

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

GILDA MARIANO SILVA

Produção de biopigmentos pela levedura *Pichia kudriavzevii* cultivada em subprodutos agroindustriais

Lorena
2020

GILDA MARIANO SILVA

Produção de biopigmentos pela levedura *Pichia kudriavzevii* cultivada em subprodutos agroindustriais

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração de Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva

Versão corrigida

Lorena
2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Silva, Gilda Mariano
Produção de biopigmentos pela levedura *Pichia kudriavzevii* cultivada em subprodutos agroindustriais / Gilda Mariano Silva; orientador Silvio Silvério da Silva - Versão Corrigida. - Lorena, 2020.
176 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2020

1. Carotenoides. 2. Bagaço de cana-de-açúcar. 3. Farelo de arroz. 4. Produtos bioativos. 5. *Pichia kudriavzevii*. I. Título. II. da Silva, Silvio Silvério, orient.

À nova geração de cientistas brasileiros. Que cada profissional atuante na busca pelo conhecimento científico mantenha viva em si a chama da curiosidade genuína e abrace as incertezas e vulnerabilidades das manifestações do universo natural como parte inerente deste caminho de artesão minucioso que alinha as lentes do olhar humano em direção à lucidez.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva, por todo apoio e paciência e por nunca ter deixado de acreditar em mim.

À CAPES, pelo suporte financeiro que permitiu a realização deste trabalho. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Às agências de fomento CNPq e FAPESP (processo nº 2016/10636-8, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), por terem contribuído financeiramente com o desenvolvimento desta pesquisa.

À Universidade de São Paulo, à Escola de Engenharia de Lorena e ao Departamento de Biotecnologia, pelo fornecimento da estrutura e do suporte necessário ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores doutores Júlio Cesar dos Santos, Talita Lacerda, Maria das Graças de Almeida Felipe, Jayne Carlos de Souza Barboza, Antônio Aarão Serra e Patrícia Caroline Molgero Da Rós, que protagonizaram horas valiosas de discussão de ideais e de crescimento profissional.

À minha família de alma, por nunca deixar de oferecer conforto, compreensão, apoio, incentivos e, acima de tudo, amor. Sou infinitamente grata.

Aos amigos da bancada para a vida, Felipe, Larissa, Sara e Javier. Este trabalho não teria sido possível sem a amizade e o suporte emocional que vocês me deram. Que esse elo não se desfaça nunca.

Aos amigos do dia a dia, presentes em cada dificuldade e em cada conquista, Paulo, Rafael, Sabrina, Isabela, Salvador, Edith, Jesus, Lloyse, Avinash, Andrés, Ruly, Alesson, Carina, Bárbara, Pedro, Talita, Nayelen, Thiago e Yasmin.

Às pessoas fantásticas que me acompanharam nessa jornada, dando o melhor de si todos os dias, Fabiana, Marcela, Rodrigo, Carla e Nayara. Obrigada pela dedicação infinita.

Aos amigos que sempre deram um jeito para resolver um pouco de tudo, Nadir, Walkiria, Andrézinho, Zé Moreira e Martinha.

A todas as pessoas e companheiros animais que trouxeram, por alguns minutos ou muitas horas, momentos de reflexão, harmonia, paz, alegria, amor, tranquilidade, esperança e coragem ao prosseguimento desta jornada.

“Podemos julgar nosso progresso pela
coragem dos nossos questionamentos e pela
profundidade de nossas respostas, nossa
vontade de abraçar o que é verdadeiro ao invés
daquilo que nos faz sentir bem”.

SAGAN, C.

RESUMO

SILVA, Gilda Mariano. Produção de biopigmentos pela levedura *Pichia kudriavzevii* cultivada em subprodutos agroindustriais. 2020. 176p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

Os pigmentos naturais (biopigmentos) são cada vez mais demandados por suas propriedades biológicas e nutracêuticas. Pesquisas que contribuam para a redução de custos de produção dos biopigmentos são imprescindível para que estes sejam competitivos no mercado. O objetivo deste trabalho foi a avaliação do uso de subprodutos agroindustriais como fonte de carbono e nitrogênio para a produção de biopigmentos pela levedura *Pichia kudriavzevii* e a caracterização desses bioprodutos. A fonte de carbono renovável utilizada foi o hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar (HMBCA), enquanto que a fonte de nitrogênio complexa foi o extrato de farelo de arroz (EFA). Em cultivos submersos, avaliou-se o consumo de açúcares, o crescimento celular e a produção de biopigmentos. Paralelamente, avaliou-se a ruptura celular com nutrigênio líquido ou agitação com pérolas de vidro, assim como estudou-se combinações de solventes para a extração dos biopigmentos. O extrato dos bioprodutos foi analisado por espectrofotometria e FT-IR e teve sua atividade antioxidante determinada. A utilização de pérolas de vidro para o rompimento celular apresentou eficiência e a melhor combinação de solventes para extração dos biopigmentos foi a mistura etanol:acetato de etila 1:3 v/v. Análises espectrofotométricas e por FT-IR identificaram esses biopigmentos como carotenoides. O EFA foi considerado uma alternativa viável ao extrato de levedura, pois proporcionou resultados semelhantes de crescimento celular e a produção de carotenoides. Ao substituir-se a glicose de origem comercial pelo HMBCA, a produção de carotenoides foi menor e essa observação se correlaciona, possivelmente, ao metabolismo da xilose pela levedura e à constituição da suplementação desse meio. A partir desses resultados, verificou-se a possibilidade modificar o meio nutricional, visando à eliminação de fosfatos, sulfatos e amônio deste. Em um meio de cultivo composto apenas por HMBCA, EFA e ureia, obteve-se 19,93 mg/L de carotenoides totais, uma produtividade volumétrica de carotenoides totais de 0,17 (mg/L)/h e uma taxa de conversão de açúcares fermentescíveis em massa de biopigmentos de 0,77 mg de carotenoides totais por g de açúcares. Esses resultados foram os maiores obtidos entre todos os cultivos, inclusive comparando-se com o meio de cultivo baseado em glicose de origem comercial. Demonstrou-se a atividade antioxidante dos carotenoides (1028,25 $\mu\text{mol ET/mL}$) e o valor obtido foi semelhante a compostos antioxidantes de referência. Concluiu-se que o EFA é igualmente favorável à produção de biopigmentos em relação ao extrato de levedura. Ademais, o meio de cultivo em que a fonte de carbono foi o HMBCA e a fonte complexa de nitrogênio, o EFA permitiu um aumento da produção, produção específica, produtividade volumétrica e taxa de conversão de açúcares em biopigmentos, em relação ao meio composto por HMBCA e uma suplementação mais rica e ao cultivo realizado com glicose de origem comercial e extrato de levedura. Verificou-se que esses biopigmentos são produzidos durante as fases de crescimento exponencial e estacionária, apresentam similaridade espectral aos carotenoides e possuem atividade antioxidante. Este trabalho possibilitou a produção de biopigmentos por *P. kudriavzevii* com a utilização de subprodutos agroindustriais, a extração destes com métodos de baixo custo e se apresenta como um ponto de partida para a exploração dessas moléculas como agentes antioxidantes.

Palavras-chave: Carotenoides. Bagaço de cana-de-açúcar. Farelo de arroz. Produtos bioativos. *Pichia kudriavzevii*.

ABSTRACT

SILVA, Gilda Mariano. Biopigments production by the yeast *Pichia kudriavzevii* using agroindustrial byproducts. 2020. 176p. Thesis (Doctoral of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

Natural pigments (biopigments) are gaining appraisal for their biological and nutraceutical properties. In this sense, researches that aim the reduction of biopigments production cost and are an asset to ensure the economic competitiveness of these biomolecules. The purpose of this work is to assess agro-industrial wastes as carbon and nitrogen sources for biopigments production by the yeast *Pichia kudriavzevii* and to characterize these bioproducts. Sugarcane bagasse hydrolysate (SBH) was used as a renewable carbon source, while rice bran extract (RBE) was employed as complex nitrogen source. An extraction methodology was defined for the biopigments, which were characterized by spectrophotometry and by FTIR. Concurrently, sugar consumption, cell growth and biopigments production by the yeast under submerged cultivation were evaluated. The antioxidant activity of the bioproducts were also investigated. Agitation with glass beads was considered a feasible cell disruption method and biopigments extraction was successfully achieved with a mixture of ethanol and ethyl acetate 1:3 v/v. FTIR and visible region spectra showed the spectral similarity between *P. kudriavzevii* biopigments and carotenoids. In submerged cultivation experiments, RBE was considered a feasible nitrogen source, since cell growth and carotenoids production with this substrate were similar to the results obtained with the original semi-defined medium (yeast extract as complex nitrogen source). By replacing glucose with SBH, carotenoids production decreased and this result can be both related to xylose metabolism and the nutritional supplementation used for this medium. From these results, a modification of the culture medium was performed in order to evaluate the possibility to eliminate phosphates, sulfates and ammonium from the culture medium. Better results of biopigments production were achieved by reducing the medium composition to SBH, RBE and urea. Total carotenoids production reached 19.93 ± 2.2 mg/L, the maximum volumetric productivity of total carotenoids was of 0.17 (mg/L/h) and a conversion rate of reducing sugars to carotenoids of 0.77 mg of total carotenoids for g of sugar. From all the results, these were the highest obtained in this work, including the values achieved with commercial glucose. The antioxidant activity of the carotenoids extract from *P. kudriavzevii* was demonstrated ($1028.25 \mu\text{mol ET/mL}$) and it was considered similar to noteworthy antioxidants. Comprehensively, this research concluded that RBE is equally suitable for biopigments production in comparison to yeast extract. Further, the association of two nutrient sources derived from agroindustrial byproducts in a culture medium with reduced supplementation resulted in a significant increase of total carotenoids production, volumetric productivity and sugars conversion rate compared to a medium composed by SBH and a more complete supplementation or even to a glucose-based medium with yeast extract. The results of biopigments production by this yeast showed that it starts in the exponential growth phase and continues in the stationary phase. Furthermore, the spectral similarity between the biopigments of *P. kudriavzevii* and carotenoids was revealed and the antioxidant activity of these molecules was assessed. This work made feasible the production of biopigments by *P. kudriavzevii* with agroindustrial wastes as nutrient sources, the extraction of these products using a low cost and low wastes generation method. Additionally, this research is a milestone towards the exploitation of these molecules as antioxidants.

Keywords: Biopigments. Carotenoids. Agroindustrial byproducts. Submerged cultivation. *Pichia kudriavzevii*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espectro eletromagnético, com destaque para a região do visível	25
Figura 2 - Estrutura molecular dos principais grupos de biopigmentos	31
Figura 3 - Exemplo de estrutura de carotenos e xantofilas.....	39
Figura 4 - Representação esquemática da via metabólica de produção de carotenoides por fungos.....	40
Figura 5 - Classificação dos diferentes tipos de biomassa, de acordo com sua origem	60
Figura 6 - Representação esquemática da estrutura de um material lignocelulósico	61
Figura 7 - Sequência de pré-tratamentos e hidrólise enzimática para a liberação dos monômeros presentes nos carboidratos bagaço de cana-de-açúcar para sua utilização em bioprocessos	68
Figura 8 - Representação esquemática do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica por cavitação hidrodinâmica.....	69
Figura 9 - Fluxograma das atividades desenvolvidas.....	75
Figura 10 - Esquema representativo do reator de cavitação hidrodinâmica utilizado.....	78
Figura 11 - Aspecto visual da biomassa da levedura <i>P. kudriavzevii</i> cultivada em placa de Petri. Meio de cultura: YMA.....	79
Figura 12 - Esquema representativo das combinações de métodos de rompimento celular e de misturas de solventes para obtenção do extrato de biopigmentos de <i>P. kudriavzevii</i>	84
Figura 13 - Composição percentual de glicana, xilana e lignina no bagaço de cana-de-açúcar após tratamento ácido e alcalino assistido por cavitação hidrodinâmica	93
Figura 14 - a. Consumo de substrato; b. concentração celular máxima (b) da levedura <i>P. kudriavzevii</i> utilizando glicose ou xilose como fonte de carbono em diferentes concentrações. Tempo de cultivo: 168h.....	102
Figura 15 - Coloração do cultivo de <i>P. kudriavzevii</i> em glicose de origem comercial (60 g/L), nos intervalos de 0h, 24h, 48h e 72h.....	104
Figura 16 - Variação nas concentrações de açúcares e do crescimento celular de <i>P. kudriavzevii</i> em HHBCA ao longo do tempo. 168h de cultivo.....	106
Figura 17 - Aspecto visual dos cultivos de <i>P. kudriavzevii</i> em meio complexo baseado em glicose (a) e em HHBCA (b).....	107
Figura 18 - Variação nas concentrações de açúcares e do crescimento celular de <i>P. kudriavzevii</i> em cultivo submerso em HMBCA ao longo do tempo	108

Figura 19 - Aspecto visual dos cultivos de <i>P. kudriavzevii</i> em meio complexo baseado em glicose (a) e em HMBCA (b)	111
Figura 20 - Micrografias de células de <i>P. kudriavzevii</i> submetidas a diferentes métodos de rompimento. Coloração com safranina e aumento de 1000 x	113
Figura 21 - Valores de absorvância dos extratos de biopigmentos de <i>P. kudriavzevii</i> , obtidos por diferentes metodologias de rompimento celular e extração (λ : 400-550 nm).....	117
Figura 22 - Espectro do β -caroteno e de algumas xantofilas entre 350 e 550 nm.....	118
Figura 23 - Sobrenadante com aspecto gelificado e contendo os biopigmentos extraídos	120
Figura 24 - Extrato bruto de biopigmentos produzidos por <i>P. kudriavzevii</i>	121
Figura 25 – a. Espectro de absorção na região do infravermelho do extrato de biopigmentos de <i>P. kudriavzevii</i> e do β -caroteno padrão (Sigma-Aldich); b. Justaposição do espectro de absorção na região do infravermelho obtido no presente trabalho e do espectro de absorção na região do infravermelho (ATR-FTIR) do carotenoide torularodina produzido pela levedura <i>Rhodotorula rubra</i>	122
Figura 26 - a. Variação na concentração de glicose e na produção celular; b. Produção de carotenoides totais por <i>P. kudriavzevii</i> utilizando-se extrato de farelo de arroz ou extrato de levedura como fonte complexa de nitrogênio	126
Figura 27 - a. Variação na concentração de açúcares e no crescimento celular; b. Produção de carotenoides totais por <i>P. kudriavzevii</i> utilizando HMBCA como fonte de carbono e EFA ou extrato de levedura como fonte complexa de nitrogênio	132
Figura 28 - Valores médios e desvio padrão da conversão de açúcares fermentescíveis em carotenoides totais em meios de cultivos contendo glicose de origem comercial ou HMBCA como fonte de carbono	135
Figura 29 - Resultados obtidos em diferentes meios de cultura após 96h de cultivo, apresentados como média \pm intervalo de confiança de 95%. a. Concentração celular (g/L); b. Produção de biopigmentos (mg/L).....	139
Figura 30 - Valores médios e desvio padrão da conversão de açúcares fermentescíveis em carotenoides totais em meios de cultivos contendo HMBCA como fonte de carbono, EFA como fonte de nitrogênio complexa e diferentes composições nutricionais.....	143
Figura 31 – Produtividade volumétrica no ponto de maior produção de carotenoides totais dos diferentes cultivos da levedura <i>P. kudriavzevii</i> - cultivos em glicose com extrato de levedura ou EFA, cultivos em HMBCA e com extrato de levedura ou EFA e condições de limitação de nutrientes (MM1 a MM5).....	145

