

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
COORDENAÇÃO DE TECNOLOGIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
CÂMPUS CAMPO MOURÃO – PARANÁ

JAQUELINE BARBATO

**ESTUDO DA OBTENÇÃO DE CAROTENÓIDES POR FERMENTAÇÃO  
EMPREGANDO A LEVEDURA *RHODOTORULA* sp EM MELAÇO E  
CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO MEIO DE CULTURA.**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2014

JAQUELINE BARBATO

**ESTUDO DA OBTENÇÃO DE CAROTENÓIDES POR FERMENTAÇÃO  
EMPREGANDO A LEVEDURA *RHODOTORULA* sp EM MELAÇO E  
CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO MEIO DE CULTURA.**

Trabalho de conclusão de curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso, do Curso Superior de Tecnologia de Alimentos da Coordenação dos Cursos de Tecnologia e Engenharia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Câmpus Campo Mourão, como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo de Alimentos.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Mirela Vanin dos Santos Lima

CAMPO MOURÃO

2014

## **Agradecimento**

A Deus por ter me dado força e coragem para realizar e concluir este trabalho.

Aos meus pais que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao meu noivo e a minha família que sempre me apoiaram e me deram força.

Aos meus amigos pelo apoio concedido.

A professora Dr<sup>a</sup>. Mirela Vanin dos Santos Lima pela orientação, ensinamentos, dedicação, paciência, amizade e pela oportunidade para que este trabalho fosse realizado.

Aos participantes da banca pela participação, contribuições e sugestões.



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
Campus Campo Mourão  
Coordenação dos cursos de Tecnologia e Engenharia  
de Alimentos Tecnologia de Alimentos



## TERMO DE APROVAÇÃO

### ESTUDO DA OBTENÇÃO DE CAROTENÓIDES POR FERMENTAÇÃO EMPREGANDO A LEVEDURA *RHODOTORULA* sp EM MELAÇO E CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO MEIO DE CULTURA

por

JAQUELINE BARBATO

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado em 28 de fevereiro de 2014 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnóloga em Alimentos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mirela Vanin dos Santos Lima  
(Orientadora)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Regina Geraldo Perdoncini

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marianne Ayumi Shirai

---

**Nota:** O documento original e assinado pela Banca Examinadora encontra-se no Departamento Acadêmico de Tecnologia e Engenharia de Alimentos da UTFPR campus Campo Mourão

## RESUMO

BARBATO, Jaqueline. **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 de graduação em Tecnologia de Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2014.

A aparência de um alimento natural ou processado é de extrema relevância para sua aceitação, razão pela qual a cor é uma das propriedades sensoriais mais importantes. Os carotenóides dão as cores vermelhas, laranja e amarela dos alimentos. A produção de carotenóides por rota biotecnológica tem se expandido nos últimos anos, uma vez que permite a obtenção deste produto em qualquer época do ano. Para tanto é necessário disponibilizar condições favoráveis para o desenvolvimento da levedura como: pH, temperatura, aeração, agitação, luminosidade e nutrientes. Sendo que as leveduras têm capacidade de crescimento em substrato de baixo custo. Assim este trabalho teve por objetivo a obtenção de carotenóides por fermentação utilizando melaço e caldo de cana de açúcar como meio de cultivo e a levedura *Rhodotorula* sp como biocatalisador do processo. O melaço nas concentrações 25%, 50% e 75%, caldo de cana e um meio sintético foram utilizados como substrato, para a inoculação da levedura *Rhodotorula* sp. Durante o período de fermentação foram coletadas amostras para determinação de pH, concentração de microrganismo e açúcar redutor e ao final da fermentação, foram coletadas amostras e centrifugadas, obtendo a biomassa de microrganismo para realizar a extração com: acetona/éter de petróleo 1:1 (v/v), acetona/éter de petróleo 1:1 (v/v) e ultrassom e extração com Dimetilsufóxido. A determinação de carotenóides foi através do UV-VIS com o comprimento de onda 450nm. Dos resultados obtidos pode-se destacar a possibilidade de uso de caldo de cana e melaço diluído como meio de cultivo para obtenção de carotenóides e que dentre as metodologias de extração de carotenóides empregadas a extração com acetona/éter de petróleo se mostrou mais eficiente.

**Palavras-chave:** Fermentação. Extração de carotenóides. Biotecnologia. Corante. Levedura.

## ABSTRACT

BARBATO, Jaqueline. **Study obtation of carotenoids by fermentation using the yeast *Rhodotorula* sp and molasses and sugar cane-sugar-like medium.** 2014. 50 f. (Work conclusion of degree course in Food Technology). Federal Technological University of Paraná. Campo Mourão, 2014.

The appearance of natural or processed food is very important for its acceptance, and color is one of the most important sensory properties. Carotenoids give red, orange and yellow colors in foods. The carotenoid production by biotechnological route has been expanded in recent years, since it allows obtaining this product for any time of year. For this, it is necessary to provide favorable conditions for the development of yeast as: pH, temperature, aeration, agitation, light and nutrients. Since yeasts are capable of growth on low cost substrate. This study aimed to obtain carotenoids by fermentation using molasses and sugar cane juice as a means of cultivation and yeast *Rhodotorula* sp as biocatalyst process. The molasses at the concentrations 25%, 50% and 75%, sugar cane and a synthetic medium were used as substrate for the inoculation of yeast *Rhodotorula* sp. During the fermentation samples for determining pH, microorganism and reducing sugar and at the end of fermentation were collected and centrifuged samples were collected, obtaining the biomass of the microorganism to perform the extraction: acetone/petroleum ether 1:1 (v/v) acetone/petroleum ether 1:1 (v/v) and extracted with ultrasound and dimethylsulfoxide. The carotenoid determination was by UV-vis the wavelength of 450 nm. From the results obtained, we can detach the possibility of using sugar cane juice and molasses as cultivation medium diluted to obtain carotenoids and that among the extraction methods employed carotenoid extraction with acetone/petroleum ether was more efficient.

**Keywords:** Fermentation. Extraction of carotenoids. Biotechnology. Dye. Yeast.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Alguns exemplos de carotenóides .....	7
Figura 2 - Fluxograma do estágios de biossíntese de carotenóides .....	8
Figura 3 - Estágio intermediário da biossíntese de carotenóides .....	9
Figura 4 - Ciclização dos carotenos acíclicos insaturados .....	10
Figura 5 - Formação das xantofilas a partir do carotenóide a-caroteno .....	10
Figura 6 - Formação das xantofilas a partir de b-caroteno .....	11
Figura 7 - Características macroscópica da <i>Rhodotorula</i> sp .....	13
Figura 8 - Multiplicação das leveduras com formação de broto .....	13
Figura 9 - Meio de inoculo e propagação após 48 horas de fermentação.....	18
Figura 10 - Meio de cultura após 88 horas de fermentação .....	21
Figura 11 - Curva de calibração de açúcar redutor .....	28
Figura 12. Curva de calibração de microrganismo .....	28
Figura 13 - Curva de calibração de $\beta$ – caroteno. ....	29
Figura 14 - Resultado do acompanhamento ph, das diferentes concentrações de melaço, caldo de cana e meio sintético, durante a fermentação.....	30
Figura 15 - Resultado do acompanhamento de açúcar redutor das diferentes concentrações de melaço, caldo de cana e meio sintético, durante a fermentação..	30
Figura 16 - Resultado do acompanhamento da concentração de microrganismo das diferentes concentrações de melaço, caldo de cana e meio sintético, durante a fermentação .....	31
Figura 17 - Extração de carotenóides com acetona/éter de petróleo .....	35
Figura 18 - Extração com acetona/éter de petróleo ultrassom .....	35
Figura 19 - Extração de carotenóides com DMSO .....	35

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Extração de carotenóides com: acetona e éter de petróleo, acetona/éter de petróleo e ultrassom e extração com DMSO.....	31
Tabela 2 - Concentração de açúcar redutor, concentração de microrganismo e ph, referente á segunda fermentação .....	33
Tabela 3 - Extração de carotenóides com: acetona/éter de petróleo, acetona éter de petróleo e ultrassom e extração com DMSO.....	34

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVO</b> .....	<b>3</b>
2.1 Objetivo Geral .....	3
2.2 Objetivos específicos .....	3
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
3.1 Corantes.....	4
3.2 Carotenóides .....	5
3.2.1 Estrutura química e propriedades dos carotenóides .....	6
3.2.2 Biossíntese dos carotenóides.....	7
3.3 Levedura <i>Rhodotorula</i> sp. ....	11
3.3.1 Leveduras.....	11
3.3.2 Gênero <i>Rhodotorula</i> .....	12
3.3.3 Fermentação .....	14
3.3.3.1 Vantagens dos processos biotecnológicos.....	14
3.4 Melaço de cana-de-açúcar .....	14
3.5 Caldo de cana. ....	15
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
4.1 Material.....	17
4.2 Métodos.....	17
4.2.1 Preparação do inóculo.....	17
4.2.1.1 Meio de inóculo e propagação (multiplicação) .....	17
4.2.1.2 Manutenção de microrganismo .....	18
4.2.2 Meio de cultivo e fermentação.....	19
4.2.2.1 Preparo dos meios de cultivo .....	19
4.2.2.2 Fermentação .....	20
4.2.3 Acompanhamento do processo fermentativo .....	21
4.2.4 Extração dos carotenóides .....	21
4.3 Métodos Analíticos .....	23
4.3.1 Curvas de calibração.....	23
4.3.1.1 Curva de calibração do microrganismo .....	23
4.3.1.2 Curva de calibração de açúcares redutores (AR).....	24
4.3.1.3 Curva de calibração de betacaroteno.....	25
4.3.2 Análise de acompanhamento dos processos fermentativos.....	25
4.3.2.1 Determinação de pH.....	25
4.3.2.2 Determinação da concentração de microrganismo .....	26
4.3.2.3 Determinação da concentração de açúcar redutor (AR) .....	26
4.3.2.4 Determinação de carotenóides.....	27
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>28</b>
5.1 Curvas de calibração.....	28
5.2 Resultados da 1ª Batelada .....	29
5.3 Resultados da 2ª Batelada .....	33
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>7 SUGESTÃO PARA NOVOS TRABALHOS</b> .....	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>39</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A alimentação, além de necessária à saúde, é uma fonte de prazer. A intenção de consumo dos alimentos dá-se, primeiramente, pela visão; portanto, alimentos coloridos e vistosos são muito mais atraentes para o consumidor, e essa cor deve-se, sobretudo, ao uso de corantes. A cor é associada a muitos aspectos de nossa vida, influenciando nossas decisões, sobretudo as que envolvem os alimentos. A aparência, segurança, aceitabilidade e características sensoriais dos alimentos são todas afetadas pela cor. Embora esses efeitos sejam associações inerentes às características psicológicas, eles interferem na escolha dos produtos. Dentre as estratégias das indústrias para enriquecimento e favorecimento do produto que é processado, o corante exerce um efeito estimulante ao apetite do consumidor (SOUZA, 2012).

A coloração é a primeira qualidade sensorial pela qual os alimentos são julgados e, portanto, amplamente utilizada na indústria alimentícia para atender as expectativas dos consumidores, que usualmente associam cor ao sabor, cheiro ou qualidade do produto. Por essa razão, o setor alimentício preocupa-se tanto com a aplicação de cores (através do uso de corantes) e obtenção de alimentos que agradem aos olhos do consumidor, quanto com os riscos toxicológicos que tais corantes e/ou seus metabólitos possam trazer ao organismo humano (CONSTANT, STRINGHETA & SANDI, 2002 apud KAPOR, 2001).

Corantes são definidos como substâncias ou mistura de substâncias adicionadas aos alimentos e bebidas, com a finalidade de conferir ou intensificar a coloração própria do produto. Para o uso desses corantes como aditivos alimentares, as indústrias devem respeitar os percentuais máximos estabelecidos pela legislação vigente. Além disso, é obrigação do fabricante informar ao consumidor (através do rótulo do produto) a presença de corantes e suas especificações (SOUZA, 2012).

