

Área: Engenharia de Alimentos

EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES PRODUZIDOS POR *XANTHOPHYLLOMYCES DENDRORHOUS* EM FRASCOS AGITADOS

Rosicler Colet¹, Daiane Trentin¹, Ana Paula Rossetto¹, Naira Carniel¹, Naiane Sabedot
Marcon¹, Clarice Steffens¹, Eunice Valduga¹, Letícia Urnau^{1*}

¹ Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências
Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS.

*E-mail: letiurnau@gmail.com

RESUMO – Os carotenoides são corantes naturais que podem ser sintetizados por plantas, algas e micro-organismos. Estes são pigmentos de grande utilização industrial e têm despertado interesse devido à preocupação com o uso de aditivos químicos nos alimentos. Os carotenoides bioproduzidos por micro-organismos estão localizados na parede celular, e a rigidez da parede de algumas leveduras muitas vezes limita a extratibilidade dos mesmos. Para a determinação de um agente de ruptura e um solvente para a extração de carotenoides do micro-organismo *Xanthophyllomyces dendrorhous* foi realizada a bioprodução em frascos agitados a 25°C e 150 rpm, por 96 horas em meio Ym. As amostras foram centrifugadas a 6500 rpm por 10 minutos para separação das células, utilizou-se células in natura e liofilizadas (em liofilizador por 36 horas). A recuperação dos carotenoides foi realizada empregando dimetilsulfóxido (DMSO) em 0,05 g de célula e homogeneizados em shaker (150rpm, 30 minutos) para ruptura celular, e a extração foi realizada com diversos solventes e combinações dos mesmos até o branqueamento total das células. A determinação dos carotenoides específicos foi espectrofotometricamente ($\lambda = 448$ nm). Utilizando-se célula in natura, o melhor resultado foi de 8,32 $\mu\text{g/g}$ e com célula liofilizada foi de 595, 31 $\mu\text{g/g}$ de carotenoides específicos, sendo estes recuperados utilizando DMSO como agente de ruptura e apenas acetona como solvente. Assim pode-se observar que a água presente nas células interfere na extração do biocorante e quando se utiliza células liofilizadas, o método aplicado faz com que a parede celular seja transpassada e os carotenoides mais facilmente liberados.

Palavras-chave: Carotenoides; Extração; *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

1 INTRODUÇÃO

Carotenoides são pigmentos lipossolúveis, sendo encontrados em fungos, bactérias, tecidos de plantas verdes e também em animais (MEZZOMO, 2012). Apresentam capacidade de corante, que provem da presença de uma longa série de duplas ligações conjugadas, que é também responsável por suas propriedades antioxidantes (MACÍAS-SANCHEZ et al. 2010).

Os carotenoides são os pigmentos mais difundidos na natureza, sendo os mais importantes β -caroteno, licopeno, luteína e zeaxantina (FILHO, et al. 2008). São corantes naturais responsáveis pelas cores vermelha, amarela e laranja, muito empregadas nas indústrias alimentícias, farmacêutica, de cosméticos e até mesmo de ração animal (RODRIGUES-AMAYA, KIMURA, AMAYA-FARFAN, 2008).

A produção biotecnológica de carotenoides para a aplicação industrial, a partir de micro-organismos, tem sido item de destaque nos últimos anos, pois a grande maioria dos carotenoides utilizados industrialmente é obtida por via química ou por extração de plantas ou algas. Devido à preocupação com o uso de aditivos químicos nos alimentos, os processos biotecnológicos para obtenção de carotenoides têm sido alvo de um crescente interesse (JOHNSON; SCHROEDER, 1995; AKSU; EREN, 2007).

A produção de carotenoides através de via microbiana constitui atualmente uma alternativa interessante devido à possibilidade da obtenção de pigmentos de origem natural em escala industrial (DA SILVA, 2004).

Há uma grande quantidade de micro-organismos com capacidade para produzir carotenoides, no entanto, nem todos são industrialmente interessantes. As leveduras destacam-se pela sua utilização como fonte proteica, capacidade de crescimento em substratos menos dispendiosos e alto teor de açúcar (VALDUGA et al, 2009).