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de classes de biopigmentos, sua coloração e distribuição na natureza, de acordo com a literatura.....	30
Tabela 2 - Atividades biológicas apresentadas por biopigmentos.....	35
Tabela 3 - Produtos de importância industrial produzidas por <i>P. kudriavzevii</i>	47
Tabela 4 – Exemplos da aplicação da engenharia metabólica para a produção de carotenoides por leveduras	53
Tabela 5 - Exemplos de técnicas de rompimento celular e extração de carotenoides intracelulares produzidos por leveduras.....	56
Tabela 6 - Exemplos da composição do bagaço de cana-de-açúcar obtido no Brasil.....	63
Tabela 7 - Exemplos de subprodutos agroindustriais utilizados na produção microbiana de biopigmentos	71
Tabela 8 - Natureza e concentração da fonte de carbono em diferentes variações do meio de cultivo estabelecido por Hou-Rui et al. (2009)	81
Tabela 9 - Composição dos meios de cultura modificados a partir de Hou-Rui et al. (2009) para o cultivo submerso de <i>P. kudriavzevii</i> em HMBCA	87
Tabela 10 - Composição percentual do bagaço de cana-de-açúcar in natura (seco e moído)..	93
Tabela 11 - Composição nutricional do extrato de farelo de arroz determinada por Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) e comparação com dados da literatura	100
Tabela 12 - Determinação da presença de ácidos nucleicos (260 nm) e proteínas (280 nm) no sobrenadante obtido após rompimento celular com as diferentes técnicas.....	115
Tabela 13 - Comparação entre os resultados de absorvância a 489 nm e de produção específica (UA/ g de biomassa) de biopigmentos por <i>P. kudriavzevii</i>	119
Tabela 14 - Bandas ou picos do espectro no infravermelho referentes a grupamentos químicos ou vibrações do extrato de biopigmentos de <i>P. kudriavzevii</i> e do do β -caroteno padrão (Sigma-Aldich).....	123
Tabela 15 - Exemplos de produção volumétrica de carotenoides totais por leveduras cultivadas em cultivo submerso.....	128
Tabela 16 - Concentração celular, produção e produção específica de carotenoides totais e conversão de açúcares por <i>P. kudriavzevii</i> cultivada sob condições de remoção de nutrientes em relação ao meio de cultivo proposto por Hou-Rui et al. (2009). Tempo de cultivo: 96h. Valores apresentados: média \pm desvio padrão.	138

Tabela 17 - Atividade antioxidante (ABTS) do extrato de biopigmentos de *P. kudriavzevii* em meio de cultivo constituído por hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar, extrato de farelo de arroz e ureia em comparação com antioxidantes de referência..... 147

LISTA DE SIGLAS

ABTS - 2, 2 – azinobis - 3- etil – benzotiazolina – 6-ácido sulfônico
AMV – Ácido mevalônico
AMP - Monofosfato de adenosina
C/N – Carbono/nitrogênio
CH – Cavitação Hidrodinâmica
CICN – Índice de Nomes Genéricos
CIGN - Números de Constituição de Cor
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CoA – Coenzima A
DMAPP – Dimetilalil-pirofosfato
DMSO – Dimetilsulfóxido
DPPH - 2,2- difenil-1-picril-hidrazil
DSSC- células solares sensibilizadas por corantes
EFA – Extrato de farelo de arroz
EL – Extrato de levedura
FPU – Filter paper unit
FRAP - Poder de redução do ferro
FT-IR - Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
GGPP – Geranyl-geranyl-pirofosfato
GRAS – Generally Regarded as Safe
HHBCA - Hidrolisado hemicelulósicode bagaço de cana-de-açúcar
HMBCA – Hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar
HMG-CoA – 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
ICP-OES - Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente
IPP – Isopentenil pirofosfato
LBios - Laboratório de Bioprocessos e Produtos Sustentáveis
LED – Diodo emissor de luz
MM – Meio modificado
NREL - National Renewable Energy Laboratory
OD – Densidade óptica
ORAC - Capacidade de absorção do radical oxigênio
pH – Potencial hidrogeniônico

RID- Detector de índice refractivo diferencial

US\$ - Dólares americanos

YMA – Yeast Mould Agar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 COLORANTES, PIGMENTOS E BIOPIGMENTOS.....	25
2.1.1 Colorantes sintéticos.....	26
2.1.2 Biopigmentos – ocorrência e propriedades	29
2.1.2.1 Aplicações biotecnológicas de biopigmentos.....	33
2.1.2.2 Carotenoides e leveduras carotenogênicas	38
2.1.2.2.2 <i>A levedura P. kudriavzevii e suas aplicações biotecnológicas</i>	46
2.1.2.2.3 <i>Biotecnologias utilizadas para a produção de carotenoides por fungos filamentosos e leveduras</i>	49
2.1.2.2.3 <i>Tecnologias de extração de carotenoides intracelulares</i>	54
2.1.2.2.4 <i>Perspectivas do mercado de carotenoides</i>	58
2.2 A BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS ..	60
2.2.1 Bagaço de cana-de-açúcar.....	62
2.2.2 Farelo de arroz.....	64
2.2.3 Biomassa lignocelulósica – pré-tratamentos e sacarificação	66
2.2.3.1 Cavitação hidrodinâmica	68
2.2.4 Cenário atual do uso de materiais lignocelulósicos na produção de biopigmentos.....	70
3 OBJETIVOS	74
3.1 OBJETIVO GERAL.....	74
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	74
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	75
4.1 SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS.....	76
4.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar – obtenção, caracterização e processamento	76
4.1.1.1 Produção e caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	76
4.1.1.2 Produção e caracterização do hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar	77
4.1.2 Farelo de arroz – obtenção, caracterização e processamento	78
4.1.2.1 Caracterização do extrato proteico do farelo de arroz.....	79
4.2 MICRORGANISMO – OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS.....	79
4.3 ESTUDOS PRELIMINARES DE CRESCIMENTO CELULAR E CONSUMO DE AÇÚCARES POR <i>P. kudriavzevii</i>	80

4.3.1 Preparo do inóculo dos cultivos.....	80
4.3.2 Cultivo em meio de cultura complexo (glicose e xilose de origem comercial como fonte de carbono)	80
4.3.3 Cultivos em hidrolisado hemicelulósico e hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar.....	81
4.4 EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS BIOPIGMENTOS	82
4.4.1 Estudo de métodos de rompimento celular, extração e caracterização espectrofotométrica dos biopigmentos.....	82
4.4.2 Caracterização da(s) molécula(s) de biopigmentos produzida(s) por <i>P. kudriavzevii</i> - FT-IR.....	85
4.5 MODIFICAÇÕES DO MEIO NUTRICIONAL E SEUS EFEITOS SOBRE O CRESCIMENTO CELULAR E A PRODUÇÃO DE BIOPIGMENTOS POR <i>P. kudriavzevii</i>	86
4.5.1 Estudos da substituição do extrato de levedura pelo extrato de farelo de arroz como fonte de nitrogênio.....	86
4.5.2 Estudo do efeito da modificação da suplementação do hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar	87
4.6 ANÁLISES DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DE BIOPIGMENTOS DE <i>P. kudriavzevii</i>	88
4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS	88
4.7.1 Determinação das concentrações de glicose, xilose, celobiose, arabinose e ácido acético	88
4.7.2 Determinação de proteínas solúveis.....	88
4.7.3 Determinação de nitrogênio Kjeldahl.....	89
4.7.4 Turbidimetria	89
4.7.5 Varreduras espectrofotométricas.....	89
4.7.6 Medias de pH	90
4.7.7 Microscopia óptica.....	90
4.7.8 Determinação de carotenoides totais	90
4.7.9 Atividade antioxidante – captura do DPPH e do ABTS	91
4.7.10 FT-IR	92
4.8 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS	92
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
5.1 BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR – CARACTERIZAÇÃO E PROCESSAMENTO ...	93

5.1.1 Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	95
5.1.2 Hidrolisado misto do bagaço de cana-de-açúcar (HMBCA)	96
5.2 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE FARELO DE ARROZ	98
5.3 ESTUDOS PRELIMINARES DE CRESCIMENTO CELULAR E CONSUMO DE AÇÚCARES POR <i>P. kudriavzevii</i>	101
5.3.1 Cultivo em meio de cultura complexo (glicose e xilose de origem comercial como fonte de carbono)	102
5.3.2 Cultivo em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	105
5.3.3 Cultivo em hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar	108
5.4 EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS BIOPIGMENTOS	111
5.4.1 Estudo de métodos de rompimento celular e de extração dos biopigmentos.....	112
5.4.2 Caracterização do extrato de biopigmentos por FT-IR.....	121
5.5 ESTUDO DO MEIO NUTRICIONAL E SEUS EFEITOS SOBRE O CRESCIMENTO CELULAR E A PRODUÇÃO DE BIOPIGMENTOS POR <i>P. kudriavzevii</i>	125
5.5.1 Estudo da produção de carotenoides em função da modificação da fonte complexa de nitrogênio – cultivos em glicose	125
5.5.2 Estudo da produção de biopigmentos em função da modificação das fontes de carbono e de nitrogênio complexa – cultivos em hidrolisado misto de bagaço de cana-de- açúcar.....	131
5.5.3 Estudo do efeito da modificação da suplementação do hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar	137
5.6 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DE BIOPIGMENTOS DE <i>P. kudriavzevii</i>	147
6. CONCLUSÃO.....	151
REFERÊNCIAS	154

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS

A visão é considerada o sentido mais desenvolvido da espécie humana e a cor é um atributo de grande importância, pois é a primeira característica de um objeto a ser notada. Além de propiciar sensações ao observador, diversas informações podem ser obtidas por meio das cores: a palatabilidade e o sabor de um alimento, o grau de maturação de um fruto, a profundidade de um curso d'água, a toxicidade de uma planta, fungo ou animal.

As cores são proporcionadas por moléculas denominadas colorantes e sua presença nos organismos vivos possui um papel importante nas relações sociais e culturais existentes na sociedade humana e nas interações animais. De forma mais ampla, pode-se dizer que a função mais primordial exercida por um colorante é a fotossíntese, processo que sustenta toda a biosfera terrestre.

Colorantes são amplamente utilizados em processos industriais, sendo a maioria destes de origem sintética (derivados de insumos químicos, subprodutos da indústria do petróleo ou de minerais terrosos). Seu uso se reflete na geração de efluentes tóxicos e na ocorrência de uma variedade de problemas de saúde, como o desenvolvimento de tumores e alergias. Por esse motivo, muitos colorantes sintéticos foram proibidos pelas agências regulatórias e há uma tendência da sociedade em rejeitar esses compostos em favor dos pigmentos de origem natural, também chamados de biopigmentos.

Biopigmentos são colorantes produzidos por seres vivos (animais, plantas e microrganismos). Em oposição ao relatado para os colorantes sintéticos, estes apresentam baixa toxicidade, benefícios à saúde (apresentam atividade antioxidante e algumas são precursores de vitaminas) e se degradam facilmente no organismo e no meio ambiente.

Anteriormente ao advento dos colorantes sintéticos, os biopigmentos vegetais eram os mais utilizados, porém, atualmente, há uma busca por moléculas microbianas pois, diferentemente da produção vegetal, processos microbianos não dependem de fatores sazonais/geográficos e é possível atingir altas produções em um reduzido espaço.

A produção de biopigmentos por bactérias, algas, leveduras e fungos é parte natural da fisiologia desses organismos e a biotecnologia contribui com estratégias para intensificar a síntese desses bioprodutos, não apenas com as modificações de condições de cultivo como também por meio do aprimoramento genético.

Outra vertente de estudos biotecnológicos envolve o desenvolvimento de técnicas mais econômicas e com menor geração de resíduos nocivos para a extração e isolamento dos biopigmentos intracelulares. No momento atual, o avanço dessa linha de pesquisa é

indispensável, uma vez que a obtenção e purificação dessas moléculas (etapas *downstream*) são responsáveis pela maior parcela de custo de alguns bioprocessos.

Do ponto de vista econômico, colorantes sintéticos são mais vantajosos do que suas versões naturais. O β -caroteno natural, por exemplo, custa o dobro de seu equivalente sintético (RAO; XIAO; LI, 2017). O aumento da oferta e a redução de custos dos biopigmentos se relacionam a limitações técnicas em sua produção e à falta de regulamentação para sua utilização em produtos de consumo humano.

A produção de biopigmentos em larga escala se dá, principalmente, com o uso de microrganismos fotossintetizantes (como algas) e seu aprimoramento depende tanto do sucesso em se utilizar substratos de baixo custo (como subprodutos agroindustriais), de uma compreensão mais profunda do efeito das condições de processo na produção. Dessa forma, o desenvolvimento de pesquisas biotecnológicas voltadas para a elucidação dos principais mecanismos bioquímicos envolvidos na produção de biopigmentos é fundamental.

Diversos estudos investigam a possibilidade de se utilizar subprodutos agroindustriais como substratos para a bioprodução de pigmentos, como efluentes da indústria cervejeira e biomassas vegetais provenientes dos processamentos de milho, do trigo e da cana-de-açúcar. Dado que a produção de alguns biopigmentos se correlaciona a condições de estresse ambiental, a utilização desses materiais como substratos nos meios de cultivo tem se mostrado vantajosa.

A valorização da biomassa lignocelulósica proveniente de atividades agroindustriais é de particular relevância para países em desenvolvimento e de grande potencial agrícola, como é o caso do Brasil, pois o melhor aproveitamento desses materiais é uma estratégia para a obtenção de produtos de alto valor agregado e também uma forma de estímulo à economia e geração de empregos.

Uma vez que a utilização de subprodutos agroindustriais tem um papel relevante na obtenção de bioprodutos (enzimas, polímeros, combustíveis, ácidos graxos), evidencia-se a relevância deste trabalho por investigar a possibilidade de utilização de tais materiais na produção biotecnológica de biopigmentos. Essa abordagem não representa apenas uma redução de custos, como também contribui para diminuir a geração de resíduos e do consumo de insumos não renováveis, enquadrando este processo nos princípios da química verde.

O sucesso da utilização de subprodutos agroindustriais em bioprocessos se relaciona às etapas de pré-tratamento envolvidas na liberação dos componentes da biomassa vegetal. Há uma variedade de técnicas de pré-tratamento e estas se diferenciam em termos de custos, geração de resíduos, geração de compostos inibidores e eficiência.

A cavitação hidrodinâmica (CH) é um método que tem sido recentemente utilizado para o pré-tratamento de biomassa vegetal e apresenta vantagem em relação às técnicas clássicas, como economia energética, reduzido uso de reagentes e possibilidade de aumento de escala. Sua utilização no presente trabalho representou uma possibilidade de redução de custos e de implementação de uma abordagem inovadora no bioprocessamento de obtenção de biopigmentos.

A importância desta pesquisa reside não apenas na utilização conjunta de dois subprodutos agroindustriais (bagaço de cana-de-açúcar e farelo de arroz) em um bioprocessamento, como também na utilização de uma técnica econômica de pré-tratamento (a cavitação hidrodinâmica) e em contribuir para a elucidação do papel de diferentes nutrientes na produção de biopigmentos e a superação de dificuldades envolvidas nas etapas *downstream* deste bioprocessamento.

A identificação da atividade antioxidante dos biopigmentos obtidos também merece destaque, pois essa propriedade abre portas para a utilização desses bioprodutos não apenas como colorantes, mas também como aditivos de rações, alimentos e na constituição de suplementos alimentares. Compostos produzidos por leveduras têm uma aceitação melhor no organismo humano do que aqueles sintetizados por bactérias. Dessa forma, ressalta-se a contribuição desta pesquisa como uma adição ao repertório de moléculas bioativas produzidas por eucariotos com potencial de aplicações farmacêuticas, nutracêuticas, cosméticas e alimentares.

Como ponto de destaque do presente trabalho ressalta-se, igualmente, a identificação de atividade antioxidante do extrato de biopigmentos obtido. Tem sido demonstrado que antioxidantes naturais são mais eficientes do que os sintéticos, sendo assim, o fato de que este estudo aponte para a possibilidade da consolidação de um sistema de produção de antioxidantes a partir de uma fonte natural e com a incorporação dos princípios da sustentabilidade e da química verde constitui-se como uma contribuição significativa para a utilização da levedura *P. kudriavzevii*.