Os corantes artificiais ou sintéticos são uma classe de aditivos sem valor nutritivos, introduzidos nos alimentos e bebidas com um único objetivo de conferir a cor, tornando os mais atrativos. Por esse motivo, do ponto de vista da saúde, os corantes artificiais em geral não são recomendados, justificando seu uso, que quase exclusivamente, do ponto de vista comercial e tecnológico. (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2009). A tendência mundial é cada vez mais reduzir o uso dos

corantes artificiais devido aos possíveis prejuízos à saúde (DOCE AROMA, 2011 apud PAZZOTI, 2011).

Dentre os vários corantes empregados na indústria de alimentos os carotenóides, responsáveis pela coloração alaranjada, desempenham um papel importante na prevenção de doenças associadas aos processos de estresse oxidativo como câncer, a catarata, arteriosclerose e retardo do processo de envelhecimento (RIBEIRO & SERAVALLI, 2004).

Um corante natural é toda substância corada extraída apenas por processos físico-químicos (dissolução, precipitação, entre outros) ou bioquímicos (fermentação) de uma matéria-prima animal ou vegetal. Esta substância deve ser solúvel no meio líquido onde vai ser mergulhado o material a tingir (ARAÚJO, 2005).

Dentre os métodos possíveis destacam-se os processos biotecnológicos, pois a produção do corante pode ser desenvolvida em qualquer época do ano. Necessita fornecer as condições favoráveis para o crescimento do microrganismo, para a obtenção produto.

Pigmentos microbianos são uma alternativa promissora em relação a outros aditivos extraídos de animais ou vegetais, porque eles são considerados naturais, não apresentam problema de sazonalidade e mostram grande produtividade. (CARVALHO *et al.*, 2006).

Os gêneros de leveduras capazes de produzir carotenóides são *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Sporobolomyces* e *Phaffia*. Os pigmentos formados e a concentração dependem das espécies de microrganismos e das condições de cultivo. As leveduras do gênero *Rhodotorula* possuem capacidade de sintetizar diferentes tipos de carotenóides em variadas proporções em resposta ao cultivo (VALDUGA *et al.*, 2009).

Portanto este trabalho teve por objetivo estudar o processo de obtenção de carotenóides por fermentação descontínua, empregando melaço de cana de açúcar e caldo de cana como meio de cultivo e a levedura *Rhodotorula* sp como biocatalisador do processo.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo geral**

Estudar o processo de obtenção de carotenóides por fermentação descontínua, empregando melaço de cana de açúcar e caldo de cana como meio de cultivo e a levedura *Rhodotorula* sp como biocatalisador deste processo.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Ativar o microrganismo e prover sua manutenção durante o período de execução do trabalho.
- Avaliar a possibilidade de uso do melaço e caldo de cana como meio de cultura para o processo fermentativo (em estudo).
- Avaliar a influência da quantidade de açúcares redutores iniciais no processo de obtenção de carotenóides por via fermentativa.
- Avaliar diferentes métodos de recuperação dos carotenóides obtidos no estudo proposto.
- Quantificar os carotenóides obtidos como resultado dos processos fermentativos (realizados neste estudo).

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Corantes

Segundo a ANVISA, (1977) corante é uma substância ou a mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração do alimento (e bebida).

Os corantes são classificados de acordo com esta legislação como:

- Corante orgânico natural: aquele obtido a partir de vegetal, ou eventualmente, de animal, cujo princípio corante tenha sido isolado com o emprego de processo tecnológico adequado.
- Corante orgânico sintético: aquele obtido por síntese orgânica mediante o emprego de processo tecnológico adequado.
- Corante artificial: é o corante orgânico sintético não encontrado em produtos naturais.
- Corante orgânico sintético idêntico ao natural: é o corante orgânico sintético cuja estrutura química é semelhante à do princípio ativo isolado de corante orgânico natural.
- Corante inorgânico: aquele obtido a partir de substâncias minerais e submetido a processos de elaboração e purificação adequados a seu emprego em alimento.
- Caramelo: o corante natural obtido pelo aquecimento de açúcares à temperatura superior ao ponto de fusão.
- Caramelo (processo amônia): é o corante orgânico sintético idêntico ao natural obtido pelo processo amônia, desde que o teor de 4-metil, imidazol não exceda no mesmo a 200mg/kg (duzentos miligramas por quilo).

Os corantes naturais são obtidos de três fontes principais, dentre elas as plantas (folhas, flores e frutos), animais (insetos) e microrganismos (fungos e bactérias). Os corantes mais comumente encontrados na natureza, extraídos de plantas e animais, são divididos em cinco classes principais: tetrapirrol, tetraterpeno ou caroteno, flavonóide, antraquinona e betaláina (MENDONÇA, 2011).

### 3.2 Carotenóides

São classificados como corantes orgânicos naturais: obtido a partir de vegetal, ou eventualmente, de animal, cujo princípio corante tenha sido isolado com o emprego de processo tecnológico adequado.

Os carotenóides constituem um dos mais importantes grupos de pigmentos naturais devido a larga distribuição, diversidade estrutural e inúmeras funções. São responsáveis pelas cores laranja, amarela e vermelha das frutas, hortaliças e flores, algas, bactérias, fungos, leveduras e animais, que apesar de não sintetizarem tais moléculas, podem obtê-las a partir do consumo de alimentos de origem vegetal (RIBEIRO & SERAVALLI, 2004).

Esses pigmentos são utilizados na indústria 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-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 (certos tipos de câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular e catarata) (SILVA, 2004).

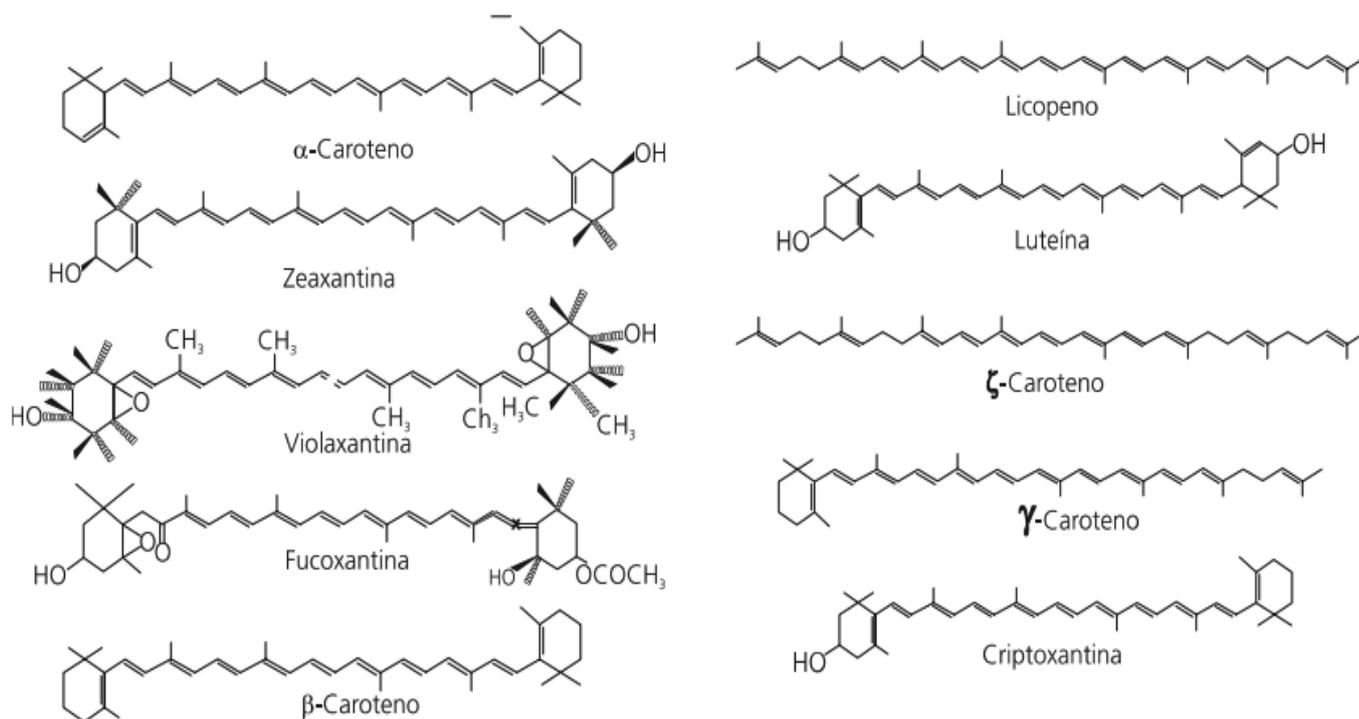
O nome carotenóides é derivado do nome científico da cenoura – *Daucuscarote*, como a primeira fonte de caroteno. Atualmente já foram identificados mais de 600 exemplares de carotenóides, classificados estruturalmente em sete tipos diferentes e distribuídos em várias formas isoméricas (VILLELA *et al.*, 1966 apud MORAES, 2006).

A produção comercial de carotenóides a partir de microrganismos concorre principalmente com a produção sintética por procedimentos químicos. Atualmente, os carotenóides utilizados industrialmente são obtidos por via química ou extração de plantas e/ou algas. Entretanto, devido à preocupação com o uso de aditivos químicos em alimentos, houve um crescente interesse nos carotenóides obtidos naturalmente por processos biotecnológicos. Além da conotação natural, os produtos obtidos por produção microbiana podem ser obtidos em curto prazo, em qualquer época do ano (VALDUGA *et al.*, 2009).

### 3.2.1 Estrutura química e propriedades dos carotenóides

Os carotenóides apresentam a estrutura básica de tetraterpenos  $C_{40}$  formados por oito unidades isoprenóides de cinco carbonos, ligados de tal forma que a molécula é linear e simétrica com a ordem invertida no centro. Este esqueleto básico pode ser modificado por diferentes rotas, tais como reações de hidrogenação, desidrogenação, ciclização, migração de dupla ligação, encurtamento ou extensão da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de substituintes e oxidação. O sistema de duplas ligações conjugadas confere a estes pigmentos alta reatividade química, podendo ser facilmente isomerizados e oxidados. Os carotenóides hidrocarbonetos são chamados de carotenos e os derivados oxigenados, de xantofilas. Os carotenóides mais comuns são o  $\beta$ -caroteno, o licopeno, a luteína e a zeaxantina (FONTANA *et al.*, 1997).

