa para recuperação dos carotenoides foi avaliada por 28 dias sob refrigeração (4°C) e a temperatura ambiente (25°C), utilizando a ruptura celular com DMSO.

Todas as determinações realizadas neste estudo foram realizadas em triplicata e os dados foram analisados estatisticamente através de análise de variância seguido de teste de médias adequado para caso, com nível de 0,05% de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Acompanhamento da produção de carotenoides

A partir do cultivo para produção de carotenoides foi possível observar (Figura 1) a queda do pH nas primeiras 96 h, diminuindo de 6 para 5,1; seguido de um aumento a partir das 120 h, para 7,2, sendo crescente até as 240 h, com pH final de 8,6. Tal comportamento pode ser explicado pelo fato de que esta levedura excreta naturalmente intermediários de metabolismo durante o seu crescimento (ácido acético, álcool ou um intermediário do ciclo do ácido cítrico), acarretando na queda inicial do pH e, posteriormente, é reassimilado estimulando uma intensa carotenogênese, que resultará no aumento do pH [3].

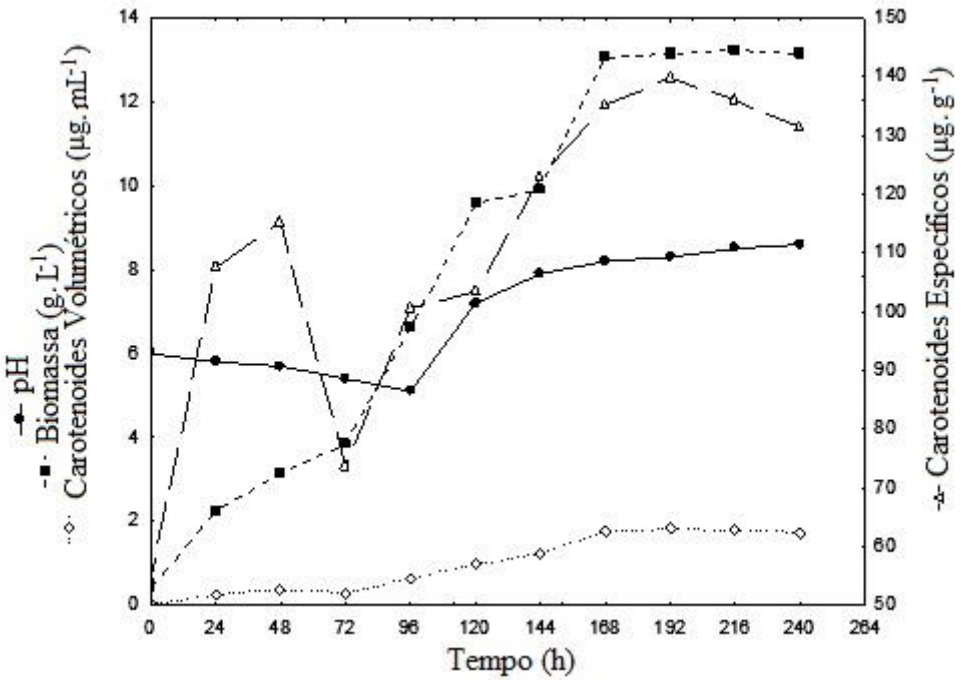

FIGURA 1. Variação do pH, da biomassa, produção específica e volumétrica de carotenoides totais, a 25ºC, 150 rpm e pH inicial do meio YM 6,0 ao longo de 10 dias (240 h) de cultivo.

A concentração máxima da biomassa (13,21 g L^{-1}) ocorreu em 216 h, apresentando concentrações muito próximas entre os tempos 168 h e 240 h, observando-se um leve declínio no último tempo analisado, o que pode indicar que o crescimento celular está na fase estacionária ou iniciando a fase de declínio. As máximas produções de carotenoides foram observadas em 168 h (135,2 µg g^{-1} e 1,82 µg mL^{-1}) e 192 h (139,8 µg g^{-1} e 1,84 µg mL^{-1}) com um pequeno incremento de 3,4% e 1,1% na produção específica e volumétrica, respectivamente.