No momento de condução desta pesquisa, não foi encontrada nenhuma publicação que discorresse sobre a produção de biopigmentos pela levedura em estudo (*Pichia kudriavzevii*), sendo assim, a identificação da produção destes metabólitos e sua caracterização como carotenoides representam uma contribuição significativa para a biotecnologia da produção microbiana de biopigmentos. Ademais, as características fisiológicas dessa espécie (tolerância a inibidores, osmofilia, termotolerância, resistência a variações de pH e capacidade de

utilização de uma ampla gama de fontes de carbono) tornam o organismo viável para a produção de carotenoides no contexto de uma biorrefinaria.

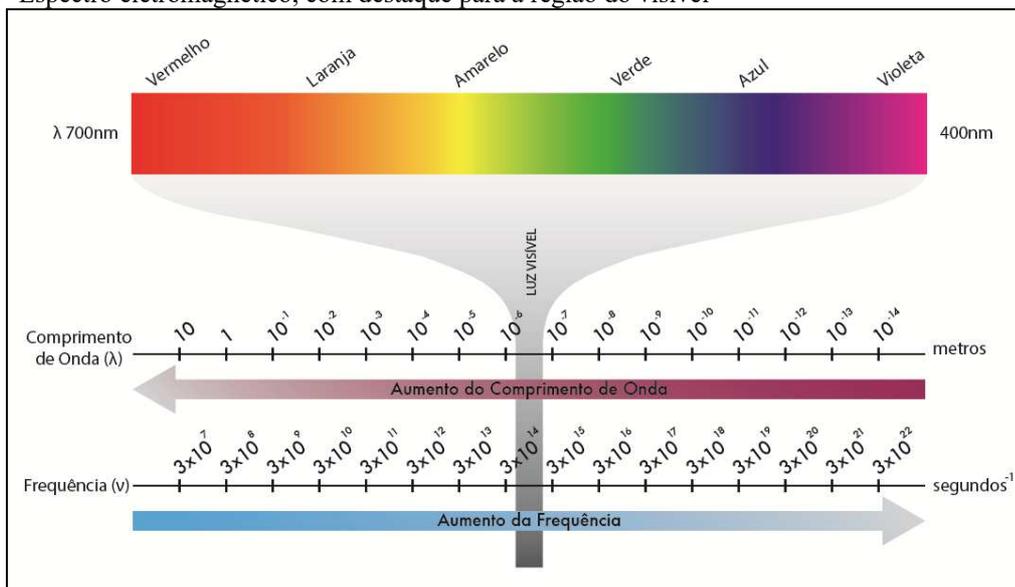
Por fim, ressalta-se que o presente trabalho se apresenta como um filamento desta complexa trama, cada vez mais estruturada, entre a biotecnologia e a agricultura, aprimorando seu potencial de propulsora do desenvolvimento sócio-econômico e científico-tecnológico do Brasil.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 COLORANTES, PIGMENTOS E BIOPIGMENTOS

As substâncias denominadas colorantes são aquelas que, quando adicionadas a um dado material, alteram, de forma seletiva, a transmissão ou a reflexão da luz incidente, fazendo com que o material apresente uma nova cor. Para que um composto apresente essa função, suas moléculas devem ser capazes de absorver a radiação eletromagnética, transmitir na região do espectro visível (400-700 nm, Figura 1) e tornar possível a existência de ressonâncias eletrônicas. A porção da molécula que possui absorção tanto na região do ultravioleta quanto do espectro visível é denominada grupo cromóforo. A interação do grupo cromóforo com a radiação eletromagnética se dá, principalmente, por meio de transições eletrônicas que ocorrem em sistemas conjugado de ligações duplas (DE CARVALHO *et al.*, 2014).

Figura 1 - Espectro eletromagnético, com destaque para a região do visível



Fonte: adaptado de Riaz *et al.*, 2018

De acordo com Saron e Felisberti (2006), existem duas categorias nas quais os colorantes são classificados: corantes ou pigmentos, sendo a distinção entre estes baseada no tamanho da partícula e em sua solubilidade em uma matriz. Corantes possuem tamanho de partícula menor do que pigmentos e são solúveis na matriz, enquanto pigmentos não apresentam solubilidade nesta. A interação do colorante com uma matriz se dá por meio de grupamentos químicos (alquilas, carbonamidas e heteroátomos, por exemplo) e, por esse

motivo, estas moléculas podem se comportar como pigmentos em uma dada matriz e como corantes em outra.

A estrutura molecular de um colorante também pode ser utilizada como critério classificatório. Colorantes inorgânicos são formados por complexos de metais de transição (como cádmio, cromo e cobalto) e apresentam restritas tonalidades, enquanto que colorantes orgânicos se apresentam em uma variedade maior de cores e manifestam ressonâncias eletrônicas em suas estruturas. As principais classes de colorantes orgânicos são: azo (caracterizados pelo grupo $-N=N-$), antraquinonas, indigoides, ftalocianinas, di- e triarilmetanos, metina e polimetinas, nitro e nitrosos e sulfurosos (ZANONI; YANAMAKA, 2016).

As nomenclaturas oficiais dos corantes e pigmentos são divulgadas em um documento denominado Índice Internacional de Corantes, ou *Colour IndexTM*, o qual é publicado pela Sociedade de Tintureiros e Coloristas em conjunto com a Associação Americana de Químicos Têxteis e Coloristas. De acordo com o Índice Internacional de Corantes, um corante ou pigmento é inserido em dois sistemas de classificação, o Índice de Nomes Genéricos (*Colour IndexTM Generic Names - CIGN*), baseado na classe de uso de um determinado colorante, e o Índice de Números de Constituição de Cor (*Colour IndexTM Constitution Numbers - CIGN*), fundamentado na estrutura química do colorante (ABEL, 1998).

Colorantes podem ser de origem natural e sintética e, na literatura científica, empregam-se os termos “biocorantes”, “biopigmentos” ou “pigmentos naturais” em referência aos pigmentos produzidos por seres vivos (VENIL; ZAKARIA; AHMAD, 2013). Dessa forma, o termo “biopigmentos” foi utilizado no presente trabalho para descrever os colorantes sintetizados pela levedura em estudo.

2.1.1 Colorantes sintéticos

Assim como descrito por Venil, Zakaria e Ahmad (2013), as técnicas primordiais de tingimento consistiam no uso de materiais biológicos, como cascas de frutas, madeiras, açafraão, índigo, hena, moluscos e extrato do inseto cochonilha (particularmente utilizado pelos astecas). Estas prevaleceram até 1856, ano que marca o advento dos colorantes sintéticos. O primeiro colorante sintético foi desenvolvido por William Henry Perkin e denominado mauveína, uma anilina de coloração púrpura (ZIARANI *et al.*, 2018).

Colorantes sintéticos são obtidos a partir de minerais terrosos, derivados de petróleo e outros precursores químicos. Diferentemente dos colorantes naturais, lotes de produção de

colorantes sintéticos apresentam alto grau de homogeneidade, uma característica fundamental do ponto de vista industrial. Suas estruturas moleculares fazem com que esses compostos sejam utilizados não apenas pelas suas cores, mas também como componentes de células solares, marcadores fluorescentes com aplicações biológicas e médicas ou catalisadores fotoredox (ZIARANI *et al.*, 2018).

Desde sua origem, os colorantes sintéticos foram amplamente difundidos. Passados 50 anos da descoberta da mauveína, os colorantes artificiais representavam 90% dos colorantes no mercado (SHANKER; RANI; JASSAL, 2017). O rápido sucesso dessas moléculas foi consequência de seu custo reduzido em relação aos pigmentos naturais, facilidade de produção, alto rendimento, ampla disponibilidade das matérias-primas, possibilidade de serem desenvolvidos em uma ampla gama de cores, alta estabilidade após a aplicação e ausência de alteração do odor de alimentos, quando aplicados a estes (SHANKER; RANI; JASSAL, 2017; RAO; XIAO; LI, 2017).

A indústria de colorantes sintéticos disponibiliza no mercado cerca de 100.000 variedades dessas substâncias, cuja produção global, no ano de 2019/2020, aproxima-se de 1.000.000 de toneladas. Uma fração dos colorantes sintéticos é direcionada às indústrias de papel, plásticos, couro e indústria química, enquanto cerca de 90% da produção é utilizada na indústria têxtil (MANI; CHOWDHARY; BHARAGAVA, 2018).

O advento de colorantes sintéticos orgânicos desprovidos de metais se apresentou como uma importante inovação na ciência das cores. Além de seus custos reduzidos, essa classe de colorantes se caracteriza por uma ampla diversidade de estruturas moleculares e por coeficientes de extinção molar (capacidade de um mol de uma substância em absorver a luz) mais altos do que os colorantes com metais. Alguns grupos químicos característicos dos colorantes sintéticos orgânicos são: cumarinas, carbazóis, polienos, fluorenos e indolinas (ZIARANI *et al.*, 2018).

Apesar das vantagens produtivas dos colorantes sintéticos, a síntese de tais compostos envolve, muitas vezes, o uso de produtos químicos nocivos e a geração de resíduos tóxicos, fatores esses que comprometem a segurança dos trabalhadores e a qualidade do meio ambiente (VENIL; ZAKARIA; AHMAD, 2013). Dado que o processo de tingimento não permite que a absorção do colorante aplicado sobre um material seja completa, isso leva à geração de efluentes coloridos e de difícil tratamento. Enquanto a perda na forma de efluente de corantes do tipo vat (corantes à cuba) varia entre 5% e 20%, ela pode chegar a 50% no caso de corantes reativos (GULZAR *et al.*, 2019).

Na década de 1960, o movimento ambientalista trouxe uma nova óptica segundo a qual a segurança de um produto deveria ser definida também em função de seu potencial de causar danos aos ecossistemas e aos diferentes seres vivos. A partir desse momento, a soberania dos colorantes sintéticos começou a apresentar sinais de declínio e, em contrapartida, as propriedades nutricionais e farmacêuticas dos colorantes naturais, bem como sua biodegradabilidade, passaram a ser valorizadas (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000).

Nas últimas décadas, uma série de estudos encontrou relações entre o consumo de colorantes sintéticos e a ocorrência de problemas cutâneos (EFSA PANEL ON FOOD ADDITIVES AND NUTRIENT SOURCES ADDED TO FOOD, 2009) e gastrointestinais (SIM; CHEN; TING, 2018), além de estarem relacionados a quadros alérgicos (VOJDANI; VOJDANI, 2015). Os colorantes da classe azo, que representam 2/3 de todos os colorantes sintéticos, merecem atenção por seu potencial carcinogênico (AMCHOVA; KOTOLOVA; RUDA-KUCEROVA, 2015). Ademais, há evidências de que a intolerância a aditivos de alimentos se relacione à ocorrência de hiperatividade infantil e distúrbios físicos e mentais (SMITH, 1991; LIM *et al.*, 2015; LV *et al.*, 2017).

Além dos danos provocados à saúde humana, estudos ambientais demonstraram o potencial tóxico de efluentes contendo corantes e a recalcitrância dessas moléculas no meio ambiente. Os corantes azo, por exemplo, são moléculas estáveis que persistem no ambiente e cujo efeito tóxico, carcinogênico e mutagênico foi evidenciado em testes ecotoxicológicos baseados em organismos-modelo (ABE *et al.*, 2018).

Os efeitos ambientais nocivos não são provocados somente por corantes e pigmentos sintéticos, mas também por seus intermediários e moléculas decorrentes de sua degradação. Tem sido relatado que esses compostos provocam, além de alterações mutagênicas e carcinogênicas em animais, a redução da produtividade do solo e o comprometimento do crescimento vegetal devido à interferência na atividade dos microrganismos rizosféricos (MISHRA; CHOWDHARY; BHARAGAVA, 2018).

Deve-se ressaltar, também, que não é apenas o aspecto químico de colorantes sintéticos que traz riscos ao meio ambiente, mas suas características físicas também: a alteração de cor de um curso d'água afeta os processos fotossintéticos e, conseqüentemente, desestabiliza toda a cadeia trófica dependente da fotossíntese (SHAKOOR; NASAR, 2018). Tais constatações, em conjunto com os resultados cada vez mais conclusivos sobre a relação entre colorantes sintéticos e algumas doenças em humanos, levaram à proibição, por agências

regulatórias, de diversas moléculas sintéticas usualmente utilizadas como colorantes (RAO; XIAO; LI, 2017).

2.1.2 Biopigmentos – ocorrência e propriedades

Biopigmentos pertencem a diferentes classes moleculares e apresentam funções diversificadas nos organismos em que ocorrem. Os microrganismos fotossintetizantes (algas e algumas bactérias) utilizam essas moléculas para captar a radiação eletromagnética e impulsionar as reações da fotossíntese, enquanto que organismos não-fotossintetizantes produzem pigmentos como um fator de virulência ou uma resposta a condições ambientais desfavoráveis, como presença de metais pesados, temperaturas e pressão osmótica extremas ou inibição metabólica (EL-NAGGAR; EL-EWASY, 2017; VENIL *et al.*, 2014). As principais classes de biopigmentos e os organismos que os produzem estão apresentados na Tabela 1.

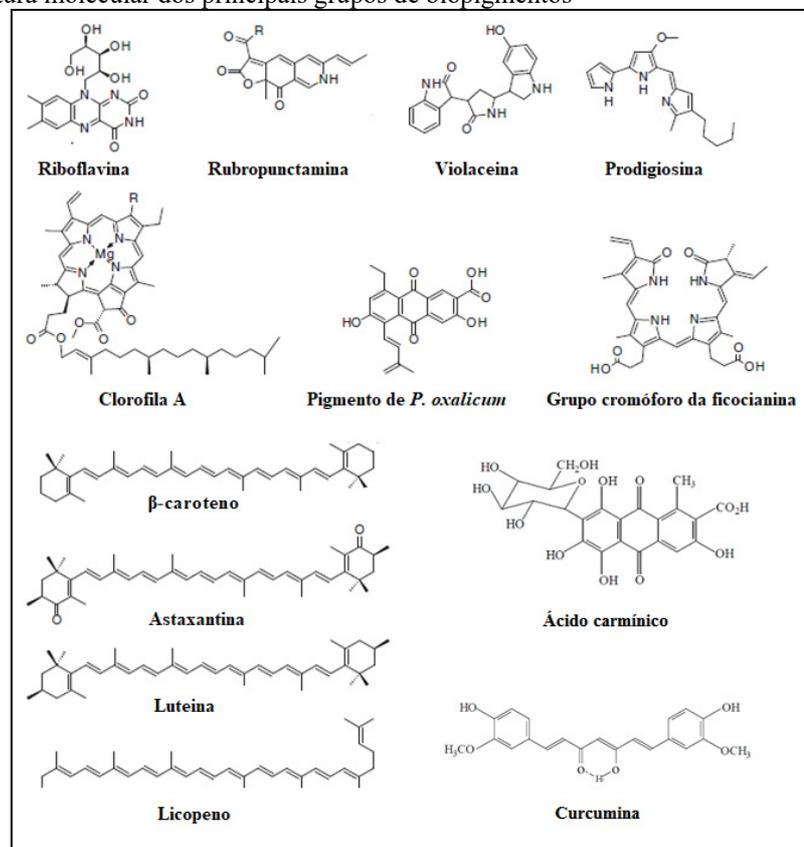
Tabela 1 - Exemplos de classes de biopigmentos, sua coloração e distribuição na natureza, de acordo com a literatura

Classe de biopigmentos	Coloração	Distribuição na natureza	Referência
Derivados de tetrapirrol (clorofila, fitocromos, hemoglobina)	Verde (clorofila)	Plantas, algas e animais	Delgado-Vargas; Jiménez; Paredes-López, 2000
	Vermelha (hemoglobina)		
	Azul-esverdeada (fitocromo)		
Melaninas	De marrom à preta	Ubíqua	Sun <i>et al.</i> , 2016
Carotenoides	De amarela à vermelha	Bactérias, fungos, microalgas e plantas	Maldonado; Rodriguez-Amaya; Scamparini, 2008; BERMAN <i>et al.</i> , 2015
Quinonas	Amarela, vermelha ou marrom	Plantas, bactérias, fungos e animais	Delgado-Vargas; Jiménez; Paredes-López, 2000
Derivados de benzopiranos (flavonoides)	Variação do vermelho ao azul	Plantas e microrganismos	Parmar; Gupta Phutela, 2015; Venil <i>et al.</i> , 2014
Compostos N-heterocíclicos que não tetrapirróis (betalaínas, flavinas, purinas)	Amarela e vermelho-arroxeadada (betalaínas)	Ubíqua	Delgado-Vargas; Jiménez; Paredes-López, 2000; Souza <i>et al.</i> , 2005
	Amarela (riboflavina)		
Violaceínas	Violeta	Bactérias	Venil; Zakaria; Ahmad, 2013
Prodigininas	Vermelha	Bactérias	Liu <i>et al.</i> , 2013
Policetídeos (monascina, rubropunctatina, monascorubramina)	Amarela, laranja ou vermelha	Fungos	Patakova, 2013

Fonte: própria autora.