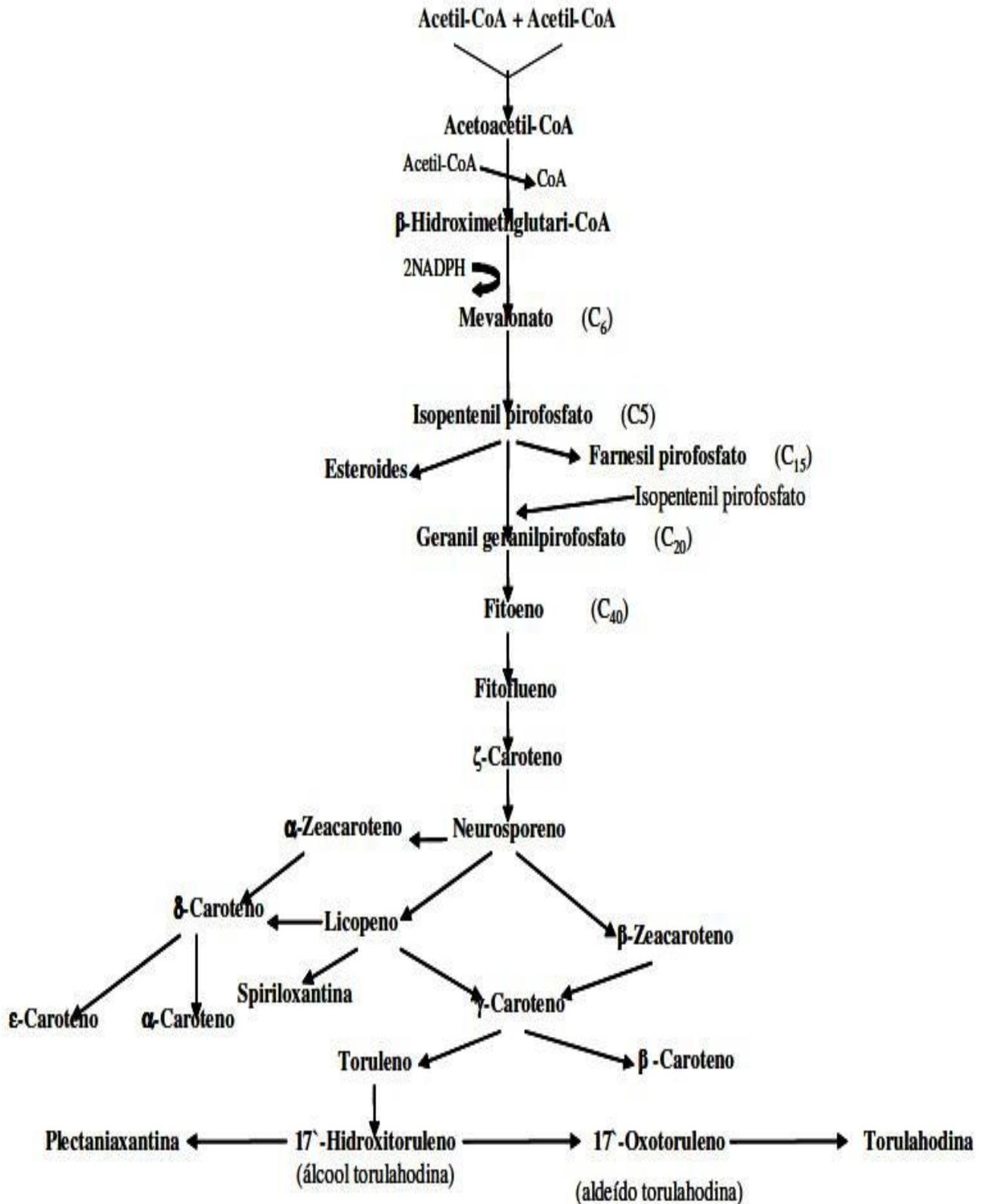
A característica de absorção de luz destes pigmentos dá-se devido à cadeia de duplas ligações conjugadas que atua como cromóforo, sendo necessário, aproximadamente, sete ligações duplas conjugadas para que o carotenóide apresente coloração. As duplas ligações presentes nesse sistema provocam a sua possível oxidação e isomerização, principalmente quando submetidos a condições não controladas de processamento e/ou estocagem, mais especificamente em produtos naturais (frutas). Além disso, o calor, a luz, o oxigênio e enzimas como lipoxigenase e/ou ácidos presentes em frutas levam a alterações ou parcial destruição dos pigmentos. A exposição destes a tais agentes resulta na formação de isômeros *cis*, epóxidos, diminuição da cor, perda da atividade pró-vitáminica A e quebra da cadeia (VALDUGA *et al.*, 2009).



**Figura 1:** Alguns exemplos de carotenoides.  
**Fonte:** (AMBRÓSIO, FONTES & FARO, 2006)

### 3.2.2 Biossíntese dos carotenóides

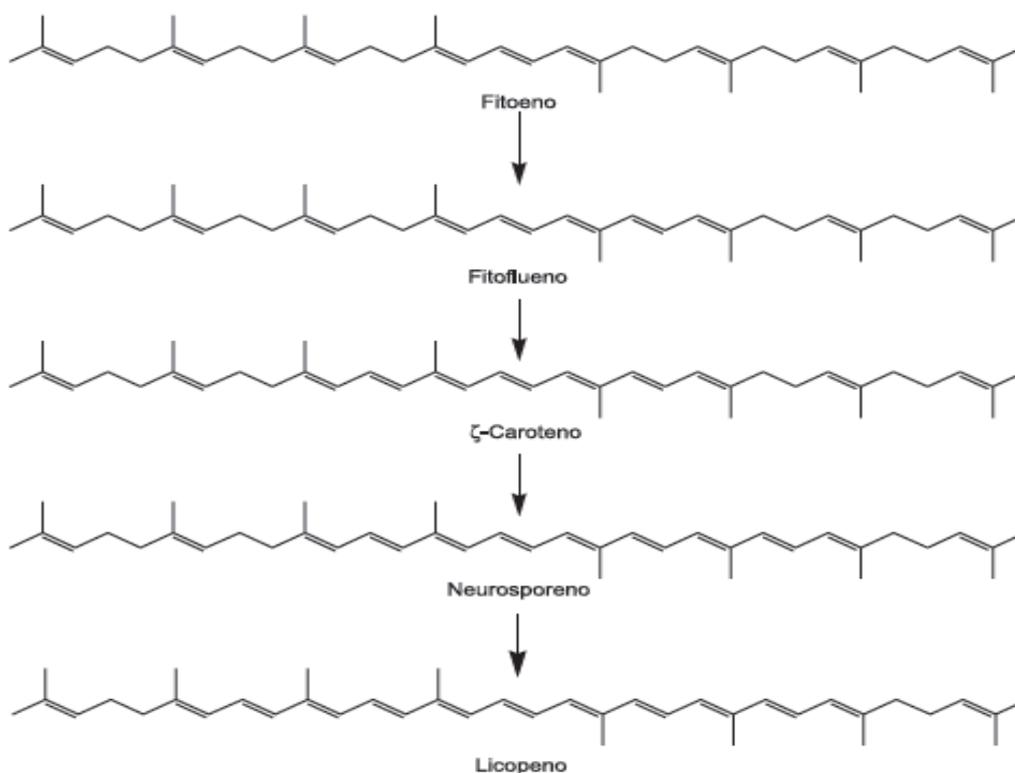
Os carotenóides são tetraterpenóides sintetizados em organismos fotossintéticos, algas, bactérias, plantas e leveduras e sua biossíntese acontece em três estágios diferentes, demonstrados na Figura 2: sendo: síntese terpenóide básico  $C_5$ ; síntese de compostos  $C_{40}$ , a partir dos intermediários terpênicos; e a transformação do  $C_{40}$  para formação dos diversos carotenóides. A partir da síntese de carotenóides, os estágios iniciais seguem vias comuns da biossíntese de esteróides, sendo intermediários ao Acetoacetyl – CoA, mevalonato, isopentenilpirofosfato, geranylgeranylpirofosfato e farnesilpirofosfato que tem sido relacionados a formações de carotenoides (RATLEDGE & EVANS, 1989 apud VALDUGA, 2005).



**Figura 2:** Fluxograma dos estágios de biossíntese de carotenos  
**Fonte:** (RATLEDGE & EVANS, 1989 apud VALDUGA, 2005).

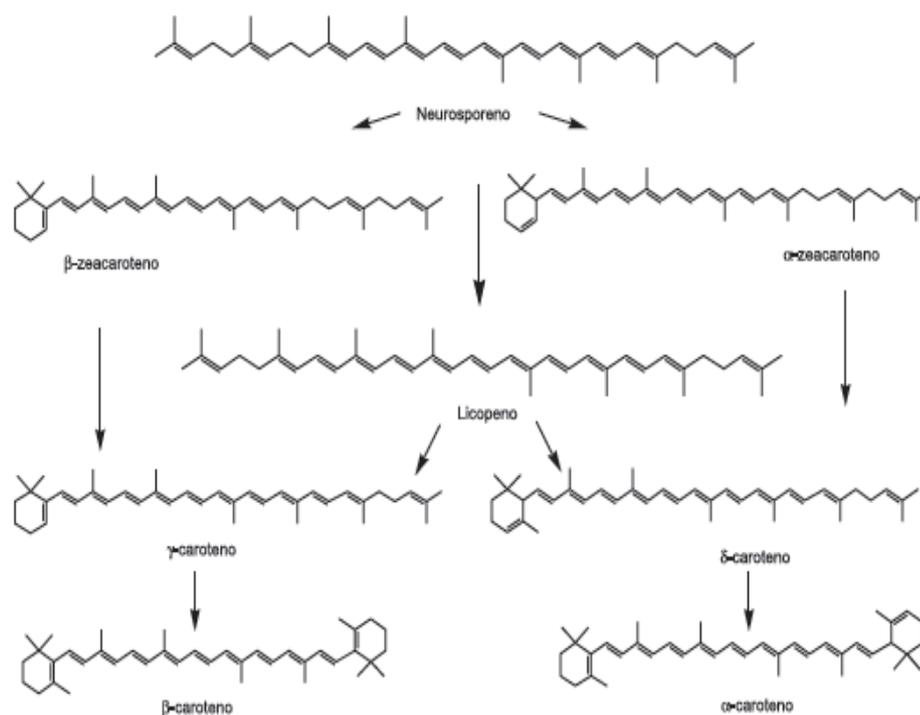
O primeiro precursor específico na biossíntese dos terpenóides é o ácido mevalônico. O ácido mevalônico, após uma série de reações, forma geranyl difosfato (10 C), farnesil difosfato (15 C) e geranyl-geranyl difosfato (20 C), observados na

Figura 2. A dimerização de duas moléculas de geranyl-geranyl difosfato forma o fitoeno, sendo este o primeiro composto de quarenta carbonos, embora ainda sem coloração. Segue-se uma série de desnaturações a partir do fitoeno para formar fitoflueno,  $\zeta$ - caroteno, neurosporeno e, finalmente licopeno. A ciclização pode ocorrer a partir do neurosporeno ou licopeno. O neurosporeno sofre ciclização em uma das extremidades, formando o anel  $\beta$  de  $\beta$ -zeacaroteno ou o anel  $\alpha$  de  $\alpha$ -caroteno. Estes dois carotenóides são transformados em  $\gamma$ -caroteno e  $\delta$ -caroteno, respectivamente, pela introdução de uma dupla ligação, estendendo o sistema de dupla ligação conjugadas. O licopeno pode também ser ciclizado em uma das extremidades, gerando  $\gamma$ -caroteno e  $\delta$ -caroteno. Estes carotenos monocíclicos sofrem ciclização na outra extremidade, resultando em  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -caroteno, respectivamente. Após a formação dos carotenóides cíclicos, tem-se a introdução de substituintes, como a hidroxila, gerando xantofilas. As Figuras de 3 a 6, apresentam estágios intermediários e de ciclização para obtenção dos carotenóides pela biossíntese apresentada (VALDUGA *et al.*, 2009).



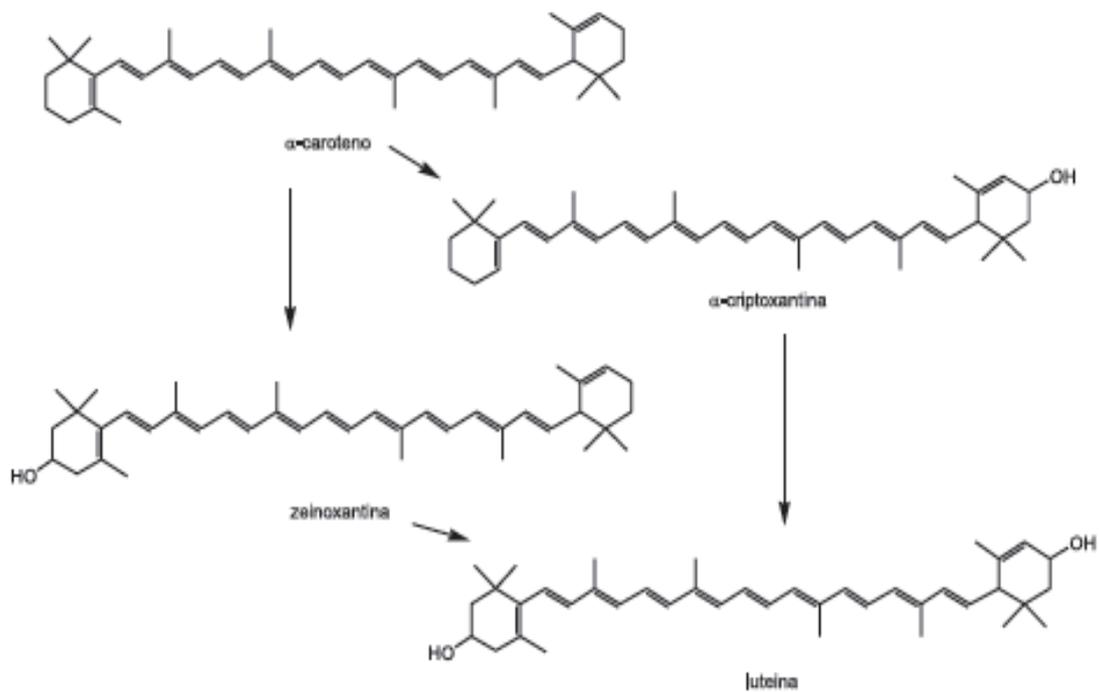
**Figura 3:** Estágio intermediário de biossíntese de carotenóides.