O acompanhamento cinético pelo período de mais 72 h de processo neste trabalho comparado a literatura [5,7,15,19,22] permitiu concluir que a maior produção dos compostos de interesse ocorre entre 168 e 192 h, com produtividade de 0,8048 µg g^{-1} h^{-1} e 0,0110 µg mL^{-1} h^{-1} em 168 h, e de 0,7281 µg g^{-1} h^{-1} e 0,0096 µg mL^{-1} h^{-1} em 192 h, demonstrando que não foi verificado ganho de produção significativo após este tempo. Portanto, em função da maior produtividade, foi fixado o tempo de cultivo em 168 h para produção dos carotenoides, nestas condições de processo (25ºC, 150 rpm, em meio YM com pH inicial 6,0) para esta cepa de levedura.

3.2 Perfil carotenogênico do extrato

O cromatograma obtido neste estudo (Figura 2) permitiu observar a presença de astaxantina e luteína no extrato nas condições descritas (item 2.4). A astaxantina foi identificada como composto majoritário, representando em média 53,4% ± 0,9 do total de carotenoides, com coeficiente de variação de 1,6%, indicando baixa dispersão e dados homogêneos.

Um percentual significativamente inferior foi observado para luteína, representando em média 12,9% ± 1,9, com coeficiente de variação de 14,3%, e ainda uma quantidade significativa de outros carotenoides não identificados correspondentes a 33,7% ± 0,6, com coeficiente de variação de 1,7%, indicando que tanto para luteína quanto para os demais carotenoides não identificados observam-se dados homogêneos e de baixa dispersão. Tais resultados mostram-se de acordo com estudos que afirmam que a maior parte dos carotenoides da biomassa da *P. rhodozyma* corresponde à astaxantina, dependendo da cepa utilizada e das condições de cultivo [20]. Um perfil semelhante já foi identificado em análises da composição dos carotenoides produzidos pela levedura *P. rhodozyma* ATCC 24202, sendo a astaxantina correspondente a 62,7% do total de carotenoides, seguida pelo β-caroteno (11,7%), e a equinona 5,7% [8]. Na cepa de *P. rhodozyma* 67-385 também foram verificados os percentuais desses mesmos carotenoides como 52% de astaxantina,

6,7% de β-caroteno e 1,1% de equinona [1]. Diante destes resultados, adotou-se o comprimento de onda de 474 nm para as leituras espectrofométricas realizadas nesta pesquisa, correspondente ao composto majoritário do extrato.

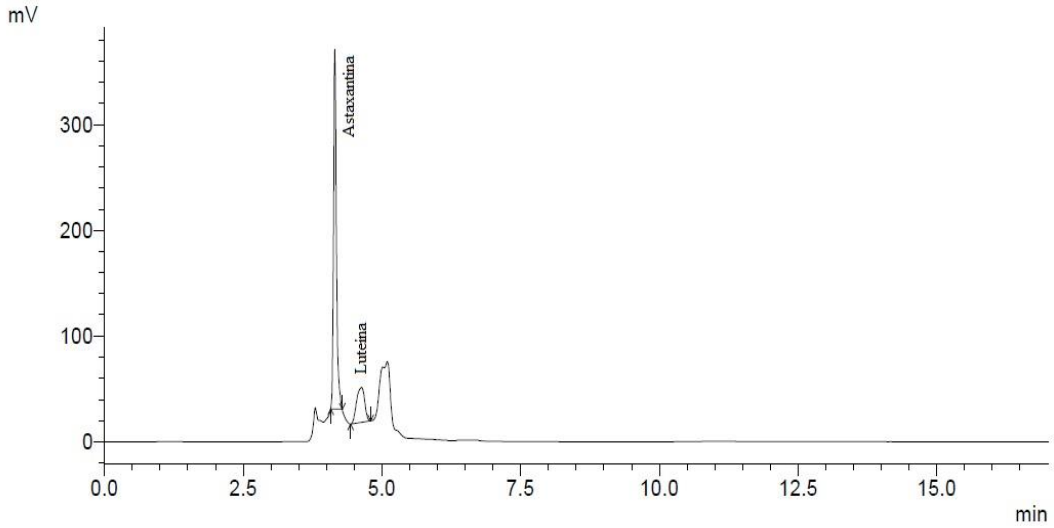

FIGURA 2. Cromatograma dos carotenoides proveniente de cultivo com *P. rhodozyma* em meio extrato de malte e levedura (YM) após 168 h de cultivo.