Os pigmentos naturais se apresentam em uma ampla variedade de cores e se observa uma correlação entre a estrutura molecular e a cor refletida ou transmitida por estes. Em relação às características estruturais dos biopigmentos, nota-se semelhança entre os tipos de ligações e grupamentos químicos presentes, o que se relaciona ao fato de que, fisiologicamente, a função destes é semelhante: absorver radiação eletromagnética e/ou capturar elétrons livres no meio, atividades propiciadas pelas inúmeras ligações duplas conjugadas, anéis de porfirina e pela presença de íons de metais de transição complexados. A diversidade molecular das principais classes de biopigmentos está exemplificada na Figura 2.

Figura 2 - Estrutura molecular dos principais grupos de biopigmentos

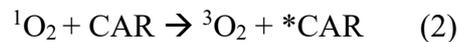


Fonte: adaptado de De Carvalho *et al.* (2014) e Volp, Renhe e Stringueta (2009).

Nas plantas, o papel dessas moléculas é vital, uma vez que os biopigmentos permitem a captura da luz para a fotossíntese, processo por meio do qual ocorre a fixação do carbono inorgânico em moléculas orgânicas. Além da clorofila, o principal biopigmento da fotossíntese, as plantas dispõem de pigmentos acessórios (como carotenoides), que ampliam a diversidade de radiações eletromagnéticas capazes de serem absorvidas pelos

sistemas fotossintéticos (BUZZINI *et al.*, 2007; UENOJO; MARÓSTICA JUNIOR; PASTORE, 2007).

A forma com que os biopigmentos interagem com a luz faz com que muitos apresentem atividade antioxidante e forneçam proteção contra a radiação ultravioleta. Como exemplo dessas propriedades, podemos citar a atividade dos carotenoides. Esses biopigmentos são capazes de inativar radicais livres provenientes do metabolismo celular (como o oxigênio singlete, o radical hidroxila e peróxidos), preservando as estruturas celulares e aumentando a capacidade de sobrevivência dos organismos (BUZZINI *et al.*, 2007; HERNÁNDEZ-ALMANZA *et al.*, 2014). As reações entre um carotenoide e um radical livre estão representadas nas equações 1 e 2, respectivamente.



Em que:

R' = Radical livre

CAR = Carotenoide

A interação de carotenoides com radicais livres envolve reações de transferência de elétrons e, possivelmente, reações subsequentes, enquanto que a ação desta molécula sobre o oxigênio singlete ocorre por meio da oxidação do carotenoide, que retorna ao seu estado energético original ao dissipar a energia como calor. De forma geral, é observado que quanto mais longa a cadeia de polieno do carotenoide, maior sua capacidade antioxidante. Vale ressaltar que, apesar do papel protetivo destes contra a luz, a síntese de carotenoides não é, necessariamente, fotodependente (UENOJO; MARÓSTICA JUNIOR; PASTORE, 2007; ZOZ *et al.*, 2015).

Em organismos não fotossintetizantes, como muitas bactérias, protozoários, fungos e animais, biopigmentos são produzidos para proteger a célula contra a radiação ultravioleta e o stress oxidativo (RAO; XIAO; LI, 2017), e algumas dessas moléculas, como carotenoides e melaninas, possuem, adicionalmente, funções ecológicas e comportamentais. As melaninas, por exemplo, são associadas à virulência de fungos patogênicos, como *Cryptococcus neoformans* e *Colletotrichum lagenarium*, o que permite

a esses microrganismos uma maior competitividade ecológica em relação a outros fungos e os torna resistentes a antibióticos (CASADEVALL; ROSAS; NOSANCHUK, 2000).

Um dos biopigmentos que se destacam pela sua função fisiológica é a riboflavina (vitamina B2). A riboflavina é um pigmento amarelo que atua como componente estrutural das coenzimas flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD). O papel dessa vitamina é de fundamental importância e sua ingestão na dieta humana deve ser de 1,1 mg a 1,3 mg diários (RAO; XIAO; LI, 2017).

Os carotenoides, por outro lado, possuem um papel ecológico importante em animais. Estes são incapazes de sintetizar tais biopigmentos, porém uma alta ingestão alimentar de carotenoides permite que grupos como crustáceos, flamingos, peixes e borboletas os acumulem em seus tecidos de tal maneira que sua coloração se torne alaranjada ou rosada, fator que exerce importância do ponto de vista das interações sociais e, mais especificamente, em rituais reprodutivos. Ademais, alguns carotenoides apresentam atividade provitamina-A e, na ausência desses compostos, os animais não conseguem sintetizar essa substância e desenvolvem patologias oculares (MATA-GÓMEZ *et al.*, 2014; ZOZ *et al.*, 2015).

2.1.2.1 Aplicações biotecnológicas de biopigmentos

Historicamente, as principais substâncias utilizadas como colorantes eram provenientes de plantas, como urucum, hena, açafão e pau-brasil, os quais foram gradativamente substituídos pelos colorantes sintéticos. Nas últimas décadas, o interesse por biopigmentos tem ressurgido, porém observa-se uma concentração de estudos sobre biopigmentos de origem microbiana (HEER; SHARMA, 2017).

Dada a longa trajetória de exploração dos biopigmentos vegetais, a possibilidade de que moléculas novas sejam descobertas neste reino de seres vivos é pequena. Outras vantagens, apresentadas na literatura, da obtenção de biopigmentos por vias microbianas são:

- a) A produção microbiana é independente de fatores climáticos e geográficos e ocorre em um curto período de tempo, sendo controlável em muitos de seus aspectos. A produção vegetal, por outro lado, é intrinsecamente relacionada às condições ambientais (HEER; SHARMA, 2017; MIHALCEA *et al.*, 2015);

- b) Pigmentos microbianos apresentam maior solubilidade em água do que os vegetais, além de serem mais estáveis ao calor, variações de pH ou à exposição luminosa (NIGAM; LUKE, 2016);
- c) Microrganismos possuem a capacidade de sintetizar pigmentos ausentes em plantas, como aril carotenoides (DUFOSSE *et al.*, 2005);
- d) Os rendimentos dos processos microbianos são maiores do que aqueles obtidos nos processos vegetais, bem como tais vias de produção produzem menos resíduos (VENIL; ZAKARIA; AHMAD, 2013);
- e) Há inúmeros microrganismos industrialmente importantes (por exemplo, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*) para os quais existem ferramentas consolidadas de manipulação genética, o que faz com que estes possam ter seu metabolismo modificado para a produção heteróloga de biopigmentos e o consequente incremento do rendimento do processo (VENIL; ZAKARIA; AHMAD, 2013);
- f) Microrganismos são capazes de utilizar substratos de baixo custo, como subprodutos agroindustriais, como fonte de nutrientes (HERNÁNDEZ-ALMANZA *et al.*, 2014).

Entre os microrganismos mais explorados para a produção de biopigmentos, pode-se citar algas (por exemplos as dos gêneros *Dunaliella* e *Haematococcus*), fungos filamentosos e leveduras. Os fungos filamentosos *Blakeslea trispora* e *Phycomyces blakesleeanus* são notáveis produtores de fitoeno, licopeno, γ e β -caroteno, além de outros metabólitos de interesse, como ácidos orgânicos (RIBEIRO; BARRETO; COELHO, 2011). *Ashbya gossypii* é outra espécie de fungo filamentoso de grande importância econômica, sendo utilizada para a produção industrial de riboflavina e potencial produtora de proteínas recombinantes, compostos aromáticos e *single cell oil* (AGUIAR; SILVA; DOMINGUES, 2015).

Além das vantagens da produção microbiana em relação à exploração de biopigmentos produzidos por plantas, as leveduras apresentam algumas características que fazem com que elas sejam os microrganismos mais promissores para o processo biotecnológico de obtenção dessas moléculas. Esses microrganismos de natureza unicelular apresentam altas taxas de crescimento e, ademais, biopigmentos provenientes de leveduras tendem a ser menos nocivos à saúde humana do que pigmentos de fungos filamentosos

(BHOSALE; GADRE, 2001c; HERNÁNDEZ-ALMANZA *et al.*, 2014). Em contrapartida, a produção de biopigmentos por leveduras ocorre de forma intracelular, o que implica na necessidade do emprego de técnicas de ruptura celular e de extração (PARK; KIM; CHU, 2007).

De acordo com Nigam e Luke (2016), há uma série de desafios a serem superados para ampliar a produção industrial de biopigmentos. Tais adversidades se relacionam, principalmente, às dificuldades de extração e purificação dessas moléculas e ao fato de que os biopigmentos são passíveis de alterações químicas quando são liberados das células. Eles podem ser degradados por ação da radiação ultravioleta ou em condições de estresse ambiental e, até mesmo, sofrer isomerizações em altas temperaturas ou na presença de solventes orgânicos.

No que diz respeito a aplicações biotecnológicas, os biopigmentos se destacam não apenas por sua capacidade de acrescentar cor a uma variedade de materiais, mas também pelas suas inúmeras propriedades. As funções fisiológicas dos biopigmentos microbianos estão, muitas vezes, relacionadas a estratégias de defesa contra condições ambientais adversas ou contra competidores e essas mesmas propriedades podem ser exploradas industrialmente. Além da atividade antioxidante, outras funções são apresentadas pelos biopigmentos e investigadas do ponto de vista biotecnológico. Exemplos de atividades biológicas apresentadas por biopigmentos estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Atividades biológicas apresentadas por biopigmentos

Biopigmento	Atividade	Referência
Anclaflavina, rubropuncatina e monascorubramina	Antimicrobiana	De Carvalho <i>et al.</i> (2014)
Melanina	Antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e imunogênica	Rosas <i>et al.</i> (2000); El-Nagar; El-Ewasy (2017)
Monafilona A e B	Antitumoral	Feng <i>et al.</i> (2012)
Prodígioisina	Antimalária, antimicrobiana e antineoplásica	Lapenda <i>et al.</i> , 2015
Violaceína	Antibacteriana, antiprotozoária, antitumoral e antioxidante	Venil; Zakaria; Ahmad, 2013

Fonte: própria autora.

Muitas das atividades biológicas de biopigmentos são avaliadas em estudos *in vitro*, porém algumas já são empregadas comercialmente. Moléculas que merecem destaque por sua aplicabilidade industrial são:

- a) Riboflavina: também conhecida como vitamina B2, é um pigmento amarelo, hidrossolúvel e produzido por inúmeros microrganismos, como bactérias do gênero *Bacillus* e leveduras do gênero *Candida*. É amplamente utilizada na indústria alimentícia, sendo incorporada a bebidas, alimentos para bebês, queijos e cereais (MALIK; TOKKAS; GOYAL, 2012; PANESAR; KAUR; PANESAR, 2015);
- b) Ficocianina: pigmento azul produzido por cianobactérias. Comercialmente, a biomassa de cianobactérias, que apresenta intensa coloração verde-azulada, é conhecida como *spirulina* e administrada como suplemento proteico (SETYONINGRUM; NUR, 2015);
- c) Prodigiosina: apresenta coloração vermelha e possui atividade antibiótica, antineoplásica e antimalárica. Destaca-se a produção por bactérias dos gêneros *Vibrio* e *Serratia* (DARSHAN; MANONMANI, 2015);
- d) Melaninas: são pigmentos escuros (coloração variando entre o marrom e o preto) produzidos por espécies de todos os domínios de seres vivos e que, além de se apresentarem como agentes antimicrobianos e antioxidantes, podem ser incorporados a filmes plásticos, protetores solares e vernizes (EL-NAGGAR; EL-EWASY, 2017);
- e) Astaxantina: carotenoide valorizado por sua atividade antioxidante e de eliminação de radicais livres. É utilizada como colorante na piscicultura, indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia. A produção industrial de astaxantina é majoritariamente obtida da alga *Haematococcus pluvialis* (SHAH *et al.*, 2016).
- f) B-caroteno: por suas propriedades bioativas e colorantes, o β -caroteno é utilizado em cosméticos, fármacos, alimentos e bebidas. Em escala industrial, os principais produtores são o fungo filamentoso *Blakeslea trispora* e a alga *Dunaliella salina* (BOGACZ-RADOMSKA; HARASYM, 2018).

Paralelamente aos sistemas industriais de produção de biopigmentos, vale ressaltar o tradicional cultivo do fungo *Monascus* para a obtenção de alimentos fermentados. A

produção de colorantes vermelhos por esse gênero de fungo é considerada o sistema mais antigo de obtenção de biopigmentos em larga escala. Esta é tradicionalmente realizada por meio da inoculação do fungo em bandejas contendo grãos de arroz cozidos e acondicionadas sob controle de temperatura e umidade (RAO; XIAO; LI, 2017; DE CARVALHO *et al.*, 2014).

Fungos do gênero *Monascus* produzem mais de 50 tipos de biopigmentos. O arroz vermelho (koji ou angkak) é o alimento fermentado por *Monascus* mais conhecido, porém seu emprego também inclui o processamento de carnes e peixes e a fabricação de queijos de soja e vinhos. O efeito do cultivo desses fungos sobre alimentos não se limita à alteração da cor dos produtos: os biopigmentos e outros metabólitos produzidos por *Monascus* apresentam uma série de atividades biológicas, como anti-inflamatória, redutora de colesterol, antidiabética, antineoplásica, imunossupressora e redutora da pressão arterial (DEMAIN; MARTENS, 2017).

As aplicações dos biopigmentos não são ligadas apenas a suas propriedades biológicas, mas também são desenvolvidas a partir da capacidade dessas moléculas de interagir com a luz, metais e outros materiais. A notória capacidade da melanina de interagir com metais, por exemplo, faz com que esse biopigmento possa ser usado em formulações para a suplementação de ferro ou em sensores para a detecção de metais em tempo real (CORDERO; CASADEVALL, 2017). Uma abordagem recente tem sido a elaboração de células solares sensibilizadas por corantes (na sigla em inglês, DSSC – *Dye Sensitized Solar Cells*), as quais apresentam um máximo de 13% de conversão da luz solar em energia elétrica. Essas células solares podem ser constituídas com clorofilas, carotenoides, antocianinas e flavonoides (SEMALTI; SHARMA, 2019).

Apesar das vantagens ambientais e para a saúde humana que os biopigmentos apresentam, eles ainda representam uma fração muito pequena dos pigmentos utilizados na indústria. Os principais obstáculos à utilização de biopigmentos em processos industriais se relacionam à instabilidade dessas moléculas e à normatização por parte das agências regulatórias. Essa observação se deve ao fato de que muitos biopigmentos são facilmente hidrolisados e/ou oxidados, não resistem ao processamento industrial e não mantêm sua estabilidade durante o tempo de prateleira previsto para alguns produtos (DE CARVALHO *et al.*, 2014).

Em produtos comerciais com baixa atividade de água (fármacos e cosméticos, por exemplo), a estabilidade dos biopigmentos consegue ser mantida. Em produtos com alto teor de umidade, por outro lado, possíveis alterações no grupo cromóforo podem ocorrer

em função do pH da solução, havendo, então, a necessidade de se encontrar um dispersante adequado para essas moléculas. Formulações com pigmentos naturais também podem exigir a incorporação de agentes antioxidantes e o uso de técnicas de microencapsulamento para que seja possível contornar a hidrofobicidade dos compostos. Todos esses fatores encarecem o produto final (DE CARVALHO *et al.*, 2014).