**Fonte:** (VALDUGA, 2009).



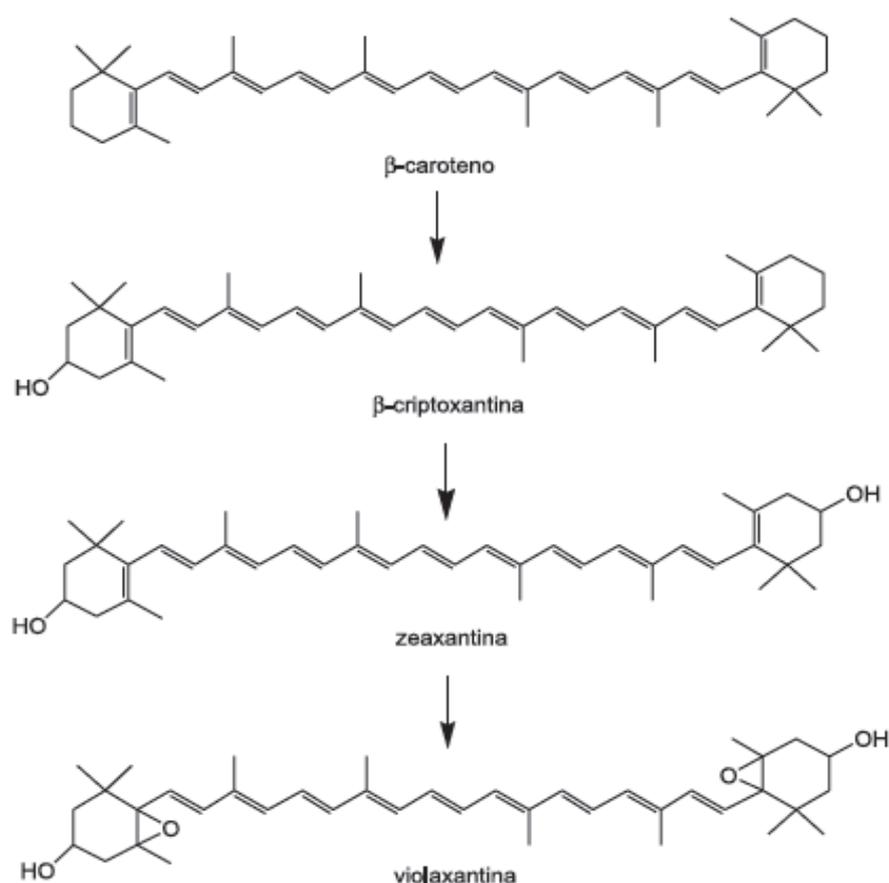
**Figura 4:** Ciclização dos carotenos acíclicos insaturados.

**Fonte:** (VALDUGA, 2009).



**Figura 5:** Formação de xantofilas a partir do carotenoide  $\alpha$ -caroteno.

**Fonte:** (VALDUGA, 2009).



**Figura 6:** Formação de xantofilas a partir de Betacaroteno.

**Fonte:** (VALDUGA, 2009).

### 3.3 Levedura *Rhodotorula sp*

#### 3.3.1 Leveduras

As leveduras são fungos geralmente unicelulares. Seu tamanho varia bastante, de 1-5  $\mu\text{m}$  de diâmetro a 5-30  $\mu\text{m}$  de comprimento. Sua forma também é muito variável, desde elementos esféricos até células elípticas bastante alongadas, quase filamentosas. Suas células apresentam características dos seres eucarióticos. Possuem membrana citoplasmática lipoproteica, cuja principal função é regular as trocas com o meio ambiente. Possuem também, uma parede celular rígida, constituída principalmente de dois polissacarídeos: manana e glucana: além disso, contêm proteínas e lipídeos. No citoplasma, encontram-se, além dos componentes

usuais em solução, um ou mais vacúolos, delimitados por uma membrana; mitocôndrias – estruturas membranosas relacionadas como o processo respiratório; retículo citoplasmático; ribossomos e, freqüentemente, grânulos de material de reserva – hidratos do carbono, gorduras ou proteínas. O núcleo tipicamente eucariótico é envolvido por uma membrana nuclear (LIMA, AQUARONE & BORZANI, 1975).

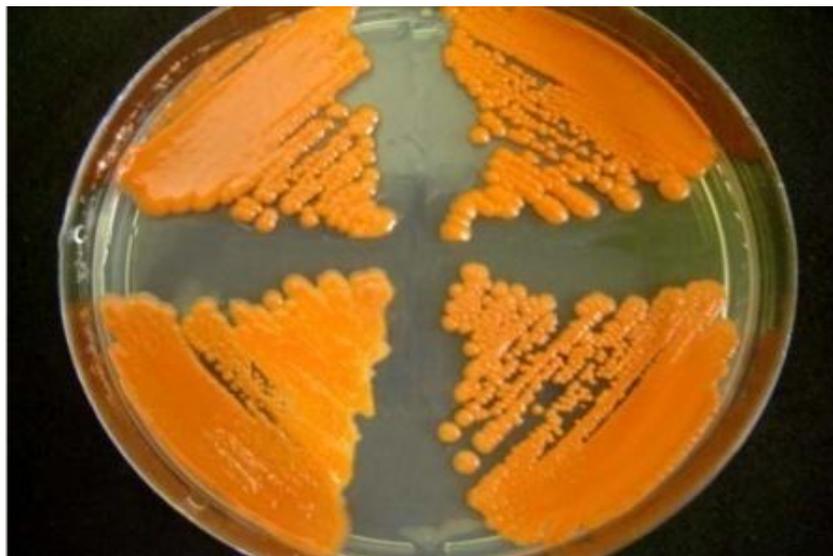
As leveduras podem se reproduzir assexuada ou sexuadamente. No primeiro caso, o processo mais comum é o brotamento, do qual resultam células-filhas inicialmente menores que a célula mãe. Algumas leveduras reproduzem-se por divisão binária. A reprodução sexuada se faz pela formação de *ascósporos*, isto é, esporos contidos no interior de um asco. Algumas leveduras não apresentam um processo de reprodução sexuada; são chamadas de “falsas leveduras” e classificadas entre os *fungi imperfecti* (LIMA, AQUARONE & BORZANI, 1975).

### **3.3.2 O Gênero *Rhodotorula***

O gênero *Rhodotorula* apresenta leveduras de baixa capacidade fermentativa, não formadoras de esporos e que tem às vezes, pseudos micélios rudimentares e que se reproduzem por gemação multipolar. As espécies do gênero *Rhodotorula*, se repartem amplamente na natureza e se localizam especialmente na poeira e no ar, de onde caem sobre os alimentos. Estas leveduras por conterem pigmentos de varias tonalidade (vermelha, laranja, amarela e rosa), modificam a coloração normal de alimentos: carnes contaminadas surgem como manchas de diferentes matrizes e o chucrute podem adquirir pontos de cor rosada (EVANGELISTA, 2008).

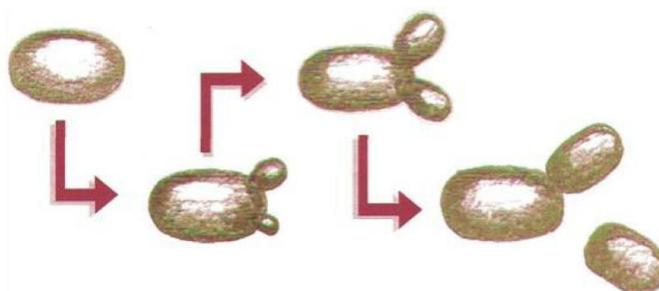
As leveduras do gênero *Rhodotorula* são capazes de sintetizar carotenóides intracelularmente, além de outras substâncias ativas exocelularmente. Ainda que a biossíntese de carotenóides por leveduras seja bem conhecida, seu uso industrial ainda é restrito devido à pouca informação disponível sobre os mecanismos de regulação biossintética e também à ausência de estudos dirigidos, tanto para o aumento da biomassa quanto para produção dos carotenóides (SILVA, 2004).

Na Figura 7, pode-se observar as características macroscópicas da *Rhodotorula* sp.



**Figura 7:** Características macroscópica da *Rhodotorula* sp.  
**Fonte:** (ALMEIDA, 2005).

O processo de reprodução da levedura *Rhodotorula* ocorre por gemiparidade. Esse processo polar ou multilateral se caracteriza pela formação na periferia celular, de uma saliência ou protuberância (verruga), que é a gema. No decorrer da geminação, a substância citoplasmática e nuclear da célula original passa para a gema. À medida que a gema aumenta de tamanho, se estreita em sua parte inferior, formando uma parede de limitação, em seguida, a gema se separa da célula mãe. Muitas vezes antes do desligamento da gema da célula mãe, pode brotar nesta, ao mesmo tempo, em outros lugares, novos botões, que posteriormente seguem seu ciclo (EVANGELISTA, 2008). A Figura 8 apresenta a multiplicação das leveduras através da formação de broto.



**Figura 8:** Multiplicação das leveduras com formação de broto  
**Fonte:** (SANTOS, 2008).

### 3.3.3 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 acceptor final de elétrons. Por isso, é chamada de respiração anaeróbica. Porém, ele é dezoito vezes menos eficiente em termos de energia, gerando apenas dois ATPs por molécula de glicose (CASADEI, 2012).

Muitos produtos de interesse comercial são obtidos por processos fermentativos em escala industrial, como: enzimas, antibióticos, solventes orgânicos, corantes, vitaminas e aminoácidos, entre outros. Neste processo o meio de fermentação precisa conter uma fonte de carbono, que pode ser um carboidrato, como cana-de-açúcar, frutas, leite, malte, melaço e lignocelulósicos, bem como óleos vegetais e álcoois. Dependendo do processo, o meio pode corresponder a até 70% do custo do produto final, portanto, quanto mais barato o meio, menor o custo do produto. A obtenção desses produtos podem ocorrer em qualquer época. São produtos mais baratos, menos tóxicos em relação aos produtos produzidos por via sintética.

#### 3.3.3.1 Vantagens dos processos biotecnológicos

A produção biotecnológica de carotenóides para a aplicação industrial, através de microrganismos, tem sido assunto de destaque nos últimos anos. As vantagens são as seguintes:

- Os microrganismos têm a capacidade de utilizar substratos de baixo custo para sua produção.
- Os carotenóides produzidos são considerados substâncias naturais.
- A produção se dá em pequeno espaço, não estando sujeita às condições ambientais como clima, estação do ano ou composição do solo.

- Existe a possibilidade de controlar as condições de cultivo para garantir a produção de carotenóides de maior importância.

Uma variedade de carotenóides, com estruturas específicas, pode ser obtida a partir da exploração do reino microbiano. A produção de carotenóides através de microrganismos constitui hoje uma alternativa interessante devido à possibilidade da obtenção de pigmentos de origem natural em escala industrial (AUSICH, 1997).

Muitos microrganismos produzem carotenóides, porém nem todos são industrialmente interessantes. As leveduras destacam-se pelo seu uso como fonte protéica, capacidade de crescimento em substratos de baixo custo e alto teor de açúcar. Os tipos de carotenóides e a quantidade relativa destes podem variar dependendo das condições do meio de cultura, temperatura, pH, taxa de aeração e luminosidade.

Os microrganismos do gênero *Rhodotorula* são conhecidos por produzir quantidades consideráveis de carotenóides. Atualmente, este gênero tem sido estudado devido ao 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 (BRANCO, 2010).