A levedura utilizada para este estudo foi previamente selecionada, por apresentar certificação GRAS e produzir nas condições de cultivo estabelecidas neste estudo, astaxantina como composto majoritário, carotenoide este que apresenta elevado valor comercial e atividade antioxidante superior a outros carotenoides como zeaxantina, luteína, cantaxantina, e β-caroteno e 100 vezes maior que o α-tocoferol [6].

Nas mesmas condições operacionais deste estudo, utilizando *P. rhodozyma* NRRL-Y 17268, CIPOLATTI et al. [5] avaliou através de cromatografia líquida de alta eficiência o perfil carotenogênico dos extratos obtidos do cultivo desta *P. rhodozyma*, verificando a presença de β-caroteno, luteína e astaxantina, sendo o β-caroteno o composto majoritário apontado no referido estudo, discordando da maior parte dos estudos envolvendo a levedura estudada. De acordo com estes autores, a presença do β-caroteno como composto majoritário ocorreu devido ao fato da condição de microaerofilia utilizada no cultivo da levedura, que acarretou na produção deste carotenoide em maior concentração que a astaxantina. Segundo YAMANE et al. [25] a taxa de produção de astaxantina por *P. rhodozyma* aumenta com a elevação do fornecimento de oxigênio. VALDUGA et al. [24] apontam que micro-organismos

aeróbicos, como *P. rhodozyma*, cujo crescimento (metabolismo primário) é dependente do fornecimento de oxigênio, necessitam de definição das melhores condições de aeração e agitação para aumento de rendimento da produção de astaxantina. Desta maneira, supõe-se que na presente pesquisa ocorreu uma maior disponibilização de oxigênio durante o cultivo da levedura, quando comparado ao estudo realizado por CIPOLATTI et al. [5].

3.3 Estabilidade da biomassa

Objetivando verificar o máximo período e a melhor condição de armazenamento da biomassa, para conseqüente recuperação dos carotenoides, realizou-se o estudo de sua estabilidade. Os resultados expressos na Tabela 1 demonstram que o armazenamento da biomassa a temperatura ambiente promoveu uma recuperação superior ($p<0,05$) dos carotenoides, em todos os tempos de armazenamento avaliados, sugerindo que a refrigeração exerce influência negativa sobre a estabilidade dos compostos de interesse, nas condições deste estudo.

TABELA 1. Estabilidade da biomassa avaliada ao longo do tempo armazenada sob refrigeração (4ºC) e a temperatura ambiente (25ºC).

Carotenoides Específicos (μg g^{-1})		
Tempo (dias)	Refrigeração (4ºC)	Temperatura ambiente (25ºC)
0	135,20 ± 3,02 ^{Aa}	135,20 ± 3,02 ^{Aa}
7	114,30 ± 2,95 ^{Bb}	134,24 ± 2,44 ^{Aa}
14	70,89 ± 3,07 ^{Bc}	104,47 ± 3,37 ^{Ab}
21	28,19 ± 4,90 ^{Bd}	82,68 ± 2,21 ^{Ac}
28	>0,01 ^{Be}	71,20 ± 2,81 ^{Ad}

Letras maiúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa entre as concentrações de carotenoides totais no mesmo tempo, pelo Teste T ($p<0,05$), e letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa entre as concentrações de carotenoides totais ao longo do tempo, pelo Teste de Tukey ($p<0,05$).