De acordo com Rao, Xiao e Li (2017), a consolidação de um processo industrial baseado em um biopigmento é interdependente de sua estabilidade, toxicidade, regulamentação e custos envolvidos no escalonamento do processo. Perante às agências regulatórias, alguns critérios relevantes para a aprovação do uso de um biopigmento são: grau de pureza, origem do produto e especificação da quantidade permitida em cada formulação (MUSSAGY *et al.*, 2019).

Berman *et al.* (2015) mencionam que o procedimento para autorização de um novo composto pelas comissões europeias dura, em média, dez anos e um novo processo será instituído se o mesmo produto for obtido através de uma plataforma distinta. Os autores também discorrem sobre a resistência da comunidade europeia em aprovar produtos cuja obtenção envolva técnicas de engenharia metabólica ou manipulações genéticas.

A liberação de biopigmentos no ambiente e sua sucessiva degradação pode provocar efeitos adversos, e, portanto, é fundamental que sejam considerados aspectos ecotoxicológicos da aplicação de um biopigmento. Atualmente, há poucos estudos na literatura que abordam aspectos ecotoxicológicos e toxicológicos de biopigmentos, contudo a identificação de efeitos nocivos não impede totalmente sua utilização: conforme apresentado por Venil *et al.* (2020), biopigmentos que apresentem toxicidade poderiam ser restritos a aplicações que não envolvam sua ingestão, como o tingimento de tecidos.

A avaliação da toxicidade de um biopigmento deve considerar, igualmente, sua transformação por fatores ambientais. O estudo de Abe *et al.* (2018), por exemplo, identificou alterações fisiológicas relacionadas a estresse ambiental em larvas de *Danio rerio* quando estas foram expostas a um colorante sintético (“Basic Red” 51) ou à eritrostominona (biopigmento), porém tais alterações cessaram quando o biopigmento foi naturalmente degradado pela exposição à luz.

2.1.2.2 Carotenoides e leveduras carotenogênicas

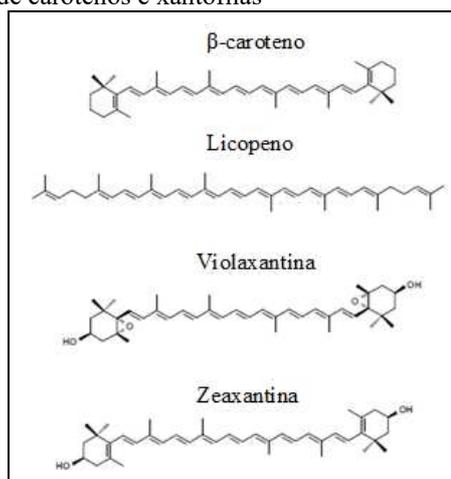
Carotenoides são terpenoides contendo 40 átomos de carbono e, em sua estrutura, unidades opostas se unem no centro da molécula. De acordo com Aksu e Eren (2005), os

carotenoides são a classe de biopigmentos de distribuição mais ampla na natureza e apresentam as colorações vermelha, laranja e amarela. A diversidade de cores que essas moléculas assumem se relaciona à variedade de ligações duplas conjugadas presentes em sua estrutura química: são mais de 600 variedades conhecidas derivadas de reações de isomerização, ciclização, rearranjos, migração de duplas ligações, hidrogenação e desidrogenação, encurtamento ou alongamento de cadeias, inserção de funções contendo oxigênio ou combinações dessas reações (ZOZ *et al.*, 2015; KOT *et al.*, 2016; UENOJO; MARÓSTICA JUNIOR; PASTORE, 2007).

A classificação dos carotenoides se baseia na presença ou ausência de átomos de oxigênio em sua composição. Carotenoides não oxigenados são denominados carotenos, enquanto os que possuem substituintes contendo oxigênio, como grupamentos ceto e hidroxila, são xantofilas (MATA-GÓMEZ *et al.*, 2014).

A estrutura molecular não interfere apenas na cor dos carotenoides, mas também em sua capacidade antioxidante. Uenojo, Maróstica Junior e Pastore (2007) descreveram que há uma relação diretamente proporcional entre a atividade antioxidante de um carotenoide e o número de grupos cetona, ligações duplas conjugadas e com a existência de anéis ciclopentano em sua composição. Desta forma, verifica-se que xantofilas (como a astaxantina, violaxantina e zeaxantina) apresentam atividade antioxidante superior a dos carotenos, como o licopeno e o β -caroteno (Figura 3).

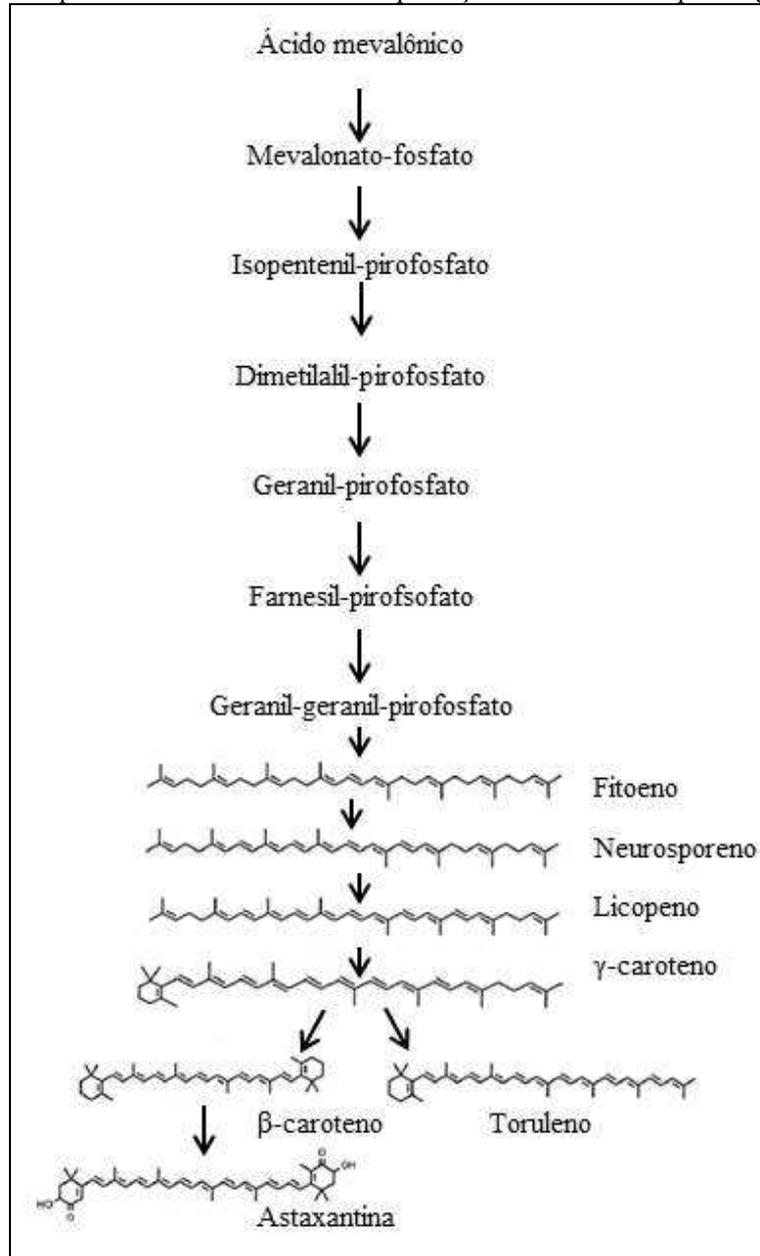
Figura 3 - Exemplo de estrutura de carotenos e xantofilas



Fonte: adaptado de Fernandes *et al.* (2018).

Assim como reportado por Uenojo, Maróstica Junior e Pastore (2007), a via metabólica da biossíntese de carotenoides em fungos é a dos isoprenoides e as principais reações envolvidas nesta estão apresentadas na Figura 4.

Figura 4 - Representação esquemática da via metabólica de produção de carotenoides por fungos



Fonte: adaptado de Hernández-Almanza *et al.* (2014) e de Zoz *et al.* (2015).

De acordo com Mata-Gómez *et al.* (2014), a sequência de reações dessa via metabólica foi elucidada por Goodwin (1980) e pode ser resumida em três etapas principais:

- a) Conversão de uma molécula de acetil-CoA a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) pela enzima HMG-CoA-sintase e sucessiva conversão do HMG-CoA em

ácido mevalônico (AMV), que é convertido a isopentenilpirofosfato (IPP) por meio de reações de fosforilação e uma carboxilação do AMV;

- b) Isomerização do IPP em dimetilalilpirofosfato (DMAPP) e adição subsequente de duas moléculas de IPP ao DMAPP. A partir desse intermediário, a enzima prenil-transferase catalisa a síntese do geranylgeranilpirofosfato (GGPP), um composto de 20 átomos de carbono. A condensação de duas moléculas de GGPP dá origem ao fitoeno, que, ao sofrer dessaturação, se transforma em licopeno;
- c) Isomerização da primeira ou segunda ligação dupla do fitoeno, ocorrendo concomitantemente ao processo de dessaturação.

A carotenogênese é um processo que ocorre a partir da liberação de acetil-CoA por meio das reações de β -oxidação na mitocôndria ou por clivagem do citrato em decorrência da descontinuidade do ciclo do ácido cítrico (MUSSAGY *et al.*, 2019; SAENGE *et al.*, 2011). As enzimas que coordenam esse processo são associadas à membrana plasmática ou integradas a ela. A conversão do geranyl-geranyl pirofosfato a fitoeno é catalisada pela enzima fitoeno sintase, cuja atividade requer o consumo de ATP, a participação dos cofatores Mn^{2+} Mg^{2+} e é inibida pela presença de íons fosfato e de esqualostatina (SANDMANN, 2001).

A via metabólica da síntese de carotenoides é particularmente mais simples em fungos quando comparada a organismos fotossintetizantes. As enzimas fitoeno sintase e licopeno/caroteno ciclase são codificadas por um único gene e as etapas de dessaturação que ocorrem a partir da síntese do fitoeno são catalisadas pela mesma enzima (RODRIGUEZ-CONCEPCION *et al.*, 2018). A enzima fitoeno dessaturase introduz quatro ligações duplas na estrutura do fitoeno, dando origem ao licopeno, o primeiro carotenoide colorido. As ciclases, por sua vez, formam os anéis β -ionona nas extremidades dos carotenoides (OJIMA *et al.*, 2006; SANDMANN, 2001).

As reações que levam à produção das xantofilas consistem na inserção de grupamentos cetona e hidroxilas nos anéis β -ionona. Essas funções são coordenadas por uma dioxigenase que cliva o toruleno e uma aldeído-desidrogenase que catalisa a formação da carboxila terminal. Foi reconhecido que a conversão de β -caroteno à xantofila zeaxantina é dependente de oxigênio (RODRIGUEZ-CONCEPCION *et al.*, 2018; SANDMANN, 2001).

2.1.2.2.1 Condições de cultivo e sua relação com a produção de carotenoides

Apesar da existência de inúmeros estudos sobre a via metabólica que leva à produção de carotenoides, ainda permanecem lacunas quanto à síntese de alguns carotenoides microbianos. Ademais, os mecanismos regulatórios do metabolismo de carotenoides devem ser melhor compreendidos assim como suas funções fisiológicas em organismos não-fotossintetizantes. O desenvolvimento dessa área de estudo é de fundamental importância para a otimização de processos biotecnológicos com foco na obtenção desses pigmentos e para as aplicações de carotenoides se tornarem mais diversificadas e valorizadas.

De acordo com a literatura, as principais variáveis de um processo microbiano que exercem efeito significativo na produção de carotenoides são: fonte de carbono, fonte de nitrogênio, relação carbono/nitrogênio (C/N), temperatura, pH, agitação e aeração e incidência luminosa. Considerações sobre o efeito dessas variáveis sobre a produção de carotenoides por fungos e leveduras serão abordadas a seguir.

A fonte de carbono é considerada um dos parâmetros mais importantes para a produção de carotenoides. Verifica-se, por exemplo, uma diferença no uso de fontes de carbono fermentescíveis ou etanol: enquanto a primeira categoria, ao ativar os genes associados à glicólise, poderia desfavorecer a formação de acetil-coA, a segunda possibilita a síntese de acetato, que é convertido a acetil-coA e estimula o metabolismo secundário, inclusive a carotenogênese (MARCOLETA *et al.*, 2011; MATA-GÓMEZ *et al.*, 2014). Observou-se, também, que o emprego de etanol como fonte de carbono pode modificar as porcentagens de produção de diferentes carotenoides: Kot *et al.* (2016) observaram que, ao utilizar este substrato, *R. glutinis* produziu quantidades maiores de β -caroteno e toruleno em detrimento da síntese de torularodina.

O estudo de Ferdes *et al.* (2011) avaliou a produção de carotenoides totais e de torularodina por *R. rubra* utilizando quatro diferentes açúcares como fonte de carbono (glicose, frutose, sacarose e maltose). Os autores observaram diferenças na produção de biopigmentos, sendo que o efeito mais significativo foi da maltose sobre a produção de torularodina: com esse substrato, a produção do biopigmento foi de 53 $\mu\text{g/L}$, enquanto que, para todos os demais açúcares, foi superior a 260 $\mu\text{g/L}$. Outros estudos, como o de Cardoso *et al.* (2016), avaliaram a utilização de glicerol como fonte de carbono e verificaram aumentos na produção e na produtividade desses biopigmentos.

A literatura apresenta não apenas o efeito da natureza da fonte de carbono sobre a produção de biopigmentos, mas também de sua concentração. Enquanto alguns estudos verificaram o fenômeno da inibição pelo substrato ou, até mesmo, a inibição de genes relacionados a carotenogênese em determinadas concentrações de glicose (CHOUDHARI; SINGHAL, 2008; MARCOLETA *et al.*, 2011; VALDUGA *et al.*, 2011), outros encontraram, por meio de planejamentos experimentais, relações positivas entre a concentração da fonte de carbono e a produção de carotenoides (PARK *et al.*, 2005; YANG; TAN; YANG, 2011). A resposta à fonte de carbono depende da natureza do microrganismo e de sua fisiologia, portanto é de grande importância avaliar a influência dessa variável em um bioprocessamento com uma espécie ou linhagem sobre a qual não há estudos prévios.

O efeito da fonte de nitrogênio é igualmente importante nesse campo biotecnológico. Voaides e Dima (2012), por exemplo, avaliaram a produção de carotenoides por *Rhodotorula* sp. em meios de cultivo contendo cinco diferentes sais de amônio e verificaram uma diferença significativa entre os valores de carotenoides totais obtidos. O emprego de oito diferentes fontes orgânicas complexas de nitrogênio também resultou em valores significativamente distintos de crescimento celular e produção de carotenoides pelo fungo *B. trispora*, sendo que aquelas que favoreceram o crescimento celular não necessariamente incrementaram a carotenogênese (CHOUDHARI; SINGHAL, 2008)

Outro resultado importante foi obtido por Mihalcea *et al.* (2011): segundo os autores, pequenas concentrações de aminoácidos exercem uma influência maior sobre a produção de biopigmentos do que fontes inorgânicas de nitrogênio. Em contrapartida, o estudo de Yang *et al.* (2011), verificou que, entre diferentes fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio, o emprego de extrato de levedura ou o sulfato de amônio resultou em valores semelhantes de produção de astaxantina.

A contribuição dos nutrientes para a carotenogênese não deve ser considerada de forma independente, pois existe interação entre os diferentes componentes do meio de cultivo. De particular relevância para a síntese de carotenoides é a razão carbono/nitrogênio (relação C/N). Os estudos que avaliaram tal parâmetro indicaram que relações C/N altas são favoráveis ao processo de carotenogênese (GARBAYO *et al.*, 2003; PARK *et al.*, 2005; SAENGE *et al.*, 2011).