### **3.4 Melaço de cana de açúcar**

Diversos subprodutos e matérias-primas da indústria de alimentos e/ou da agroindústria têm sido empregados para o crescimento de microrganismos pela alta disponibilidade e baixo custo. Exemplos: soro de leite, água de maceração de milho, xarope de milho, levedura de destilaria e melaços (MORAES *et al.*, 1991 apud OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Melaço de cana-de-açúcar é o licor resultante da cristalização final do açúcar, onde é composto por: água, carboidratos fermentescíveis (glucose, frutose e sacarose), compostos de origem orgânica (aminoácido, vitaminas e proteínas) e

uma fração mineral composta principalmente por cálcio, magnésio, sódio e potássio. O melão tem sido utilizado como substrato na produção de produtos fermentados de interesse econômico, pois que apresenta altos teores de açúcares como sacarose, glucose e frutose (62% em média) e também é um subproduto da indústria açúcareira relativamente barato e disponível em grandes quantidades (RAMBLA *et al.*, 1999).

### **3.5 Caldo de cana**

O caldo de cana está presente nos nós e entrenós dos colmos da cana-de-açúcar. A fase sólida da cana é composta por um complexo pentosana e lignocelulósico, integrado por fibras celulósicas que formam os nós e entrenós. A fase líquida é o caldo extraído dos colmos. Esta é uma solução aquosa que contém grande variedade de compostos orgânicos e inorgânicos sendo que desses 90%, aproximadamente, são os açúcares. O caldo de cana sai no processo de extração, principalmente por moendas. O caldo pode ser descrito como líquido açucarado, de coloração escura, podendo variar da cor parda ao verde escuro podendo ser espumoso e viscoso (SPENCER & MEADE, 1967 apud HAMERSKI, 2009).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material**

Para este trabalho o microrganismo utilizado foi a levedura da espécie *Rhodotorula* sp, doada pela Embrapa Agroindústria Tropical, Ceará.

Os equipamentos e reagentes necessários estavam disponíveis nos laboratórios da UTFPR Câmpus Campo Mourão.

O caldo de cana foi doado pela Usina 7 Primos, de Moreira Sales/ PR.

O melaço foi doado pela USAÇÚCAR - Usina Santa Terezinha.

### **4.2 Métodos**

#### **4.2.1 Preparação do inóculo**

##### **4.2.1.1 Meio de Inóculo e Propagação (multiplicação)**

O meio para obtenção do inóculo utilizado nesse trabalho foi composto de 25 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de levedura, 2 g/L de  $K_2HPO_4$ , 2 g/L de  $KH_2PO_4$ , 0,1 g/L de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , em água destilada e esterilizados por 15 min. em  $121^\circ C$ . Foram preparados 4 erlenmeyers cada um com 100 mL de meio. Após o preparo e esterilização do meio, em câmara de fluxo laminar, realizou-se a inoculação, com uma alça de Drigalsky transferindo-se assepticamente uma alçada do microrganismo (que foi recebido em tubos de falcom, mantido em ágar inclinado) para o meio de inóculo contido no erlenmeyer. Então os erlenmeyers foram fechados com bonecas, envoltas com papel Kraft e fita adesiva e colocados um banho termostaticado com agitação controlada (Marca: Dist. Moldelo: MOD- DI- 950M) por 48 horas a  $30^\circ C$  e 150 rpm. Após este período pôde-se perceber o crescimento do microrganismo pela coloração alaranjada do meio conforme Figura 9.

A solução de inóculo obtida foi analisada para determinação da concentração de microrganismo, conforme descrito no item 4.3.1.



**Figura 9.** Meio de inoculo e propagação após 48 horas de fermentação.

#### **4.2.1.2 Técnicas de manutenção do microrganismo**

O meio de manutenção apresentou composição contendo 12 g/L de ágar, 10 g/L de peptona e 20 g/L de dextrose. Após pesados os componentes. Foram dissolvido em 200 mL água destilada e aquecido por 5 minutos no microondas, para total dissolução, o meio foi colocado em tubos de ensaio com tampa (25 x 150 mm) e esterilizados a 121 °C durante 15 minutos em autoclave. Após a esterilização, inclinou-se em bancada até completo resfriamento. Na câmara de fluxo laminar, em volta da chama do bico de Bunsen, realizou-se o estriamento do inóculo (obtido conforme o item 4.2.1.1) com o auxílio da alça de Drigalsky. Após inoculação no ágar, o crescimento ocorreu em uma estufa bacteriológica (Marca: ACB LABOR. Modelo: Incubadora tipo B.O.D) a 30°C durante 3 a 5 dias. Posteriormente os tubos foram estocados no refrigerador.

## 4.2.2 Meio de Cultivo e Fermentação

Utilizou-se melaço e caldo de cana-de-açúcar hidrolisado como meio de cultura; e empregou-se também um meio sintético para comparação dos resultados.

As fermentações foram realizadas em duas bateladas:

- Primeira batelada: foram preparados 3 meios a partir do melaço com concentrações 25%, 50% e 75% (v/v), segundo (OLIVEIRA, 2010) hidrolisados; um meio a partir de caldo de cana hidrolisado; assim tem-se 4 meios diferentes que foram preparados em duplicata, além destes preparou-se também um meio sintético. Então nesta 1ª batelada tinha-se 9 fermentações ocorrendo simultaneamente em um banho com temperatura e agitação controladas. Para esta 1ª batelada foram realizadas análises periódicas de concentração de AR; microrganismo e pH.
- Segunda batelada: Para a segunda batelada realizou-se o mesmo procedimento de preparo dos meios. Mas obtendo apenas 5 fermentações (1 de cada), logo não foram feitas em duplicata. Para a segunda batelada foram realizadas as análises de concentração de AR; microrganismo e pH, somente no final da fermentação, após 88 horas.

### 4.2.2.1 Preparo dos meios de cultivo:

- **Melaço hidrolisado:** foram realizadas diluições do melaço á 25%, 50%, 75% (v/v) com água destilada, estas soluções foram acidificadas até pH 2,0 com HCl 5 N, em temperatura ambiente e foram mantidas em banho com água fervente por 40 min. Após esta etapa as soluções foram resfriadas em banho de água com gelo, por 5 min e ajustou-se o pH para 6,0 com NaOH 1 N, em temperatura ambiente. Após o processo de hidrólise as soluções foram centrifugadas em centrífuga refrigerada (Marca: Novatécnica . Modelo: NT 825), a 6000rpm, por 30 min à 10°C. O precipitado foi descartado e as soluções sobrenadantes foram armazenadas em frasco âmbar, na geladeira.

As soluções de melaço foram analisadas em relação à concentração de açúcares redutores, de acordo com a metodologia de DNS.

- **Caldo de cana hidrolisado:** o caldo passou pelo mesmo processo de hidrólise do melaço e determinação de açúcar redutor.
- **Meio de cultivo sintético:** empregou-se o mesmo meio utilizado para a preparação do inóculo a seguinte formulação: 25 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de levedura, 2 g/L de  $K_2HPO_4$ , 2 g/L de  $KH_2PO_4$ , 0,1 g/L de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ . Os componentes foram pesados em balança analítica, e diluídos em água destilada, após 135 mL do meio de cultivo foi adicionado em erlenmeyer de 250 mL e esterilizado, por 15 minutos à  $121^\circ C$  e resfriados em fluxo laminar.

#### 4.2.2.2 Fermentação

Em erlenmeyers de 250 mL, foram adicionados 135 mL de melaço de cana hidrolisado nas concentrações de 25%, 50% e 75%, bem como de caldo de cana hidrolisado, todos em duplicata, então, procedeu-se à esterilização destes por 15 min. à  $121^\circ C$  e após foram resfriados em fluxo laminar. Os meios de cultura preparados com melaço e caldo de cana, bem como o sintético foram inoculados com 15 mL do meio de inóculo, conforme o item 4.2.1.1. Após a inoculação, os frascos foram tampados com boneca e permaneceram em banho termostático sob agitação (Marca: Dist. Modelo: MOD- DI - 950M), mantido à temperatura constante de  $30^\circ C$ , velocidade de agitação de 150 rpm, por 88 horas para que a fermentação ocorresse. A Figura 10 apresenta os meios após a fermentação.



**Figura 10.** Meio de cultivo após 88 horas de fermentação

#### **4.2.3 Acompanhamento do processo fermentativo**

A 1ª batelada foi acompanhada retirando-se amostras de todos os meios estudados, bem como do sintético, em períodos de 7 e 16 horas. Nestes períodos de tempo foram determinados: pH, concentração de microrganismo e concentração de açúcar redutor, apresentados no item 4.3.

A 2ª batelada ocorreu em sistema fechado, às análises foram feitas somente após 88 horas de fermentação. Onde foram determinados: pH, concentração de microrganismo e concentração de açúcar redutor, apresentados no item 4.3.

#### **4.2.4 Extração dos carotenóides**

Após o período de fermentação com todos os caldos fermentados foi realizada a extração dos carotenóides empregando 3 metodologias afim de se verificar a mais eficiente. As extrações realizadas seguem a metodologia de OLIVEIRA, 2010.

- Extração com acetona e éter de petróleo: Foram centrifugados 20 mL de cada meio fermentado, por 30 minutos a 6000 rpm e 10 °C em centrífuga refrigerada (Marca: Novatécnica. Modelo: NT 825), afim de concentrar as células do fermentado. Após o sobrenadante foi descartado e adicionado de 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 10 mL do solvente na razão 1:1 (v/v) acetona/éter de petróleo agitado em vortex por 1 minutos e centrifugado por 30 minutos. Os sobrenadantes foram armazenados em tubos de ensaio com tampa para a determinação de carotenóides. Esse procedimento foi repetido até que a biomassa se tornou de coloração branca.
- 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 com ultrassom por 10 min.
- Extração com Dimetilsufóxido (DMSO): Foram centrifugados 20 mL de cada meio fermentado, por 30 minutos a 6000 rpm à 10 °C em centrífuga refrigerada (Marca: Novatécnica, Modelo: NT 825), afim de concentrar as células do fermentado. Após o sobrenadante foi descartado, e adicionando-se 10 mL de água destilada, agitou-se em vortex e centrifugou-se novamente por 30 minutos. Então o sobrenadante era descartado. Foram adicionados 2,5 mL de DMSO, aquecido a 55°C em banho-maria. Após foram levados em agitador de tubo vortex (Marca: Biomixer, Modelo: QL-901), por 1 minuto e então foram centrifugados em centrífuga refrigerada (Marca: Novatécnica, Modelo: NT 825), por 10 min. 6000 rpm e 10 °C. Armazenou-se o sobrenadante em tubos de ensaio com tampa e adicionou-se a biomassa 5mL de uma mistura de éter de petróleo e acetato de etila na proporção 1:1 (v/v), agitado no vortex por 1 min e centrifugado por 5 min. 6000 rpm a 10 °C e armazenado com o anterior. Esse procedimento foi repetido mais 2 vezes, até que o sobrenadante guardado

ficaram com a coloração rosa e a biomassa se tornasse branca ao perder o caroteno.

Ao término dos processos de extração as amostras foram analisadas em espectrofotômetro UV- VIS (Marca: OceanOptics. Modelo: USB 650) à 450 nm para quantificar os carotenoides produzidos e extraídos. Para tanto foi necessária construção de uma curva de calibração conforme apresentado no item 4.3.1.3.

### **4.3 Métodos Analíticos**

#### **4.3.1 Curvas de calibração**

Conforme já mencionado para acompanhar o processo fermentativo foram realizadas análise de quantificação de microrganismo e açúcares redutores (AR); e após a extração dos carotenóides estes também foram quantificados. Para estas 3 técnicas de quantificação foi necessário primeiramente construir curvas de calibração.