Ao longo das semanas ocorreu uma perda significativa da concentração de carotenoides na biomassa, sendo de 22,7% a partir do 14° dia para o armazenamento em temperatura ambiente, atingindo 47,3% de perda no último tempo analisado. O armazenamento sob refrigeração promoveu uma perda mais acelerada de 15,5% a

partir do 7° dia, verificando 100% de degradação dos compostos de interesse ao atingir o 28° dia, em relação ao tempo inicial (0 dia). Portanto, se torna mais conveniente armazenar a biomassa por no máximo um curto período de tempo (7 dias) à temperatura ambiente para não ocorrer perdas significativas dos carotenoides.

De acordo com JOSEPH, RAMTEKE e THOMAS [11] alguns micro-organismos, entre os quais é possível citar as leveduras, são fontes potenciais de enzimas psicrofílicas, que apresentam elevada atividade em temperaturas mais baixas, podendo-se citar lipases e carotenases, envolvidas em reações que afetam diretamente os compostos de interesse deste estudo. Sugere-se que, pelo fato da biomassa da levedura *P. rhodozyma* apresentar menor percentual de retenção de carotenoides quando armazenada sob refrigeração, pode estar relacionada com a presença de lipases e/ou carotenases, que tenham sua atividade acelerada na interface em temperaturas baixas (4°C), fato que serve de justificativa da maior degradação dos pigmentos quando comparada à biomassa armazenada à temperatura de 25°C.

Corroborando ao obtido neste estudo, OLIVEIRA et al. [16], através da quantificação de astaxantina e β-caroteno em amostras de salmão armazenados sob refrigeração (6ºC), demonstraram que a aplicação do frio não representa uma alternativa favorável para a manutenção destes carotenoides, uma vez que com apenas 3 dias de armazenamento foi verificado a perda de 19,83% de astaxantina e aproximadamente 17% de β-caroteno.

3.4 Avaliação de diferentes relações biomassa:solvente no processo de ruptura celular

A recuperação dos carotenoides através de ruptura celular por ondas ultrassônicas, com diferentes relações biomassa:solvente (Tabela 2) entre 0,0167 a 0,042 g mL^{-1} não diferiram estatisticamente entre si ($p>0,05$), representando as maiores recuperações de carotenoides que as demais relações avaliadas.

Para a levedura em estudo foi possível verificar que a relação biomassa:solvente descrita na metodologia (0,083 g mL^{-1}) por MEDEIROS et al. [14] não foi adequada para este processo, resultando em baixa recuperação do composto de interesse.

Tais resultados indicam a importância que a relação biomassa:solvente exerce na recuperação de carotenoides de *P. Rhodozyma*, sendo necessária sua utilização

dentro da faixa de 0,0167 g mL^{-1} a 0,042 g mL^{-1}. Nota-se que através desta alteração é possível recuperar mais que o dobro da concentração de carotenoides, aumentando em até 2,35 vezes a concentração obtida pela relação sugerida inicialmente pelo método.

TABELA 2. Recuperação de carotenoides por ruptura celular com ondas ultrassônicas utilizando diferentes relações biomassa/solvente.

Relação biomassa/solvente (g mL^{-1})	Carotenoides Específicos (µg g^{-1})
0,0050	129,9 ± 10,0 [b]
0,0083	78,3 ± 5,0 [c]
0,0167	202,6 ± 15,0 [a]
0,0250	217,9 ± 3,7 [a]
0,0330	216,6 ± 0,4 [a]
0,0420	210,8 ± 2,8 [a]
0,0830	94,6 ± 0,6 [c]

Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa entre as concentrações de carotenoides totais, pelo Teste de Tukey ($p<0,05$).

FONSECA et al. [7] ao analisar diferentes relações biomassa/solvente na recuperação de carotenoides produzidos por *P. rhodozyma*, utilizando ruptura celular com DMSO, observaram que é possível aumentar até 25 vezes a recuperação desses compostos, ao utilizar a relação biomassa:solvente de 0,025 g mL^{-1}, fato que vai de acordo com este estudo.