Uma vez que a síntese de lipídeos e de carotenoides apresentam um precursor em comum (acetil-coA), as condições que ativam o catabolismo dos primeiros ocasionam a

carotenogênese também. Em condições de alta disponibilidade de carbono e limitação de outros nutrientes, principalmente nitrogênio, o crescimento celular é dificultado e as células começam a armazenar moléculas de reserva. O direcionamento do acetil-coA para a lipogênese acaba por ativar a via dos carotenoides também (SAENGE *et al.*, 2011). Vale lembrar que a limitação nutricional do meio de cultivo também se configura como uma condição de estresse metabólico, outro fator que estimula a carotenogênese.

De acordo com a literatura, a temperatura do processo também exerce efeito marcante sobre a via bioquímica de produção de carotenoides, pois modula a atividade das enzimas envolvidas na via metabólica em questão (MATA-GÓMEZ *et al.*, 2014). Buzzini e Martini (1999), por exemplo, observaram que um aumento da temperatura de 25°C para 30°C alterou a proporção de β -caroteno de 16% para 9,3% e de toruleno de 18% para 9,4%, sendo essas porcentagens em relação ao conteúdo total de carotenoides. A produção de torularodina, por sua vez, foi favorecida pelo aumento de temperatura. Heer e Sharma (2017) destacaram, também, a importância do pH para a produção biotecnológica de pigmentos. Segundo os autores, o pH do meio influencia não apenas o crescimento celular como também o tipo de pigmento produzido. Aksu e Eren (2005) observaram que um incremento gradativo no pH resultou no aumento da produção de carotenoides, que atingiu seu valor máximo na faixa de pH entre 6,8 e 7, coincidindo com o pH ótimo para o crescimento celular.

Entre as informações trazidas na literatura, o papel do pH sobre a produção de carotenoides não é claro. Enquanto alguns trabalhos observaram que os melhores resultados de produção de carotenoides totais foram em condições de pH entre 6 e 7 (CHOUDHARI; SINGHAL, 2008; SAENGE *et al.*, 2011), outros não observaram uma correlação significativa entre essas variáveis (MALDONADE; RODRIGUEZ-AMAYA; SCAMPARINI, 2012; PARK *et al.*, 2005). Assim como mencionado para as demais variáveis de processo, o efeito do pH é dependente da espécie de microrganismo em estudo.

Outro parâmetro que exerce influência sobre a via metabólica é a aeração. Para os microrganismos aeróbios, a produção de carotenoides será possível apenas se a aeração for suficiente para manter a transferência de oxigênio em um nível adequado quando a viscosidade do meio aumentar em função do crescimento celular (SAENGE *et al.*, 2011).

Conforme discutido, algumas enzimas que participam da síntese de xantofilas são dependentes de oxigênio, sendo assim, a aeração se faz fundamental para obtenção de

alguns carotenoides. O estudo de Johnson e Lewis (1979), por exemplo, identificou que, em condições de microaerofilia, a via carotenogênica da levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) é deslocada no sentido de produzir carotenos. Já condições com maiores níveis de aeração permitem a formação das funções hidroxila da astaxantina (carotenoide oxigenado) e as reações ocorrem no sentido de acumular o pigmento.

Mata-Gómez *et al.* (2014) relataram que a luz também é um fator-chave para este processo bioquímico. A presença de luz estimula a carotenogênese, uma vez que esta atividade é um mecanismo protetor contra os efeitos nocivos da radiação sobre as estruturas celulares. O estudo de Yen e Zhang (2011), por exemplo, demonstrou que a produção de β -caroteno pela levedura *Rhodotorula glutinis*, ao ser cultivada em reator contendo lâmpadas do tipo LED, foi de 24,6 $\mu\text{g/g}$, enquanto que, em ausência dessas lâmpadas, a produção foi de 14,69 $\mu\text{g/g}$.

Outro efeito sobre a via metabólica que tem sido estudado é o do estresse oxidativo, provocado tanto por metais pesados quanto pela presença de H_2O_2 . No estudo de Irazusta *et al.* (2013), observou-se que, para a espécie *Rhodotorula mucilaginosa*, o cultivo em presença de Cu^{2+} favoreceu a produção de toruleno e de γ -caroteno e teve um efeito negativo sobre a síntese de β -caroteno. A adição de H_2O_2 ao meio modificou, igualmente, os tipos de carotenoides produzidos e modificou a concentração de carotenoides totais. O efeito estimulante de metais-traço (como Al^{3+} , Zn^{2+} e Ba^{2+}) também foi relatado por Mata-Gómez *et al.* (2014) e se atribui a eles a capacidade de ativar enzimas específicas da carotenogênese.

El-Banna, El-Razek e El-Mahdy (2012) avaliaram o efeito de sais de cálcio, magnésio, ferro, cobre e zinco sobre a carotenogênese de *R. glutinis*. Os autores verificaram que a adição de sulfato de zinco resultou em uma produção de carotenoides aproximadamente duas vezes maior do que aquela observada no controle. O efeito da adição de sulfato de ferro e de cobre também foi considerado vantajoso para o processo.

De acordo com Mata-Gómez *et al.* (2014), os carotenoides microbianos são, em termos de produção, mais vantajosos do que os de plantas e os carotenoides sintéticos. Isso por causa de sua independência de fatores sazonais e/ou geográficos e pela menor geração de resíduos nocivos para sua obtenção. Outra vantagem é a possibilidade de utilização de substratos de baixo custo (por exemplo, soro de leite, mosto de uva, xarope de milho e melaço de cana-de-açúcar) como insumos para a obtenção dessas moléculas, o que as torna economicamente atrativas. Ressalta-se, igualmente, que, devido à homologia existente no

metabolismo eucariótico, é esperado que os animais tenham a capacidade de metabolizar com mais facilidade compostos produzidos por algas, fungos e leveduras do que por bactérias (DE CARVALHO *et al.*, 2014).

Em relação à produção de carotenoides por leveduras, quatro gêneros se destacam: *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces* e *Sporodiobolus*. Estes têm sido estudados há mais de 60 anos, porém, devido à rudimentariedade das técnicas de extração e quantificação existentes no início desses estudos, poucos dados são realmente conclusivos quanto ao comportamento da produção de carotenoides produzidos por leveduras desses gêneros (BUZZINI *et al.*, 2007).

Comparando-se a produção de biopigmentos por leveduras e por fungos filamentosos, a obtenção dessas moléculas a partir de leveduras pode ser considerada mais complexa por envolver etapas de extração dos pigmentos, pois estes são produzidos intracelularmente. Exemplos de técnicas utilizadas no processamento *downstream* de carotenoides são: rompimento enzimático combinado a ondas de ultrassom e moagem em moinho de bolas (MICHELON *et al.*, 2012) e congelamento com N₂ seguido de maceração (VALDUGA *et al.*, 2009a). Embora a necessidade de extração seja um fator que dificulta o processo, a produção biotecnológica por leveduras apresenta a vantagem de que muitos desses microrganismos, como espécies do gênero *Rhodotorula*, não oferecem riscos à saúde humana, diferentemente do observado para fungos filamentosos (HERNÁNDEZ-ALMANZA *et al.*, 2014).

2.1.2.2.2 A levedura *P. kudriavzevii* e suas aplicações biotecnológicas

A levedura *Pichia kudriavzevii*, anteriormente denominada *Candida krusei*, *Issatchenkia orientalis* e *Candida glycerinogenes* (DOUGLASS *et al.*, 2018) se destaca por sua resistência ao estresse ácido e osmótico, a altas concentrações de etanol e por sua termotolerância (KITAGAWA *et al.*, 2010). Ressalta-se que a adoção do nome científico *Pichia kudriavzevii* ocorreu recentemente (DOUGLASS *et al.*, 2018; KURTZMAN; ROBNETT; BASEHOAR-POWERS, 2008) e, na literatura atual, ainda é comum a utilização do nome anterior, *Issatchenkia orientalis*.

Do ponto de vista taxonômico (NCBI:txid4909), essa espécie apresenta a seguinte classificação:

Domínio: *Eukarya*;

Ordem: *Saccharomycetales*;

Família: *Pichiaceae*;

Gênero: *Pichia*.

Reino: *Fungi*;
Subreino: *Dikarya*;
Filo: *Ascomycota*;
Subfilo: *Saccharomycotina*;
Classe: *Saccharomycetes*;

P. kudriavzevii é uma levedura de distribuição ampla na natureza e ocorre frequentemente em processos de fermentação espontânea, sendo parte habitual da microbiota que participa da fermentação do cacau (PEREIRA *et al.*, 2017). Tradicionalmente, essa levedura é utilizada na elaboração de uma série de alimentos fermentados, como mandioca, leite, bebidas à base de milho e vinagres. Há estudos que apontam para sua utilização como probiótico também. Suas aplicações em alimentos fazem com que a espécie seja, habitualmente, classificada como *GRAS* (*Generally Regarded As Safe*) (DOUGLASS *et al.*, 2018).

Do ponto de vista industrial e biotecnológico, as características fisiológicas dessa espécie diversificam suas aplicações para a obtenção de diversos bioprodutos. Além de sua alta resistência a fatores ambientais adversos, relata-se que diversas linhagens dessa levedura são capazes de assimilar pentoses, o que permite o aproveitamento da fração hemicelulósica da biomassa vegetal para a obtenção de bioprodutos (TAYEH *et al.*, 2014). Exemplos de bioprodutos de interesse industrial obtidos a partir da levedura *P. kudriavzevii* estão listados na Tabela 3.

Tabela 3 - Produtos de importância industrial produzidas por *P. kudriavzevii*

Produto	Referência
Etanol	Oberoi <i>et al.</i> , 2012
L-Asparaginase	Muso-Cachumba <i>et al.</i> , 2017
Fitases	Hellström <i>et al.</i> , 2010
Biossurfactantes	Katamai <i>et al.</i> , 2008
Lipases	Costas, Deive e Longo, 2004
Biodiesel	Sankh <i>et al.</i> , 2013

Fonte: própria autora.

Outra aplicação biotecnológica da levedura *P. kudriavzevii* é na biodegradação e destoxificação de efluentes e materiais diversos. Fonseca *et al.* (2011) utilizaram a

levedura para a destoxificação do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar, enquanto Nakasaki, Araya e Mimoto (2013) verificaram a capacidade da espécie de acelerar o processo de compostagem de materiais orgânicos. Abigail, Abdul Salam e Das (2013), por outro lado, relataram sucesso em degradar o herbicida atrazina ao cultivar *P. kudriavzevii* em meio líquido contendo solo contaminado.

Pesquisas sobre a literatura científica não resultaram no conhecimento de trabalhos que discorressem sobre a biossíntese de pigmentos por essa espécie, contudo resultados anteriores de estudos preliminares desenvolvidos no Laboratório de Bioprocessos e Produtos Sustentáveis (LBios), grupo pertencente ao Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (DEBIQ- EEL-USP), verificaram que, ao ser cultivada em meio contendo xilose, essa levedura apresentou coloração róseo-alaranjada, indicando seu potencial de ser explorada quanto à produção de biopigmentos.

O banco de leveduras do Laboratório de Bioprocessos e Produtos Sustentáveis (LBios) possui duas linhagens de *P. kudriavzevii*: *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098, isolada de efluente industrial contendo compostos fenólicos, e a linhagem utilizada neste trabalho, sem referencia ao local de identificação. Ambas são provenientes da China e foram gentilmente cedidas pelo China Center for Type Culture Collection (CCTC).

Os primeiros estudos realizados no LBios com as linhagens em questão foram direcionados à destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos. Avaliou-se, principalmente, a capacidade das leveduras de remover furanos (BARATELLA *et al.*, 2010a) e ácido acético (BARATELLA *et al.*, 2010b).

No estudo de Fonseca e colaboradores (2009), a levedura *I. orientalis* CCTCC M 206098 foi cultivada em um hidrolisado misto não destoxificado de bagaço de cana-de-açúcar e foi capaz de remover 100% do furfural, 84% do hidroximetilfurfural, 16,7% do siringaldeído e 17% do ácido ferúlico presentes neste hidrolisado. O trabalho também demonstrou a utilização de xilose como fonte de carbono pela levedura.

Em um segundo momento, pesquisas do grupo buscaram elucidar aspectos da produção de L-asparaginase periplasmática pela mesma linhagem de *I. orientalis* utilizada no presente trabalho. Soler e colaboradores (2015) avaliaram a influência da presença de L-asparagina sobre a produção de L-asparaginase por esta levedura e registraram uma atividade de 0,218 U/10⁸ células. Muso-Cachumba (2017), por outro lado, verificou a

influência da velocidade de agitação do cultivo sobre a produção de asparaginase por *I. orientalis*, atingindo uma atividade enzimática periplasmática de 26.46 U/L a 300 rpm.

Paralelamente, *I. orientalis* (mesma linhagem utilizada neste trabalho) foi avaliada por Marcelino (2016) como produtora de biosurfactantes. O autor identificou que o biosurfactante produzido pela levedura apresenta atividade hemolítica e resposta positiva no teste de espalhamento da gota. O índice de emulsificação de 24h do biosurfactante foi de 22,5%, mantendo-se até 144h.

No trabalho de Marcelino (2006), verificou-se que a linhagem em estudo, além de apresentar pigmentação quando cultivada em placas de Petri com o meio YMA, manteve seu aspecto pigmentado em meios de cultivo contendo pentoses. Essa observação foi o ponto de partida para o desenvolvimento de uma pesquisa que tivesse como objetivo central a elucidação da produção de biopigmentos por essa levedura.

Considerando a importância crescente dos biopigmentos e do desenvolvimento de um processo sustentável para a sua produção, investigações sobre a produção destes por *P. kudriavzevii* são contribuições valiosas. Vale ressaltar que capacidade da levedura de se adaptar a condições ambientais adversas e a possibilidade de utilização de subprodutos agrícolas no bioprocessamento de produção de biopigmentos são outros fatores que notabilizam o desenvolvimento dessa pesquisa.

2.1.2.2.3 Biotecnologias utilizadas para a produção de carotenoides por fungos filamentosos e leveduras

Os carotenoides são uma classe de biopigmentos mais relevantes para aplicações industriais. Estes podem ser derivados de plantas, microrganismos e sínteses químicas. Enquanto que a indústria de rações e a aquicultura valem-se das propriedades colorantes dessas moléculas, as indústrias cosmética, alimentícia e farmacêutica exploram suas propriedades bioativas (MATA-GÓMEZ *et al.*, 2014; SAINI; KEUM, 2019). Atualmente, 80 a 90% dos carotenoides utilizados na indústria são provenientes de sínteses químicas (SAINI; KEUM, 2019).

O aumento da participação dos carotenoides naturais no mercado depende, principalmente, de dois fatores: da regulamentação de seu uso por parte das agências governamentais e do aprimoramento de sua produção em larga escala. Industrialmente, há a necessidade de redução de custos de produção de forma que esses biopigmentos sejam economicamente competitivos em relação aos carotenoides sintéticos (VENIL *et al.*, 2020).

Estratégias para diminuir custos de produção e ampliar a oferta desses produtos envolvem tanto o desenvolvimento de linhagens metabolicamente engenheiradas para superexpressar biopigmentos quanto o estudo da configuração de biorreatores e o aprimoramento dos sistemas de controle de processo, além da substituição de substratos de origem comercial por insumos de baixo custo, como subprodutos agrícolas (MATA-GÓMEZ *et al.*, 2014; NIGAM; LUKE, 2016).

A produção industrial de carotenoides naturais ocorre, principalmente, por meio de plataformas microbianas. Muitos sistemas são baseados em microalgas e permitem a produção de cantaxantina, fucoxantina, licopeno, astaxantina, β -caroteno *etc.*, porém fungos filamentosos (*Blakeslea trispora*, *Mucor circinelloides*), leveduras (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) e bactérias (*Gordonia jacobea*) também compõem o cenário da produção em larga escala.