##### **4.3.1.1 Curva de calibração do microrganismo**

Este procedimento foi realizado de acordo com o Método Indireto de Medida do Crescimento por Turbidimetria, descrito por MASSAGUER (2005), com modificações. Para a construção da curva de calibração do microrganismo um tubo de ensaio foi seco em estufa à 120°C por 24h depois mantido em dessecador até temperatura ambiente e então pesado em balança analítica (M1). Neste tubo adicionou-se uma amostra de 10 mL do meio do inóculo previamente preparado conforme item 4.2.1.1, procedeu-se à centrifugação por 10 min. à 4000 rpm. descartou-se o sobrenadante, e procedeu-se a lavagem da biomassa com 10 mL de água destilada, agitando em vortex e centrifugando novamente por 10 min. à 4000 rpm, descartou-se o sobrenadante e o procedimento foi repetido mais uma vez, descartando o sobrenadante ao término da lavagem. Então colocou-se o tubo de

ensaio sem tampa na estufa de secagem à 120°C, até peso constante (M2). Pela diferença de massa (Equação 1) determinou-se a concentração de microrganismo na solução de inóculo.

$$\text{Conc. MO} = \frac{M2-M1}{V} \quad (1)$$

Onde: M1 = massa do tubo vazio; M2 massa do tubo com a biomassa seca; V = volume da alíquota de inóculo empregada para a análise.

Conhecendo a concentração de microrganismo na solução de inóculo foram preparadas várias soluções de concentração diferentes e conhecidas às quais foram analisadas por espectrofotometria a 570nm (Marca: OceanOptics. Modelo: USB 650), com as leituras de absorvância para as várias concentrações preparadas foi possível construir uma curva de calibração, empregada para acompanhar o crescimento do microrganismo durante a fermentação.

#### **4.3.1.2 Curva de calibração de açúcares redutores (AR)**

Para a construção da curva de calibração de AR, empregou-se a metodologia de DNS (MALDONE, CARVALHO & FERREIRA, 2013) para tanto foi necessário preparar 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 soluções diluídas com concentrações conhecidas. Após o preparo das soluções 1 mL de cada solução foi adicionada em um tubo de ensaio, então adicionou-se 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; adicionou-se 16 mL da solução de tartarato duplo de sódio e potássio homogeneizados e então realizou-se 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 várias concentrações preparadas foi possível construir uma curva de calibração de concentração de açúcar redutor (AR)

por absorvância, obtendo-se uma correlação linear através do programa Microsoft Excel versão 7.0. Foi gerada uma equação da reta utilizada para a determinação da concentração de açúcar redutor nos melaços, caldo de cana e meio sintético durante a fermentação.

#### **4.3.1.3 Curva de calibração de Betacaroteno**

Para a construção da curva de calibração de Betacaroteno, utilizou-se Betacaroteno da SIGMA (corantes e reagentes). Preparou-se uma solução de betacaroteno em acetona e éter de petróleo na proporção 1:1 (v/v). Seguiu-se a preparação de várias diluições com concentrações conhecidas. Realizou a leitura em UV-VIS (Marca: OceanOptics. Modelo: USB 650), à 450nm. Com os valores de absorvâncias obtidas através da leitura, foi construído um gráfico de concentração por absorvância, obtendo uma correlação linear, através do Microsoft Excel versão 7.0. Que gerou a equação da reta e o  $R^2$ . Através da equação da reta, foi possível quantificar os carotenóides produzidos durante a fermentação e posteriormente extraídos.

#### **4.3.2 Análises de acompanhamento dos processos fermentativos**

##### **4.3.2.1 Determinação do pH**

Mede a atividade do ion-hidrogênio, ou seja, a acidez do meio. Pode-se, genericamente, definir pH como a relação numérica que expressa o equilíbrio entre os ions  $H^+$  e os  $OH^-$ . A escala de pH vai de 0 a 14 (PEIXOTO, 2008).

Para a medida de pH das amostras dos meios fermentados o pHmetro (Marca: MS Tecnoyon. Modelo: MPA – 210) foi calibrado, após, o eletrodo foi lavado com água destilada, seco com papel macio, e introduzido no meio fermentado, para medir o pH.

#### 4.3.2.2 Determinação da Concentração de Microrganismo

Para a determinação da concentração de microrganismo, coletou-se 1 mL dos meios fermentados, transferiu-se para tubo com rosca e adicionou-se 9 mL de água e centrifugou em centrífuga (Modelo: HT) por 15 min, 4000rpm. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se mais 10 mL de água no precipitado, agitado em vortex e centrifugou por mais 15 min, 4000 rpm. Após, descartou o sobrenadante e adicionou 5 mL de água, agitou-se no vortex e realizou-se as leituras de absorvâncias em 570nm, utilizando o UV-VIS. A concentração de microrganismo foi calculada através da equação da reta, obtida através da construção da curva de calibração de microrganismo. A concentração de microrganismo, foi calculada através da equação 2, com  $R^2 = 0,97$ .

$$y = 227,63x - 12,61 \quad (2)$$

Onde: x = absorvância á 570 nm e y= concentração de microrganismo ( $\mu\text{g/mL}$ )

#### 4.3.2.3 Determinação da concentração de açúcar redutor

Para a determinação de açúcar redutor, utilizou-se 5 mL do meio fermentado, foram adicionadas em tudo de ensaio com tampa, e centrifugados por 15 min, 4000 rpm. Após centrifugado, coletou-se 1 mL do sobrenadante e adicionou-se em um balão volumétrico de 250 mL e completou-se o volume com água destilada e homogeneizou, coletou-se 1 mL e adicionou em um tudo de ensaio sem tampa e em seguida adicionou 1 mL do reagente DNS e permaneceu em banho de água fervente por 5 min, após o tempo determinado, retirou-se e resfriou em banho de água com gelo por 5 min e adicionou 16 mL de tartarato duplo e realizou-se a leitura em UV-VIS, comprimento de onda 540 nm. A concentração de açúcar redutor, foi calculada através da equação 3 com  $R^2 = 0,9949$ , obtida da curva de calibração de AR.

$$y = 1,9151x + 0,1049 \quad (3)$$

Onde: x = concentração de AR (g/mL) e y = absorvância à 540nm

#### 4.3.2.4 Determinação de carotenóides

Após a extração dos carotenóides de acordo com as 3 metodologias descritas no item 4.2.4, as amostras foram analisadas com as leituras em UV-VIS (Marca: OceanOptics. Modelo: USB 650), com comprimento de onda 450 nm. Foi preparado o branco, onde era constituído de solvente razão 1:1 (v/v).

$$y = 9,8167x + 0,6399 \quad (4)$$

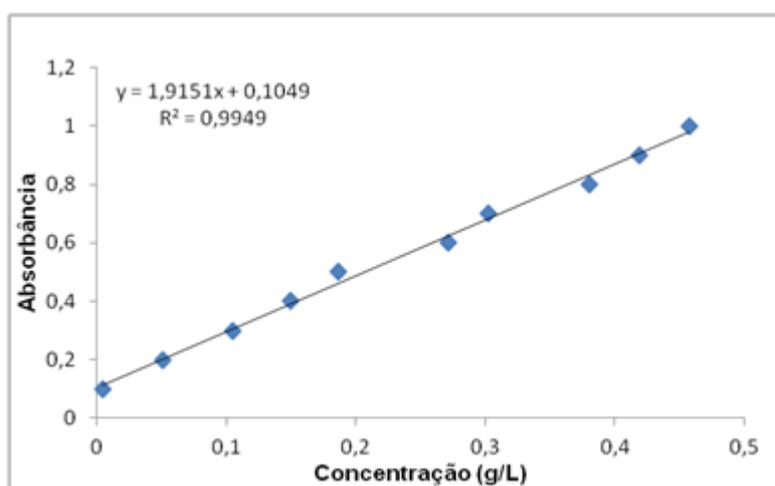
Onde: x = concentração de carotenóides ( $\mu\text{g/mL}$ ) e y = absorvância á 450nm

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

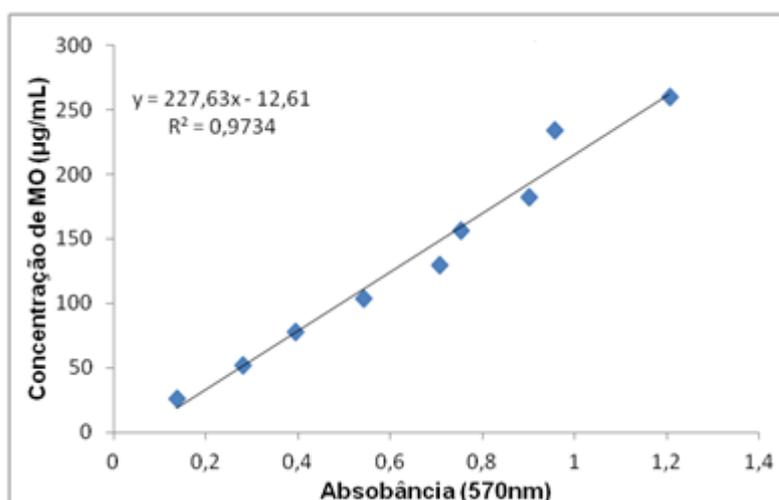
### 5.1 Curvas de calibração

Conforme foi dito foram construídas 3 curvas de calibração para possibilitar a quantificação de AR, microrganismo e carotenóides.

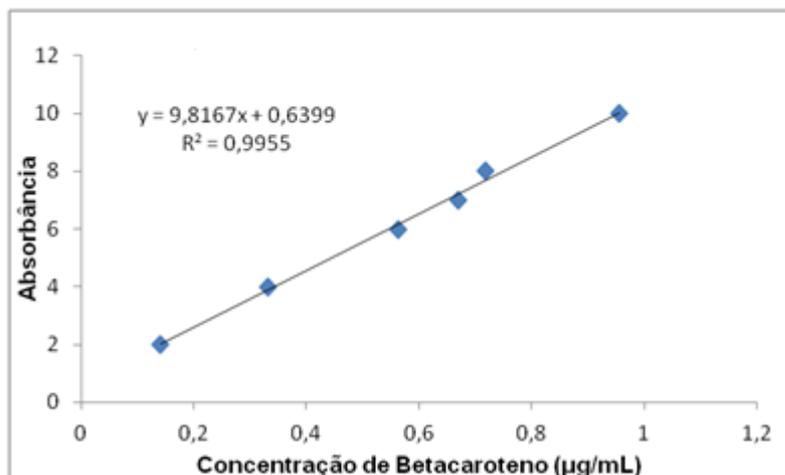
As figuras 11, 12 e 13 apresentam, respectivamente, as curvas de calibração de AR, biomassa (microrganismo) e carotenóides.