MICHELON et al. [15] avaliaram a influência de diferentes técnicas de ruptura celular na recuperação de carotenoides, utilizando o meio de cultura composto por 16,25 g L^{-1} de extrato de malte, 8,75 g L^{-1} de peptona, 15 g L^{-1} de sacarose, 87,5 g L^{-1} de água da parboilização do arroz e pH inicial de 5,0, com as condições de processo de 25°C e 150 rpm durante 168 h de cultivos. Ao realizarem ruptura celular com ondas ultrassônicas utilizando a relação biomassa:solvente sugerida pela literatura (0,0830 g mL^{-1}) observaram a recuperação de 88,38 ± 2,51 µg g^{-1} de carotenoides específicos, sendo tal resultado próximo ao encontrado nesta pesquisa. Apesar de não estudarem diferentes relações biomassa:solvente, na sequência de sua pesquisa, conseguiram um incremento na recuperação dos compostos de interesse com técnicas combinadas de lise enzimática (utilizando β-1,3 glucanase com atividade inicial de 0,6 U mL^{-1} durante 30 min) e aplicação de ondas ultrassônicas (nas mesmas condições do

presente estudo) para a ruptura celular, obtendo 163,12 ± 5,54 μg g^{-1} de carotenoides específicos.

As investigações já realizadas com a levedura *P. rhodozyma*, possibilitam inferir que a ruptura celular com DMSO é a técnica analítica mais utilizada e proporciona uma maior recuperação de carotenoides [5,19,22], porém, em função da elevada toxicidade desses extratos carotenogênicos sua aplicação em alimentos é impossibilitada [15,18].

De acordo com PASSOS et al. [18] apesar do método com DMSO demonstrar maior eficiência para a obtenção de carotenoides totais e astaxantina livre, devido à alta toxicidade inerente ao composto, este método deve ser reservado apenas para a quantificação em laboratório. Diante disto, a recuperação de carotenoides assistida por ondas ultrassônicas para ruptura celular mostra-se uma alternativa interessante, possibilitando que os mesmos sejam aplicados na indústria em diferentes áreas, como alimentos, fármacos, animal, ainda que proporcione menor recuperação de carotenoides [13,15].

Para tanto, foi possível definir a relação 0,0167 g mL^{-1} como a mais adequada para determinações analíticas, visto que demanda menor quantidade de biomassa, e a relação 0,042 g mL^{-1} como a mais conveniente, para que ocorra um menor gasto energético em um processo industrial visando a recuperação destes compostos de interesse.

4. CONCLUSÕES

A máxima produção dos carotenoides ocorreu entre 168 e 192 h de cultivo, cujo composto majoritário é a astaxantina. Um incremento na recuperação dos pigmentos foi obtido, através do parâmetro concentração total de carotenoides específico (μg g^{-1}), utilizando ruptura celular assistida por ondas ultrassônicas através de alterações nas relações biomassa:solvente, alcançando um aumento de 2,35 vezes carotenoides recuperados, com a relação biomassa:solvente de 0,0167 g mL^{-1} em relação à original.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] AN, G.; CHO, M.; JOHNSON, E. A. Monocyclic Carotenoid Biosynthetic Pathway in the yeast *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*). **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.88, n.2, p.189-193, 1999.

[2] AOAC. **Official methods of analysis.** 17th Ed. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 2000.

[3] BONFIM, T. M. B. Produção de astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma (Xanthophyllomyces dendrorhous)* a partir de meios de cultura de baixo custo (Tese de Doutorado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.

[4] CIPOLLATI, E. P. Obtenção de carotenoides microbianos com atividade antioxidante a partir de coprodutos agroindustriais (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

[5] CIPOLATTI, E. ; BULSING, B. ; SÁ, C. S. ; BURKERT, C. A. V. ; FURLONG, E. B. ; BURKERT, J. F. M. Carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: Antioxidant activity and stability of extracts. **African Journal of Biotechnology**, v.14, p. 1982-1988, 2015.

[6] FERREIRA, M. M.; ZAMITH, H. P. S.; ABRANTES, S. Astaxantina: seu uso como corante natural alimentício. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, n.1, p. 1-8, 2014.