Assim como descrito por Nigam e Luke (2016), a produção de carotenoides tem sido estudada tanto em sistemas de fermentação sólida, que apresentam a vantagem de se aproximar das condições naturais de crescimento de muitos microrganismos, quanto em cultivos submersos, sistemas nos quais a recuperação do produto final é facilitada. Mata-Gómez *et al.* (2014) destacaram que inúmeros trabalhos avaliam a produção de carotenoides em reatores de tanque agitado, os quais apresentam as vantagens de permitir a homogeneidade do meio e o controle acurado dos parâmetros do sistema. As etapas gerais da produção microbiana de carotenoides podem ser resumidas da seguinte maneira:

- a) Seleção do substrato mais propício para cada microrganismo, considerando a habilidade natural de cada linhagem em utilizar determinadas fontes de carbono. É igualmente importante definir se um material sólido será utilizado apenas como suporte ou poderá ser degradado e assimilado como fonte de carbono;
- b) Definição da configuração do biorreator e das variáveis que permitem os melhores rendimentos;
- c) Processamento *downstream*, que envolve, principalmente, a ruptura celular e a recuperação dos biopigmentos intracelulares. Essa etapa é a principal em termos de custo do processo e na qual residem os principais desafios da produção comercial destas moléculas.

Os cultivos em estados sólido, ou fermentação em estado sólido, permitem o aproveitamento de inúmeros materiais lignocelulósicos como matriz para o crescimento celular de fungos filamentosos (PANESAR; KAUR; PANESAR, 2015). Essa estratégia de produção também pode envolver o crescimento de microrganismos carotenogênicos sobre a superfície de alimentos, como queijos (GALAUP *et al.*, 2015).

O cultivo de *Neurospora* spp. em diversos subprodutos agroindustriais para a produção de β -caroteno tem sido avaliado e a utilização de compostos ricos em nitrogênio (como resíduos sólidos da produção de tofu) foi considerada particularmente vantajosa para o processo. Esses estudos também indicam a possibilidade de obtenção de alimentos ricos em carotenoides para a alimentação animal e, até mesmo, consumo humano. Um dos sistemas foi efetivamente ampliado para 80 m³ (GMOSER *et al.*, 2017).

Em âmbito industrial, contudo, os cultivos submersos são mais utilizados e permitem que o processo seja controlado detalhadamente. O cultivo do fungo *Blakeslea trispora*, por exemplo, é realizado por algumas indústrias e a utilização do β -caroteno e do licopeno sintetizados por esse organismo em formulações alimentícias (leite, margarina, bebidas) é regulamentada e permitida na União Europeia (GMOSER *et al.*, 2017; MUSSAGY *et al.*, 2019; VENIL *et al.*, 2020).

Em relação às leveduras, os sistemas de cultivo submerso abrangem tanto o cultivo em pequena escala (frascos agitados), quanto biorreatores de bancada ou em escala industrial. Dado que a aeração é um fator relevante para a produção de carotenoides, um máximo de 75% da capacidade do biorreator é usualmente utilizada e se faz necessário avaliar a influência do volume de meio de cultivo no processo (MATA-GÓMEZ *et al.*, 2014).

Entre as formas de condução do processo de produção de carotenoides por fungos e leveduras em reatores, as mais relatadas são a batelada e a batelada alimentada. A batelada alimentada se apresentou como um sistema favorável a esse bioprocessamento em alguns trabalhos (COLET; DI LUCCIO; VALDUGA, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2019), pois esta permite o reestabelecimento da relação C/N favorável ao processo e o consequente prolongamento da fase de acúmulo de carotenoides. Colet, Di Lucci e Valduga (2015) observaram uma produção 1,3 vezes maior em batelada alimentada do que em batelada simples, enquanto no estudo de Rodrigues *et al.* (2019) o aumento foi de 400%.

A produção de carotenoides por leveduras também tem sido investigada em reatores do tipo *airlift*. O estudo de Varmira *et al.* (2018) constatou que, em comparação ao cultivo em frascos, o cultivo em reator *airlift* não apenas antecipou a produção de

carotenoides por *R. rubra*, como também aumentou a produção em, aproximadamente, 100%.

Yen, Chang e Chang (2015) compararam a produção de carotenoides por *R. glutinis* em reator de tanque agitado e em reator *airlift*. Os autores identificaram que o cultivo no biorreator do tipo *airlift* propiciou valores superiores de concentração celular e produção de lipídeos. Os biorreatores do tipo *airlift* podem ser considerados mais vantajosos do que os reatores de tanque ativado devido à simplicidade de aeração e menor custo de processo devido à ausência de hélices para promover a agitação mecânica (YEN; CHANG; CHANG, 2015).

Um dos campos da biotecnologia que tem sido recentemente ampliado para a obtenção de melhores rendimentos no processo de produção de biopigmentos é o da biologia molecular e, mais especificamente, da engenharia metabólica (VENIL; ZAKARIA; AHMAD, 2013). A Tabela 4 apresenta estudos recentes envolvendo a produção de carotenoides através da engenharia metabólica de leveduras:

Tabela 4 – Exemplos da aplicação da engenharia metabólica para a produção de carotenoides por leveduras

Levedura	Técnica utilizada	Principal resultado	Referência
<i>S. cerevisiae</i>	Expressão heteróloga e mutação ARTP	Rendimento de astaxantina superior aos dados da literatura	Jin <i>et al.</i> , 2018
<i>S. cerevisiae</i>	Expressão heteróloga por estratégia multinível.	Maior produção de violaxantina já relatada na literatura	Cataldo <i>et al.</i> , 2020
<i>S. cerevisiae</i>	Modificações para o metabolismo de xilose e glicose para aumentar a produção de carotenoides.	Linhagem engenheirada produziu 2,6 vezes mais carotenoides do que a linhagem parental.	Su, Song e Zhu, 2020
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Construção de uma linhagem produtora de 3S,3'S-astaxantina e com rendimento aumentado (mutação sítio-dirigida).	Produção de astaxantina atóxica e com potencial antioxidante, supressora da atividade da tirosinase e inibidor de metástases.	Tseng <i>et al.</i> , 2020
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Trasformação, pela clonagem <i>Golden gate</i> , de uma linhagem previamente modificada para produzir carotenoides.	Linhagem com capacidade aumentada de produção de β -caroteno.	Larroude <i>et al.</i> , 2017

Fonte: própria autora.

Estudos recentes (WANG *et al.*, 2017; YOLMEH *et al.*, 2017; LIM *et al.*, 2015) utilizam técnicas como a do DNA recombinante, clonagem dos genes responsáveis pela produção de biopigmentos e sua expressão em outros organismos. As ferramentas mais utilizadas para o aprimoramento genético de microrganismos produtores de carotenoides estão resumidas abaixo:

- a) Radiação ultravioleta: o efeito mutagênico da radiação UV consiste em formar dímeros de pirimidinas que impedem a atividade da enzima DNA-polimerase (RASTOGI *et al.*, 2010). Essa técnica foi utilizada com sucesso para aumentar a

produção de carotenoides totais pela alga *Micrococcus roseus* PTCC 1411 (YOLMEH *et al.*, 2017);

- b) Radiação gama: a variedade mutante da levedura *Phaffia rhodozyma*, obtida por essa técnica, atingiu uma produção de astaxantina de 2562,5 µg/g de biomassa em comparação com os 196,6 µg/g produzidos pela linhagem parental (NAJAFI *et al.*, 2011);
- c) Plasma a pressão e temperatura atmosféricas: essa técnica mutagêncica causa inúmeros danos ao DNA plasmidial e a oligonucleotídeos (JIN *et al.*, 2018). Um estudo com *B. trispora* obteve um aumento de 55% na produção de licopeno por este fungo e reduziu a necessidade de oxigênio para o crescimento celular (QIANG *et al.*, 2014);
- d) Metil-nitrosoguanidina e metanossulfonato de etila: esses agentes mutagênicos promovem a substituição de bases e o consequente desemparelhamento da síntese de DNA (EL-BIALY; ABOU EL-NOUR, 2015; HARPER; LEE, 2012). O estudo de Zhang *et al.* (2016a) combinou essas técnicas para a produção de uma linhagem mutante de *Rhodospiridium toruloides* e verificou-se sua capacidade aumentada de produção de lipídeos e carotenoides em relação à linhagem parental.

Em escala laboratorial, a expressão heteróloga de genes relacionados à carotenogênese tem sido amplamente estudada. Como exemplo, pode-se citar o estudo de Xu *et al.* (2018), em que se transferiu genes da bactéria *Deinococcus wulumuqiensis* para *E. coli*, atingindo-se uma produção de carotenoides de 688 mg/L, um valor 2,2 vezes superior ao obtido com a linhagem original. A expressão heteróloga de carotenoides em *S. cerevisiae* também tem sido uma estratégia bastante utilizada nessa área de pesquisa. Como exemplo, uma linhagem de *S. cerevisiae* foi desenvolvida com genes para a produção de violaxantina derivados da alga *Haematococcus lacustris* e da bactéria *Pantoea ananatis*. A produção desses carotenoides (7,3 mg/g de célula) foi a mais alta já registrada até o momento (CATALDO *et al.*, 2020)

2.1.2.2.3 Tecnologias de extração de carotenoides intracelulares

Entre as espécies de microrganismos que produzem biopigmentos, algumas o fazem de forma extracelular, intracelular ou de ambas as formas, dependendo da molécula produzida (NIGAM; LUKE, 2016). As melaninas e os pigmentos de *Monascus*, por

exemplo, se encontram tanto no interior das células quanto nos meios de cultivo (LIN; DEMAIN, 1993; NOSANCHUK; STARK; CASADEVALL, 2015).

As células dos fungos apresentam duas camadas de proteção, a membrana plasmática, que atua como uma barreira seletivamente permeável e regula o trânsito de moléculas entre os meios intra e extracelular, e a parede celular, que confere rigidez e resistência às células e funciona como uma barreira protetora. A membrana plasmática dos eucariotos possui, em sua estrutura, esteróis, os quais a tornam rígida e inflexível. A parede celular dos fungos, por outro lado, é composta por glucanas, quitinas e manoproteínas que formam uma complexa trama que proporciona resistência mecânica à célula (ISLAM; ARYASOMAYAJULA; SELVAGANAPATHY, 2017; LIU *et al.*, 2013a)

A obtenção de biopigmentos intracelulares, como é o caso dos carotenoides produzidos por leveduras, ocorre através de duas etapas: o rompimento celular e a extração dos pigmentos. A eficiência desses métodos depende de sua capacidade de preservar a integridade da molécula, portanto a definição da temperatura do processo e do tipo de solventes utilizados é uma etapa fundamental (NIGAM; LUKE, 2016).

Os métodos de rompimento celular podem ser químicos, físicos ou enzimáticos. Métodos físicos são classificados em mecânicos (moinhos de bolas, homogeneizadores ou sistemas de alta pressão), e não mecânicos (choque osmótico, cavitação, aquecimento). Técnicas não mecânicas também abrangem os procedimentos químicos (uso de álcalis e detergentes) e biológicos (lise enzimática) (ISLAM; ARYASOMAYAJULA; SELVAGANAPATHY, 2017). As técnicas de extração, por outro lado, variam em função das características químicas do biopigmento. A Tabela 5 apresenta exemplos de métodos de extração de carotenoides de leveduras encontrados na literatura.

Tabela 5 - Exemplos de técnicas de rompimento celular e extração de carotenoides intracelulares produzidos por leveduras

Microrganismo	Biopigmento	Método de ruptura celular	Solução de extração	Produção obtida	Referência
<i>S. salmonicolor</i>	Carotenoides totais	Congelamento (N ₂ líquido) e maceração com DMSO	Acetona/metanol (7:3, v/v)	913 µg/L	Valduga <i>et al.</i> (2009)
<i>R. glutinis</i>	Carotenoides totais	Moinho de bolas	Acetona	125 mg/L	Aksu; Eren (2007)
<i>R. glutinis</i>	Carotenoides totais	Liofilização	Éter de petróleo DMSO Acetona Hexano	237,7 226,1 192,1 190,9 µg/g de biomassa seca	Park <i>et al.</i> (2007)
<i>P. rhodozyma</i>	Astaxantina	β-glucanases + Ultrasonicação β-glucanases + CO ₂ supercrítico (300 bar) β-glucanases + Homogeneização a alta pressão	- - -	435,71 µg/ g de biomassa seca 103 µg/g de biomassa seca 342 µg/g de biomassa fresca	Hasan <i>et al.</i> (2016)
<i>B. trispora</i>	β-caroteno	Moinho de bolas	Acetato de etila	59,91 mg/g de biomassa seca	Jing <i>et al.</i> (2016)

Fonte: própria autora.

Os métodos mecânicos de rompimento celular, como a agitação com pérolas de vidro e o moinho de bolas, são baseados nas forças de cisalhamento. A colisão entre as pérolas (usualmente de vidro, aço ou cerâmica) e as células microbianas leva ao rompimento da parede celular e da membrana plasmática. Os parâmetros que determinam a eficiência do processo de rompimento celular por esses métodos são: a velocidade de agitação, a concentração celular e o diâmetro das pérolas. Em geral, pérolas com diâmetro entre 0,25 mm e 0,5 mm são mais eficientes do que pérolas de diâmetros maiores (ISLAM; ARYASOMAYAJULA; SELVAGANAPATHY, 2017).

De acordo com Islam, Aryasomayajula e Selvaganapathy (2017), a desintegração celular proporcionada pelo impacto das pérolas leva à formação de partículas diminutas de estruturas celulares, as quais dificultam a purificação da amostra e o isolamento de um produto de interesse. Outro fator adverso do uso da força de cisalhamento neste processo é o aquecimento causado pelo atrito, o qual pode comprometer a estrutura de proteínas, ácidos nucleicos e outras moléculas termolábeis. Uma possível solução para o problema é a imersão da amostra em um banho de gelo em intervalos periódicos, durante a agitação.

Os métodos mecânicos de rompimento celular são os mais frequentemente utilizados, porém os métodos químicos são considerados mais rápidos e eficazes. É comum que metodologias de rompimento sejam conjugadas, como a digestão enzimática e um método químico (HASAN *et al.*, 2016; MICHELON *et al.*, 2012). Deve se levar em consideração, também, que diferentes métodos resultam em diferentes perfis de carotenoides devido às diferenças estruturais e químicas entre as moléculas (MAPARI *et al.*, 2005). A escolha dos métodos se relaciona, igualmente, aos custos de cada tecnologia, portanto é necessário fazer um estudo cauteloso da estratégia de obtenção de um dado biopigmento intracelular (PARK; KIM; CHU, 2007).

A eficiência dos solventes utilizados na extração de biopigmentos depende não apenas de sua polaridade, mas também da localização dos pigmentos na estrutura celular. Carotenoides são estocados em vesículas lipídicas ou entre as camadas da membrana plasmática e podem ser extraídos com solventes orgânicos apolares, porém a polaridade dessas moléculas varia em função da presença de átomos oxigenados e do tamanho da cadeia de polieno.

A utilização de solventes tóxicos e/ou nocivos para a extração de biopigmentos, como metanol, hexano e clorofórmio, pode comprometer o impacto ambiental positivo da substituição de pigmentos sintéticos por essas moléculas. Nesse sentido, alguns estudos avaliam a possibilidade de extração com óleos vegetais (girassol, oliva, palma, soja, coco,

gergelim *etc.*) ou então a utilização de técnicas que não exijam solventes, como a extração supercrítica (ROUTRAY *et al.*, 2019).

A extração supercrítica é uma das abordagens mais recentes nessa área de pesquisa e permite a extração simultânea de carotenoides e lipídeos. Como vantagens, essa técnica não necessita de solventes e não gera resíduos, porém a preparação da amostra envolve uma etapa de secagem ou liofilização, aumentando o custo e o tempo do processo. Alguns estudos apontaram para a necessidade do uso de etanol como cossolvente na extração de carotenoides com essa técnica, porém, ainda assim, considera-se que as vantagens compensem as desvantagens da extração supercrítica e se espera uma ampliação do uso dessa técnica nos próximos anos (ROUTRAY *et al.*, 2019).