**Figura 11.** Curva de calibração de açúcar redutor (AR)



**Figura 12.** Curva de calibração de microrganismo

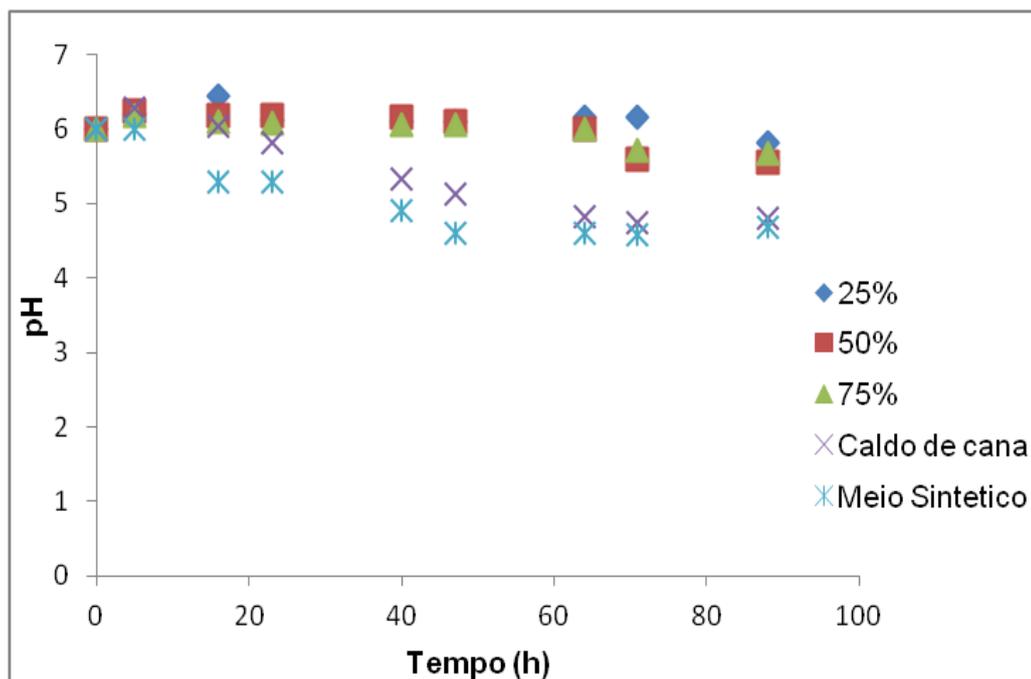


**Figura 13.** Curva de calibração de Betacaroteno

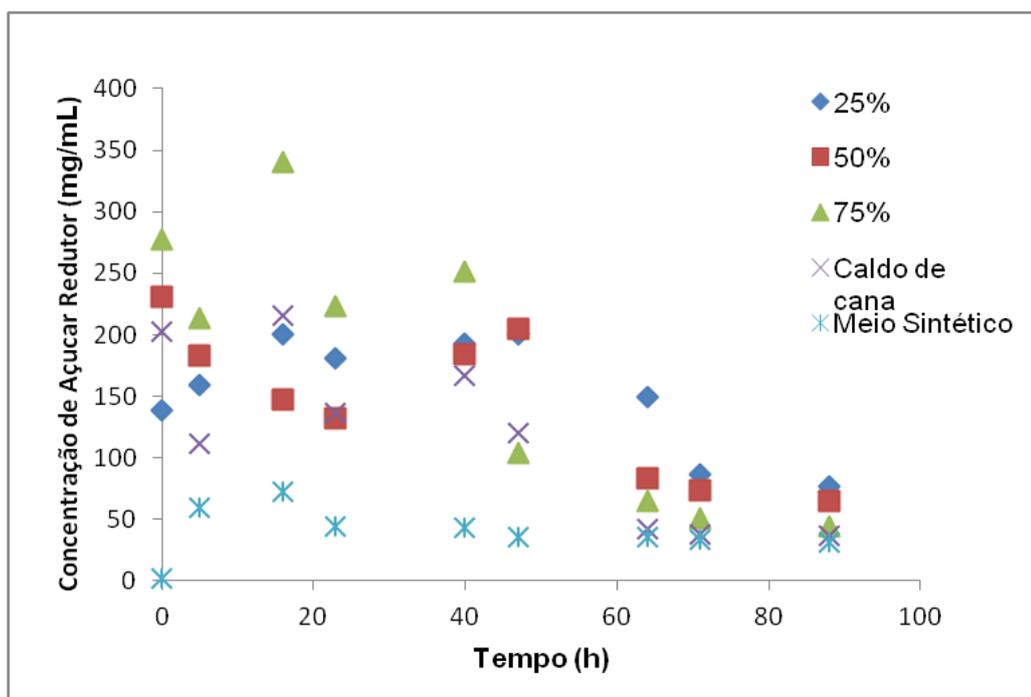
O valor de  $R^2$  varia no intervalo de 0 a 1. Valores próximos de 1 indicam que o modelo proposto é adequado para descrever o fenômeno. Quando analisamos as figuras 11,12 e 13 podemos observar que os valores de  $R^2$ , estão próximo de 1. Assim, podemos concluir que obtivemos ótimos resultados para as curvas de calibração.

## 5.2 Resultados da 1ª Batelada

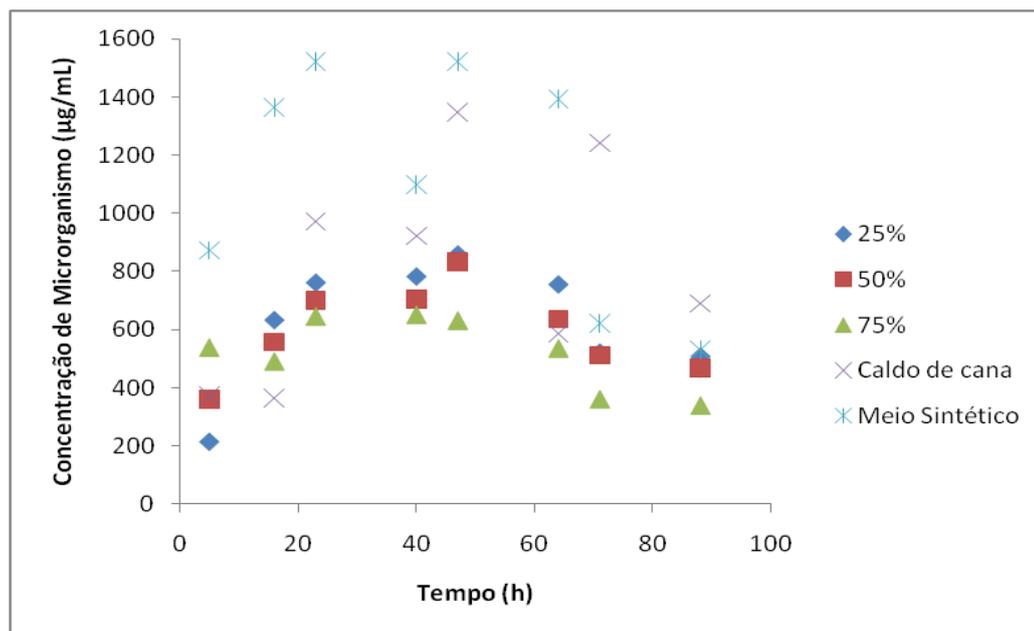
Durante a primeira fermentação (1ª batelada) avaliou-se: pH, concentração de açúcar redutor (AR), concentração de microrganismo (MO), durante os 5 dias de fermentação (onde foram coletadas amostras às 08:00 horas da manhã e às 15:00 horas da tarde) e a extração de carotenóides, realizada ao final da fermentação. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 14,15 e 16 e na Tabela 1.



**Figura 14.** Resultado do acompanhamento do pH, das diferentes concentrações de melão, caldo de cana e meio sintético, durante a fermentação.



**Figura 15.** Resultado do acompanhamento da concentração de açúcares redutores, das diferentes concentrações de melão, caldo de cana e meio sintético, durante a fermentação.



**Figura 16.** Resultados do acompanhamento da concentração de microrganismo das diferentes concentrações de melaço, caldo de cana e meio sintético durante a fermentação.

**Tabela 1.** Extração de carotenóides com: Acetona /éter de petróleo, Acetona/éter de petróleo e ultrassom, e Extração com DMSO

Meio	Concentração de carotenóides (µg/mL)		
	Extração acetona/éter de petróleo	Extração acetona/éter de petróleo e ultrassom	Extração DMSO
Caldo	2,33	2,45	3,57
Melaço 25%	2,77	3,05	1,90
Melaço 50%	2,19	2,49	2,05
Melaço 75%	1,65	2,16	0,73
Meio sintético	4,27	4,08	1,10

Pode-se observar na Figura 14, que o pH, obteve um baixo decréscimo durante a fermentação, em relação ao pH inicial. O caldo de cana e o meio sintético foram os que mais apresentaram decréscimo. Verifica-se ainda que houve um decréscimo e depois este permaneceu constante concordando com a literatura que mostra que a biossíntese dos carotenóides naturalmente ocasiona mudanças no pH do meio de cultivo, como consequência do crescimento de leveduras. De modo geral o pH do meio decresce nas primeiras 72 horas de bioprodução, seguindo de uma elevação na fase intensa de carotenogênese, e a partir daí o pH permanece constante indicando o final da bioprodução (FRENGOVA, 1994 apud VALDUGA *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos para açúcar redutor (Figura 15), não permitem conclusão. Não houve seqüência lógica nos resultados, hora aumentando, hora diminuindo.

Mas comparando o início com o final da fermentação, verifica-se que houve decréscimo, salientando-se a manutenção dos valores para os dois últimos pontos para todos os meios estudados, sugerindo término da fermentação.

Altas concentrações de glicose inibem a respiração e favorecem a fermentação, portanto a concentração de biomassa não aumenta para altas concentrações de glicose na mesma velocidade que em baixas concentrações de glicose (MIGUEZ *et al.*, 2003) isso pode estar ocorrendo nos meios com 50 e 75% de melaço, conforme mostra a Figura 16.

Analisando a Figura 16, observa-se que o meio sintético e o caldo de cana apresentaram maior desenvolvimento da levedura *Rhodotorula* sp, seguindo da concentração de melaço 25%, 50% e 75%. Sendo assim, podemos sugerir que em altas concentrações de açúcares, o desenvolvimento da levedura é menor.

Segundo WALKER (1998), devido ao Efeito Crabtree que algumas leveduras desenvolvem, em condições de baixa concentração de açúcares, ocorrendo favorecimento do processo de respiração e assim multiplicando-se em maiores taxas.

Segundo VALDUGA (2009), na bioprodução de carotenóides por *P. rhodozyma*, verificou-se que altas concentrações de glicose inibem a carotenogênese, isso pode ser observado na Tabela 1 em que a concentração de carotenóides para 50% e 75% de melaço é menos comparando aos outros meios.

Através da Tabela 1, podemos observar que a extração dos carotenóides realizada com acetona/éter de petróleo e ultrassom mostrou-se o processo mais eficiente, através do qual obteve-se maiores concentrações de carotenóides para todos os meios estudados; seguindo a extração com acetona/éter de petróleo e por último a extração com DMSO, exceto para o caldo que pode-se verificar o inverso.

Esse resultado concorda com OLIVEIRA, (2010) onde através da extração com solvente e ultrassom de betacaroteno produzido por *Rhodotorula glutinis*, tendo como substrato o suco de caju, obteve melhores resultados.

### 5.3 Resultados da 2ª Batelada

Na 2ª batelada (segunda fermentação) foram avaliados a concentração de açúcar redutor, concentração de microrganismo e pH, antes e após a fermentação, os resultados são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Concentração de Açúcar Redutor, concentração de Microrganismo e pH, referente a segunda fermentação.

Meio	A.R - Inicial (mg/ mL)	A.R – Final (mg/mL)	pH Inicial	pH Final	M.O - Inicial(µg/mL)	M.O - Final(µg/mL)
Caldo	202,88	181,34	6,00	5,31	520	2.796,1
25%	139,21	137,77	6,00	5,47	520	1.200,65
50 %	231,13	222,03	6,00	5,59	520	1503,8
75%	277,09	180,34	6,00	5,31	520	1053,25
Meio sintético	*	31,49	6,00	5,43	520	2.931,9

\*não foi possível realizar a análise

Através da Tabela 2, pode-se observar que a concentração de açúcar redutor e pH, diminuíram durante a fermentação como era esperado. As concentrações de microrganismo para o caldo de cana e o meio sintético aumentaram, porém para melaço com 75% foi o menor acréscimo, para os meios contendo melaço verificou-se um decréscimo na concentração de microrganismo, sugerindo a morte da levedura. Pode-se sugerir mais uma vez que altas concentrações de AR interferem negativamente no crescimento do microrganismo.

A Tabela 3 apresenta os resultados referentes à extração de carotenóides para a 2ª batelada.

**Tabela 3.** Extração de Carotenóides com: Acetona/éter de petróleo, Acetona/éter de petróleo e ultrassom e extração com DMSO.

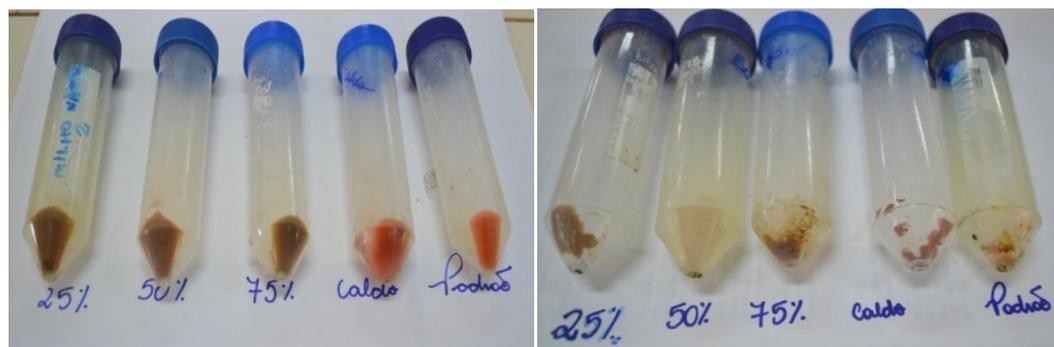
<b>Meio</b>	<b>Concentração de carotenóides (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>		
	<b>Extração acetona/éter de petróleo</b>	<b>Extração acetona/éter de petróleo e ultrassom</b>	<b>Extração DMSO</b>
Caldo	1,05	1,08	0,91
Melaço25%	1,04	1,00	0,89
Melaço 50%	1,03	0,97	2,70
Melaço 75%	0,82	0,73	0,70
Meio Sintético	4,06	3,23	0,94

Com esses resultados pode-se verificar que a extração com Acetona/Éter de petróleo, mostrou-se mais eficiente, onde obteve-se uma maior extração de carotenóides. Entretanto, quando compara-se os valores de extração com ultrassom, não há uma grande diferença, sugerindo que ambos acetona/éter de petróleo com ou sem ultrassom é mais eficiente que o DMSO.