[7] FONSECA, R. A. S.; RAFAEL, R. S. ; KALIL, S. J. ; BURKERT, C. A. V. ; BURKERT, J. F. M. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 7, p. 1165-1171, 2011.

[8] FONTANA, J. D.; CZECZUGA, B.; BONFIM, T. M. B.; CHOCIAI, M. B.; OLIVEIRA, B. H.; GUIMARÃES, M. F.; BARON, M. Bioproduction of carotenoids: the comparative use of raw sugarcane juice and depolymerized bagasse by *Phaffia rhodozyma*. **Bioresource Technology**, n.58, p.121-125, 1996.

[9] GAMMONE, M. A.; RICCIONI, G.; D'ORAZIO, N. Carotenoids: potential allies of cardiovascular health? **Food & Nutrition Research**, v.59, p. 26762, 2015.

[10] GONNET, M.; LETHUAUT, L.; BOURY, F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. **Journal of Controlled Release**, v. 146, p. 276–290, 2010.

[11] JOSEPH, B.; RAMTEKE, P. W.; THOMAS, G. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 457-470, 2008.

[12] KUSDIYANTINI E., GAUDIN P., GOMA G., BLANC P. J. Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. **Biotechnology Letters**. v. 20, n.10, 1998.

[13] LOPES, N. A. Recuperação de carotenoides microbianos por diferentes técnicas de ruptura celular (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

[14] MEDEIROS, F. O.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; MARTINS, D. S.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de β-galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n. 2, 336-339, 2008.

[15] MICHELON, M.; BORBA, T. M.; RAFAEL, R. S.; BURKET, C. A. V.; BURKET, J. F. M. Extraction of Carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: A Comparison between Different Techniques of Cell Disruption. **Food Science Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 1-8, 2012.

[16] OLIVEIRA, S. C.; CIRILO, A. T. O.; BASTOS, V. S.; AQUINO, A. C. M. S.; CASTRO, A. A.; NARAIN, N. Estudo da extração e estabilidade dos carotenoides em amostras de salmão (*Salmo salar*) cru resfriado e congelado durante o armazenamento. **Scientia Plena**, v. 7, n. 5, p. 1-6, 2011.

[17] PARAJÓ, J. C.; SANTOS, V.; VÁZQUEZ, M. Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xylose. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 181-187, 1998.

[18] PASSOS, R. Extração e caracterização química de carotenoides provenientes de biomassas de interesse para aqüicultura (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

[19] RIOS, D. A. S.; BORBA, T. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, J. F. M. Parboiling wastewater in the maximization of carotenoids bioproduction by *Phaffia rhodozyma*. **Ciência e Agrotécnica**, v. 39, n. 4, p. 401-410, 2015.

[20] RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Ph.D. **A guide to carotenoid analysis in foods**. ILSI Press. Washington, D.C. USA, 2001.

[21] SAINI, R. K.; NILE, S. H.; PARK, S.W. Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. **Food Research International**, v. 76, n. 3, p. 735–750, 2015.

[22] SILVA, C. M. ; BORBA, T. M. ; KALIL, S. J. ; BURKERT, J. F. M. . Raw glycerol and parboiled rice effluent for carotenoid production: Effect of the composition of culture medium and initial pH. **Food Technology and Biotechnology**, v. 54, p. 489-496, 2016.

[23] VALDUGA, E.; VALÉRIO, A.; TATSCH, P.O.; TREICHEL, H.; FURIGO JR, A.; LUCCIO, M. D. Optimization of the production of total carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) using response surface technique. **Food Bioprocess Technology**, v. 2, p. 415-421, 2009.

[24] VALDUGA E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; LUCCIO, M.; FÚRIGO JÚNIOR, A. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, 2009.

[25] YAMANE, Y.; HIGASHIDA, K.; NAKASHIMADA, Y.; KAKINOZO, T.; NISHIO, N. Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analysis. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4471-4478, 1997.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e à CAPES pela concessão das bolsas de estudo.