A produção de carotenoides pelo processo biotecnológico tem sido amplamente investigada, dando destaque para a produção comercial de β - caroteno pelo fungo *Blakeslea trispora*, pelas microalgas *Dunaliella* (MACÍAS- SÁNCHEZ, 2008), a produção de astaxantina pela microalga *Haematococcus sp* (ZHANG, 2009) e pela levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* (MORIEL et al, 2004).

O interesse na produção de astaxantina por fontes naturais vem aumentando significativamente nos últimos anos, devido à possibilidade de atuar como corante e sua capacidade antioxidante biológica potente. É o carotenoide principal encontrado na levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*), sendo esse micro-organismo adequado para o uso como fonte do pigmento industrial em razão de seu metabolismo heterotrófico, padrão de crescimento relativamente rápido, qualidade nutricional e seguro como aditivo alimentar.

Dentro deste contexto, o objetivo do trabalho foi determinar um agente de ruptura e um solvente para a extração de carotenoides do micro-organismo *Xanthophyllomyces dendrorhous* em frascos agitados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Bioprodução de carotenoides

O micro-organismo utilizado foi a levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*. A produção foi realizada em frascos agitados (25°C e 150 rpm) com um volume útil de 100 mL, sem iluminação e com 10% de inóculo, durante 96 horas. Utilizou-se como meio de bioprodução o meio YM composto de 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte, 5 g/L de peptona e 10 g/L de glicose.

2.2 Preparo das amostras

As amostras foram centrifugadas a 6500 rpm por 10 minutos para separação das células. Utilizaram-se células *in natura* e liofilizadas. No caso de células liofilizadas, as mesmas foram congeladas em freezer a -80°C e secas em liofilizador durante 36 horas.

2.3 Recuperação dos carotenoides

A recuperação dos carotenoides foi realizada empregando dimetilsulfóxido (DMSO) para ruptura celular. Para extração foram utilizados diversos solventes e combinações dos mesmos.

A célula (0,05 g) foi adicionada de 2 mL de DMSO e homogeneizadas em shaker a 150 rpm por 30 minutos. Após a ruptura foi adicionado o solvente para extração dos carotenoides. A amostra foi centrifugada e as lavagens com solvente repetidas até branqueamento total da célula.

Em alguns ensaios, na fase solvente, obtida da centrifugação foram adicionados 10 mL de éter de petróleo e 10 mL de solução de NaCl (20%). Após separação das fases, adicionou-se sulfato de sódio para filtração.

A medida da concentração de carotenoides específicos foi feita em espectrofotômetro a 474 nm. O cálculo para determinação foi realizado através da Equação 1, utilizando o coeficiente de absortividade específica para xantofilas de 1600 (LIU, WU & HO, 2006).

$$\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} = \frac{A * V * 10^6}{A_{1\text{cm}}^{1\%} * 100 * m_{\text{amostra}}}$$

onde: A= absorbância; V= volume (mL); m_{amostra} = massa celular seca (g); $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ = absortividade específica.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados de carotenoides específicos bioproduzidos, utilizando DMSO como agente de ruptura celular, em células *in natura*. O melhor resultado foi obtido empregando-se acetona para extração, tendo sido de 8,32 $\mu\text{g/g}$.

Tabela 1: Carotenoides específicos obtidos a partir de célula *in natura*.

Ensaio	Solvente Utilizado	Carotenoides específicos ($\mu\text{g/g}$)
1	Tampão fosfato de sódio/ hexano: acetato de etila (1:1 v/v)	0,000494
2	Acetona: metanol (7:3 v/v)	0,00241
3	Acetona/ clorofórmio: metanol (1:1 v/v)	0,01076
4	Diclorometano: metanol (1:3 v/v)	0,00969
5	Acetona → Éter de petróleo/ Sulfato de sódio	8,32

Na tabela 2, estão descritos os resultados encontrados na utilização de célula liofilizada. Obteve-se o melhor resultado de 595,31 µg/g de carotenoides específicos, sendo este recuperado utilizando apenas acetona como solvente.

Tabela 2: Carotenoides específicos obtidos a partir de célula liofilizadas.