Comparando os resultados da extração da 2ª batelada (Tabela 3) com a 1ª batelada (Tabela 1) observa-se maiores concentrações de carotenóides para os três métodos de extração e todos os meios na 1ª batelada, sugerindo que a fermentação durante a 2ª batelada não aconteceu de forma eficiente, podendo ter ocorrido algum problema com agitação ou até mesmo temperatura, já que o ambiente estava muito quente devido à temperatura de verão e o banho estava na verdade funcionando como um banho para refrigeração, visto que a temperatura deste era menor que a do ambiente.

Segundo OLIVEIRA (2010) quando utilizou a extração apenas com solvente extraiu uma pequena quantidade de carotenóides e observou que a técnica de extração, pôde ser melhorada com a utilização do ultrassom. Já para este estudo, isso só ocorreu na 1º Batelada, na 2º batelada a extração com acetona e éter de petróleo foi mais eficiente podendo-se sugerir que não há diferença com ou sem ultrassom.

As Figuras 17, 18 e 19, apresentam fotos da biomassa obtida das fermentações na 2ª batelada antes e após os métodos de extração de carotenóides.



(a) Antes da extração

(b) Depois a extração

**Figura 17:** Extração de carotenóides com acetona/éter de petróleo

(a) Antes da extração

(b) Depois a extração

**Figura 18:** Extração de carotenóides com acetona/éter de petróleo e ultrassom.

(a) Antes da extração

(b) Depois a extração

**Figura 19:** Extração de carotenóides com DMSO.

Analisando as figuras 17, 18 e 19, observar-se que a extração com acetona e éter de petróleo, descorou mais a biomassa, concordando com os resultados de quantificação de carotenóides.

Devido a alta volatilidade dos solventes a massa de microrganismo dentro dos tubos de centrifuga, após a extração não permanecia depositada no fundo do tubo, a massa ficava pulverizada e espalhava dentro dos tubos; devendo-se portanto se ater a cor da massa ou do pó.

Através da Figura 17, observa-se que houve mais descoloração para a biomassa dos meios sintéticos e caldo de cana comparando com a Tabela 3 verifica-se que para estes meios tem-se maiores quantidades de carotenóides extraídos por acetona /éter de petróleo, portanto as análises quantitativas e visuais se complementam.

A coloração do meio de cultivo também implica nos resultados da extração dos carotenóides, pois ao realizar a centrifugação com água para possível eliminação do melaço, não é possível eliminar 100% da cor do melaço visto que pode ocorrer perda de massa de microrganismo, obtendo resultados incertos ao final da extração.

As extrações apresentaram resultados baixos sugerindo a necessidade de maior tempo de contato do solvente com massa de microrganismo, para uma melhor extração de carotenóides ou ainda deixar a biomassa e o solvente mais tempo no ultrassom.

## 6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos verificou-se a possibilidade de obter carotenóides utilizando *Rhodotorula* sp. em meio de melaço de cana-de-açúcar e caldo de cana.

Pôde-se observar que a concentração de açúcar redutor inicial interfere no processo fermentativo e conseqüentemente na produção de biomassa e carotenóides, podendo sugerir que baixas concentrações de melaço são mais adequadas.

Dentre os meios de cultivo estudados, a levedura *Rhodotorula* sp. obteve melhor desenvolvimento no caldo de cana, seguindo das concentrações, 25%, 50% e 75%, de melaço pode-se concluir, que a levedura se desenvolveu melhor, em baixas concentrações de açúcares, bem como foi capaz de produzir mais carotenóides.

O método de extração com acetona e éter de petróleo foi o que proporcionou melhores resultados para a extração dos carotenóides, independente do uso de ultrassom. Já o método DMSO, foi o menos eficiente neste trabalho.

## 7. SUGESTÕES PARA NOVOS TRABALHOS

- Realizar uma clarificação do meio de cultivo, para melhor visualização, pois, devido o melaço de cana-de-açúcar ser um produto de coloração escura, isso dificultou a visualização do desenvolvimento do microrganismo através da mudança de coloração do meio, na produção de carotenóides.
- Testar menores concentrações de melaço, logo como pode ser visto no trabalho, altas concentrações de melaço resultou em baixo desenvolvimento da levedura e baixa produtividade de carotenóides.
- Testar menores pH.
- Utilizar maiores concentrações de inóculo.
- Testar extração com rompimento celular.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, G. M. D. **Rhodotorulas pp. Isoladas de hemocultura no hospital das Clinicas da Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo: Característica clinica e microbiológicas.** 2005. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

AMBRÓSIO, C. L. B.; FARO, Z. P.; CAMPOS, S. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista Nutrição On-Line.**, Campinas, v. 2 , n. 19, p. 233-243, Mar/Abr. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rn/v19n2/a10v19n2.pdf>. Acesso em: 14. Jan. 2014.

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/anvisalegis/resol/44\\_77.htm](http://www.anvisa.gov.br/anvisalegis/resol/44_77.htm). Acesso em: 13. Jan. 2014.

ARAÚJO, M. E. M. **Corantes naturais para têxteis – da antiguidade aos tempos modernos.** 2005. 30 f. Texto de apoio DQB (Mestrado em Química Aplicada ao Patrimônio Cultural) – Faculdade de Ciências Universidade de Lisboa. Disponível em: <http://www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/portals/pde/arquivos/2160-8.pdf>. Acesso em: 28 de Jan. 2014.

AUSICH, R. L. Comercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. **Revista Pure and Applied Chemistry On-Line.**, Estados Unidos, v. 69, n. 10, p. 2169-2173. 1997. Disponível em: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.318.3401&rep=rep1&type=pdf>. Acesso em: 30. Jan. 2014.

BRANCO, L. S. C.; ALMEIDA, M. M. T.; CAETANO, T. M.; PINTO, G. A. S.; AZEREDO, H. M. C. **Estudo da ampliação de escala na produção de biomassa de Rhodotorula sp. CNPAT02 em processo batelada para obtenção de carotenóides.** CBOQ – Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2010.

CARVALHO, J. C.; PANDEY, A.; OISHI, B. O.; BRAND, D.; RODRIGUEZ-LÉON, J. A.; SOCCOL, C. R. Relation between growth, respirometric analysis and biopigments production from *Monascus* by solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal.** Curitiba, 15 abr, v. 29, p. 262-269, 2006.

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.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

FONTANA, J. D.; MENDES, S. V.; PERSIK, D. S.; PERACETTA, L. F.; PASSOS, M. Carotenóides: Cores atraentes e ação biológica. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 232, p. 15574-15586. 1997.

HAMERSKI, F. **Estudo de variáveis no processo de carbonatação do caldo de cana-de-açúcar**. 2009. 142 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

KAPOR, M. A.; YAMANAKA, H.; CARNEIRO, P. A.; ZANONI, M. V. B. Eletroanálise de corantes alimentícios: determinação de índigo carmim e tartrazina. **Revista Eclética Química**, São Paulo, v. 26, n.1, p. 53-68, 2001.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia: Tecnologia das Fermentações**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1975.

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.

MASSAGUER, P. R. **Microbiologia dos processos Alimentares**. 4 ed. São Paulo: Varela, 2005.

MENDONÇA, J. K. **Identificação e Isolamento de corantes naturais produzidos por Actinobactérias**. 2011. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

MIGUEZ, M. F. S.; FILOMENA, P. F. A.; ALICE, M. Z. C.; QUEIROZ, O. F. A.; HELENA, M. M. R. L. **Determinação de Parâmetros Cinéticos de uma Nova *Saccharomyces cerevisiae*, construída para exibir alta capacidade respiratória na presença de açúcar repressor**. SINAFERM. *In: XIV Congresso Nacional de Fermentação*. v. 1, p. 1-6. Florianópolis, 2003.

MORAES, F, L. **Carotenóides: características biológicas e químicas**. 2006. 47 f. Monografia (Especialização em Qualidade em Alimentos) – Centro de Excelência em Turismo, Universidade de Brasília, 2006.

OLIVEIRA, C. G. **Extração e caracterização do betacaroteno produzido por *Rhodotorula glutinis* tendo como substrato o suco de caju**. 2010. 31 f. Trabalho de conclusão de curso de (Graduação em Engenharia Química) – Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

OLIVEIRA, R. F.; SOUSDALEFF, M.; LIMA, M. V.S. LIMA, H. O. S. Produção fermentativa de ácido láctico a partir do melaço da cana-de-açúcar por *Lactobacillus casei*. **Brazilian Journal Of Food Technology**., p. 36- 39, 2009. Disponível em: [http://bjft.ital.sp.gov.br/artigos/especiais/especial\\_2009\\_2/v12ne\\_t0081.pdf](http://bjft.ital.sp.gov.br/artigos/especiais/especial_2009_2/v12ne_t0081.pdf). Acesso em: 09. Jan. 2014.

PAZZOTI, G. S.O. Utilização de corantes na indústria que processa balas, pirulitos e chicletes. **Revista científica UNILAGO**, 2011. Disponível em: <http://www.unilago.edu.br/revista/edicaoatual/sumario/downloads/2013/UTILIZA%C3%87%C3%83O%20DE%20CORANTES%20NA%20IND%C3%9ASTRIA%20QUE%20PROCESSA%20BALAS,%20PIRULITOS%20E%20CHICLETES.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2014.

PEIXOTO, J. **Laboratório de tecnologias ambientais: Análises físico químicas, cor, turbidez, pH, temperatura, alcalinidade e dureza**. 2008. Disponível em: <http://www.biologica.eng.uminho.pt/TAEL/downloads/analises/cor%20turbidez%20ph%20t%20alcalinidade%20e%20dureza.pdf>. Acesso em: 15 de Mar. 2013.

Os corantes alimentícios. **Revista Aditivos e Ingredientes**. n. 62, mai./jun., 2009.

RAMBLA, M. A O.; PRADA, A R.; COOPAT, T. S.; CARRACEDO, G. B. **Méis. Manual dos derivados da cana-de-açúcar**. Instituto Cubano de Pesquisas dos Derivados da Cana-de-açúcar. Cap. 2.4, p. 49-55. 1999.

RIBEIRO, E. P. & SERAVALLI, E. A.G. **Química de Alimentos**. Instituto Mauá de Tecnologia. São Paulo: Edgard Blucher, 1. ed, p. 155-157, 2004.

SANTOS, A. M.; **Fermentação alcoólica com leveduras imobilizada em colmos de bambu e em fibra de coco**. 2008. 82 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Curso de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008.

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.

SOUZA, R. M. **Corantes naturais alimentícios e seus benefícios a saúde.** 2012. 60 f. Trabalho de conclusão de curso de (Graduação em Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste. Rio de Janeiro, 2012.

VALDUGA, E. **Bioprodução de compostos voláteis e carotenóides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636.** 2005. 179 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química na Sub-área de Biotecnologia) – Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

VALDUGA, E; TATSCH, P, O; TIGGEMAN, L; TREICHEL, H; TONIOZZO, G; ZENI, J; DILUCIO, M. Produção de carotenóides: Microrganismos com fonte de pigmentos naturais. **Revista Química Nova On-Line.**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2429 – 2436. 2009. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422009000900036&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422009000900036&script=sci_arttext). Acesso em: 10. Fev. 2014.

WALKER, G. M. **Yeast Physiology and Biotechnology.** England: John Wiley, 1988.