Ensaio	Solvente Utilizado	Carotenoides específicos (µg/g)
1	Acetona → Éter de petróleo/ Sulfato de sódio	595,31
2	Acetona: Metanol (6:4 v/v) → Éter de petróleo/ Sulfato de sódio	0,0041

Em ensaios com célula *in natura*, Valduga (2009) utilizando como micro-organismo *Sporidiobolus salmonicolor*, obteve 537 µg/ L de carotenoides totais utilizando como solvente acetona:metanol (7:3), o que demonstra, através dos resultados obtidos, que este método, quando no caso da levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* não é eficaz.

Nos ensaios utilizando células liofilizadas, Silva (2009) obteve, após uma otimização através de um planejamento de experimentos, uma recuperação de carotenoides de 350 µg/g. Os resultados obtidos nesse estudo estão em níveis já superiores, o que demonstra que, quando se utiliza células liofilizadas, o método aplicado faz com que a parede celular seja transpassada e os carotenoides mais facilmente liberados.

Observou-se que o procedimento nas fases solventes, obtidas da centrifugação, de adicionar a solução de NaCl 20% (p/v), éter de petróleo e a separação de fases através da filtração com sulfato de sódio (Na₂SO₄) foi eficaz, removendo os solventes utilizados e células em suspensão, assim tornando o corante mais puro.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho mostram que a utilização de DMSO como agente de ruptura e acetona como agente de extração para células liofilizadas do micro-organismo *X. dendrorhous* apresentam ótimos resultados de recuperação de carotenoides (595,31 µg/g). Estes resultados são promissores, quando comparados com os que são atualmente apresentados na literatura, mostrando que estes valores ainda podem ser otimizados pela utilização do planejamento de experimentos.

5 AGRADECIMENTOS

A FAPERGS/CAPES pelo suporte financeiro.

Ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos da URI.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

6 REFERÊNCIAS

- AKSU, Z.; EREN, A.T. Production of carotenoids by isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, p. 107 – 113, 2007.
- DA SILVA, M. C. **Alteração na biossíntese de carotenoides em leveduras induzidas por agentes químicos**. 2004. Tese (Doutorado em ciência de alimentos)- Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2004.
- FILHO, G. L.; DE ROSSO, V. V.; MEIRELES, M.A.A.; ROSA, P. T. V.; OLIVEIRA, A. L.; MERCADANTE, A. Z.; CABRAL, F. A. Supercritical CO₂ extraction of carotenoids from pitanga fruits (*Eugenia Uniflora* L.). **The journal of supercritical fluids**, v. 46, p 33-39, 2008.
- JOHNSON, E. A.; SCHROEDER, W. A. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 18374 – 18379, 1995.
- LIU, Y. S.; WU, J. Y.; HO, K. P. Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v.27, p.331-335, 2006.
- MACÍAS-SÁNCHEZ, M.D; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; MARTÍNEZ DE LA OSSA, E.; LUBIÁN, L. M.; MONTERO, O. Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. **Talanta**, v. 77. P. 948-952, 2008.
- MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D.; FERNANDEZ-SEVILLA, J.M.; ACIÉN FERNANDEZ, F.G.; CERÓN GARCIA, M.C.; GRIMMA, E.M. Supercritical fluid extraction of carotenoids from *Scenedesmus almeriensis*. **Food Chemistry**. V. 123, p. 928–935, 2010.
- MEZZOMO, N. Extração e encapsulamento de compostos com importância tecnológica e biológica proveniente do resíduo de processamento de camarão. **Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)** – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2012.
- MORIEL, D. G.; MACHADO, I. M. P.; FONTANA, J. D.; BONFIM, T. M. B. Optimization of biomass and astaxanthin production by the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 40, n. 3. 2004.
- RODRIGUES-AMAYA, D.B; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos**. Brasília: MMA/SBF, 2008.
- SILVA, D. A. Maximização da produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma* utilizando água de parboilização de arroz. 2009.
- VALDUGA, E.; TATSCH, P.O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, p. 2429-2436, 2009.
- ZHANG, B. Y.; GENG, Y. H.; LI, Z. K.; HU, H. J.; LI, Y. G. Production of astaxanthin from *Haematococcus* in open pond by two-stage growth one-step process. **Aquaculture**, v. 295, p. 275-281, 2009.