2.1.2.2.4 *Perspectivas do mercado de carotenoides*

Os principais consumidores de pigmentos são os países industrializados (Estados Unidos, União Europeia e Japão), porém a demanda dos países emergentes (Malásia, Índia e China) é crescente. A utilização de astaxantia e cantaxantina na aquicultura tem contribuído para o aumento da demanda nos países em desenvolvimento (BERMAN *et al.*, 2015).

Em relação à produção global, Estados Unidos e União Europeia se destacam como os principais produtores, apesar de que esse cenário pode mudar nos próximos anos, uma vez que Austrália, Índia e Japão têm mostrado um aumento gradual de sua produção. A descentralização da produção de biopigmentos é desfavorecida pelo fato de que existem poucas indústrias com domínio dos processos (MUSSAGY *et al.*, 2019).

De acordo com Saini e Keum (2019), o mercado atual de produtos baseados em carotenoides é direcionado a suplementos alimentares, produtos para a saúde da pele e dos olhos, coloração de alimentos, aquicultura e avicultura. Os benefícios do emprego de carotenoides na aquicultura envolvem o realce da cor de peixes como salmão e truta e o melhoramento de aspectos fisiológicos dos animais, como o desenvolvimento embrionário e larval e resposta imune. A aquicultura é o setor que gera a maior receita advinda do uso da astaxantina e de outros carotenoides.

De uma maneira geral, tem sido observada a preferência dos consumidores em adquirir produtos com menos insumos de origem sintética ou então que sejam de origem natural e/ou apresentem soluções do ponto de vista ambiental (redução da embalagem, embalagem retornável ou reciclável *etc.*). Nessa conjuntura, foi projetado que o mercado de carotenoides atingirá 1,53 bilhões de dólares em 2021 e 2 bilhões de dólares em 2022

(McWILLIAMS, 2018). De acordo com as projeções, a taxa de crescimento anual composta do mercado de carotenoides é de, aproximadamente, 5,7%. Os carotenoides com maior demanda mercadológica são o β -caroteno, a luteína e a astaxantina (AMBATI *et al.*, 2019).

As xantofilas são o grupo de carotenoides mais valorizados, dada sua maior atividade antioxidante em relação aos carotenos. As xantofilas mais comercializadas são a astaxantina, luteína, zeaxantina e cantaxantina, utilizadas principalmente na aquicultura, na composição de fármacos e cosméticos e na indústria alimentícia (cereais, bebidas e laticínios) (DEMAIN; MARTENS, 2017).

Um dos biopigmentos mais valorizados é a astaxantina, com um preço de US\$ 2500/kg para sua versão sintética e de US\$ 7000/kg para a natural. O mercado desse carotenoide para a alimentação animal era de US\$ 300 milhões em 2009 e é esperado que chegue a 800 milhões em 2020. A astaxantina para fins nutracêuticos movimentava 30 milhões de dólares em 2009 e a expectativa é que atinja US\$ 300 milhões em 2020.

A produção em larga escala de carotenoides naturais é centralizada em poucas indústrias, sediadas, principalmente, nos Estados Unidos, Índia, Canadá, Japão, Austrália e Alemanha. Carotenoides são utilizados, principalmente, em produtos para a saúde da pele e dos olhos, em suplementos alimentares, na avicultura e aquicultura e como corantes de alimentos (MUSSAGY *et al.*, 2019; SAINI; KEUM, 2019).

A disparidade de preço entre carotenoides naturais e sintéticos ainda é muito grande e esse fator torna inviável, muitas vezes, a utilização dos biopigmentos na indústria. O β -caroteno sintético, por exemplo, custa metade de seu equivalente natural (RAO; XIAO; LI, 2017). Em estudos de simulação, entretanto, observa-se que a produção de astaxantina natural pode ter custos competitivos aos da astaxantina sintética (SAINI; KEUM, 2019).

Li *et al.* (2011), ao desenvolver uma planta piloto para a obtenção de astaxantina por *H. pluvialis*, concluíram que o custo de produção de biomassa microbiana e de astaxantina seria de, aproximadamente, US\$ 18/kg e US\$ 718/kg, respectivamente. Considerando-se que o preço médio de produção da astaxantina sintética é de cerca de US\$ 1000/kg, a viabilidade econômica de produção de carotenoides naturais é um caminho possível (SAINI; KEUM, 2019).

Rao, Xao e Li (2017) conjecturaram que o futuro do mercado de biopigmentos será caracterizado pelo predomínio dos pigmentos microbianos. Atualmente, a indústria têxtil é a principal consumidora de biopigmentos, porém a expectativa é de que estes conquistem os setores industriais de tintas, agentes de revestimento e impressão. A expansão das aplicações

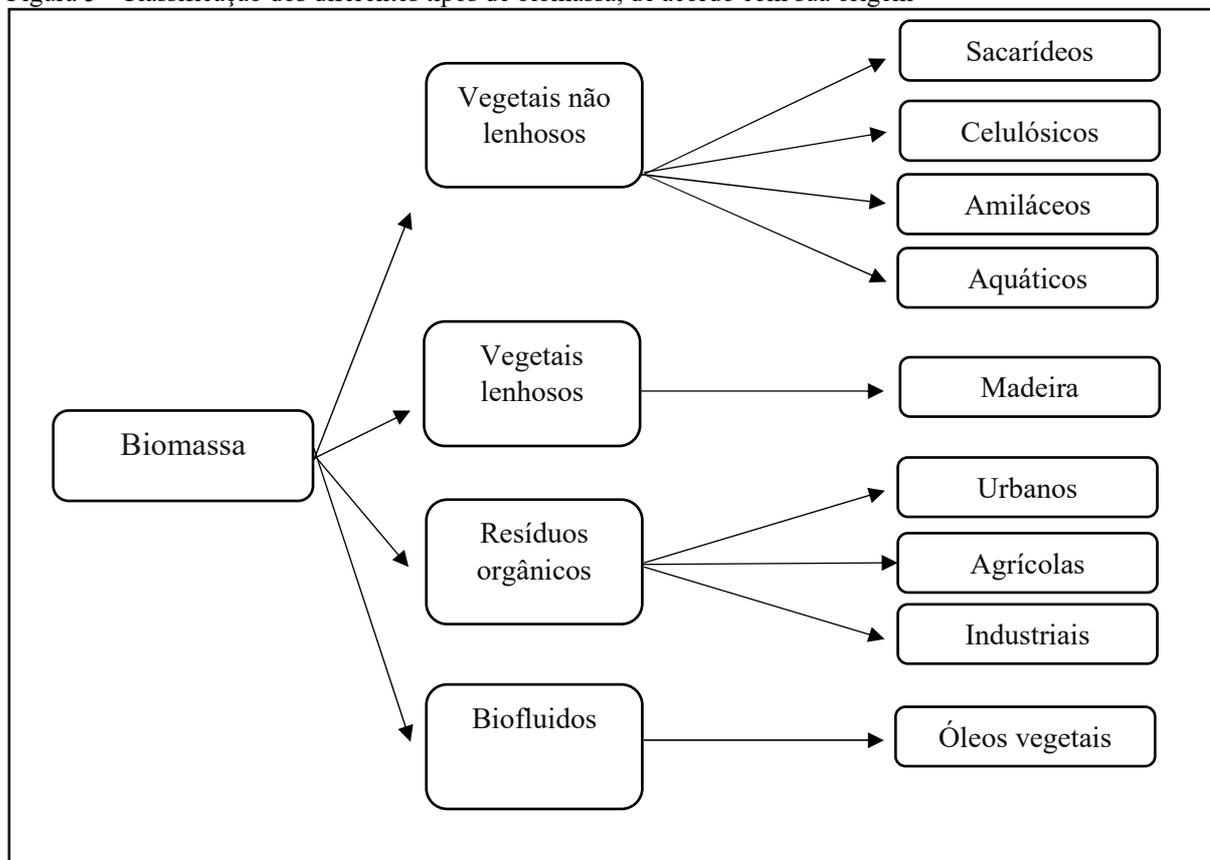
de biopigmentos ainda é deficiente por falta de regulamentação, sobretudo em relação à indústria alimentícia (MUSSAGY *et al.*, 2019).

A diversificação das aplicações dos carotenoides contribuirá para aumentar a demanda por esses biopigmentos, assim como uma maior demanda pode acarretar em mais investimentos na produção em larga escala dessas substâncias. Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que elucidem os mecanismos de controle das vias metabólicas envolvidas na carotenogênese, a compreensão do papel de cada variável e a modelagem da ampliação de escala desses bioprocessos em conjunto com análises de custo.

2.2 A BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

Os materiais denominados biomassas são constituídos de substâncias orgânicas de diferentes origens, destacando-se componentes vegetais e resíduos líquidos. As categorias nas quais as biomassas são usualmente classificadas estão apresentadas na Figura 5.

Figura 5 - Classificação dos diferentes tipos de biomassa, de acordo com sua origem



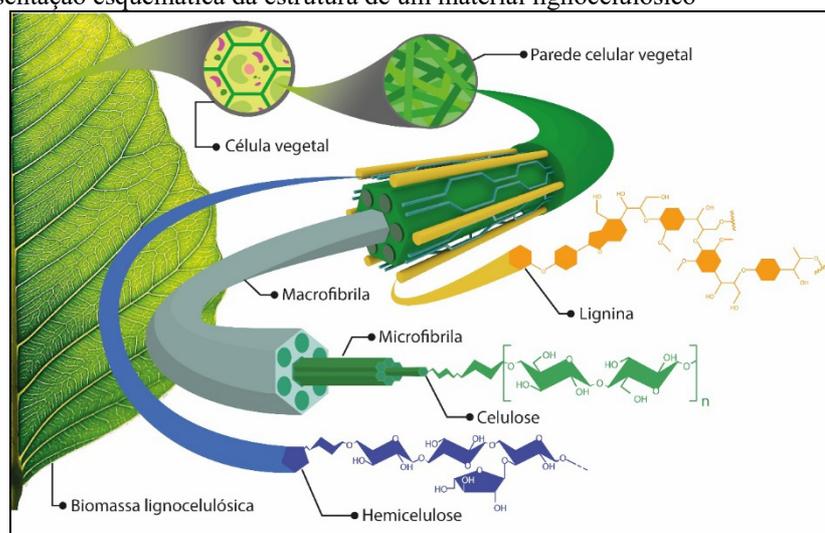
Fonte: própria autora.

A biomassa vegetal é considerada o substrato mais abundante na Terra, sendo constituída, principalmente, de lignina (macromolécula com estruturas fenólicas) e dos polissacarídeos celulose, hemicelulose e pectina, além de algumas proteínas e baixas concentrações de fósforo (JOSHI *et al.*, 2011). Uma quantidade considerável de biomassa vegetal é descartada pelas atividades agroindustriais, o que representa um problema de gerenciamento de resíduos para esse setor, porém a biotecnologia tornou possível a utilização dos componentes desses materiais para a obtenção de uma variedade de bioprodutos de interesse industrial e/ou de alto valor agregado.

De maneira geral, a composição média de um subproduto agrícola é de 40% a 50% de celulose, 25% a 35% de hemicelulose e 20% a 35% de lignina (MILLER, 1999). A predominância das principais macromoléculas em uma biomassa vegetal se relaciona à natureza da planta da qual esta se originou (vegetal lenhoso ou não lenhoso). Materiais provenientes de vegetais lenhosos (caules, ramos, serragem, cascas de árvores, folhagens, pellets) apresentam teor de lignina superior ao dos vegetais não lenhosos (gramíneas, sementes, flores, bagaços, frutas, talos, espigas) (TURSI, 2019).

Uma vez que essas moléculas não ocorrem isoladamente, mas, sim, intimamente ligadas, é comum o uso dos termos “resíduos lignocelulósicos” ou “lignoproteicos” (MOORE; ROBSON; TRINCI, 2011). A estrutura da matriz que compõe a biomassa vegetal está apresentada na Figura 6.

Figura 6 - Representação esquemática da estrutura de um material lignocelulósico



Fonte: adaptado de Zhang *et al.* (2016b) e de Magalhães Júnior *et al.* (2019).

Apesar da abundância de materiais lignocelulósicos na biosfera, uma fração pequena deles tem importância econômica: a grande maioria não é aproveitada pelos principais setores

que fazem uso de materiais vegetais (agricultura, indústrias têxtil e de papel e celulose) e ainda é considerada, muitas vezes, como resíduo. De acordo com Mata-Gómez *et al.* (2014), o custo de tratamento e disposição de subprodutos agroindustriais é elevado e seu descarte inapropriado no ambiente se relaciona à ocorrência de problemas ambientais. Nos últimos anos, no entanto, a crescente população humana e a depleção de recursos naturais têm modificado esse panorama: há uma busca crescente por aplicações industriais e biotecnológicas da biomassa vegetal como uma tentativa de aproveitar esse material de alto potencial energético como fonte de nutrientes para microrganismos que produzem substâncias de alto valor agregado (JURADO *et al.*, 2011; MATA-GÓMEZ *et al.*, 2014).

2.2.1 Bagaço de cana-de-açúcar

A indústria sucroalcooleira é uma das principais fontes de subprodutos agroindustriais. A produção global de cana-de-açúcar, em 2018, foi de 1.907.024.730 toneladas e ocupou mais de 25 milhões de hectares do planeta (FOOD AND AGRICULTURE OF THE UNITED NATIONS, 2018). O Brasil, que se apresenta como o maior produtor desse cultivo agrícola, deverá atingir uma produção de 615,98 milhões de toneladas na safra 2019/2020, o que corresponde à obtenção de, aproximadamente, 31,8 milhões de toneladas de açúcar e de 30,3 bilhões de litros de etanol (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2019).

Os principais resíduos derivados do processamento da cana-de-açúcar são o melaço, a torta de filtro e o bagaço (SARKER; AZAM; BONANOMI, 2017). O bagaço de cana-de-açúcar é um subproduto da moagem da cana com uma produção média de 270-280 kg por tonelada métrica de cana-de-açúcar, considerando-se um teor de umidade de 50% (KARP *et al.*, 2013). Uma parcela considerável desse material (cerca de 75%) é queimada para a geração de energia nas usinas (ANTUNES, 2015). A possibilidade de destinar o bagaço de cana-de-açúcar para fins mais nobres não apenas diminuiria a dependência global de combustíveis fósseis, mas também seria uma forma de reduzir a poluição ambiental, gerar empregos e estimular a economia, bem como obter produtos de alto valor agregado (SARKER; AZAM; BONANOMI, 2017).

De acordo com Chandel *et al.* (2012), o bagaço de cana-de-açúcar é um material rico em carboidratos (35% a 45% de celulose e 26,2% a 35,8% de hemicelulose, em base seca) e lignina (11,4% a 25,2%), apresentando porcentagens menores de outros constituintes (2,9% a 14,4%). Os autores ressaltaram que sua composição se relaciona com inúmeros fatores, como a variedade de cana-de-açúcar, tipo de cultivo, características edáficas e climáticas da região,

insumos agrícolas utilizados no cultivo, entre outros. Exemplos da composição do bagaço de cana-de-açúcar produzido no Brasil estão relatados na Tabela 6.

Tabela 6 - Exemplos da composição do bagaço de cana-de-açúcar obtido no Brasil

Componente	Philippini <i>et al.</i> (2019)	Rocha <i>et al.</i> (2012)	Santucci <i>et al.</i> (2016)
Celulose	40,84	43,1	44,1
Hemicelulose	34,07	25,2	31,8
Lignina total	33,71	22,9	22,3
Cinzas	0,68	2,8	0,5
Extrativos	10,24	4,3	-

Fonte: própria autora.

Buscando-se o desenvolvimento de processos sustentáveis para a obtenção de bioprodutos, diversos estudos são baseados em processos de fermentação em fase sólida com bagaço de cana-de-açúcar. Exemplos de produtos obtidos pela utilização desse material como suporte sólido para o crescimento microbiano são: biogás (SARKER; AZAM; BONANOMI, 2017), biomassa de *Spirulina* (PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007) e várias enzimas, como a asparaginase (MUSO-CACHUMBA *et al.*, 2017), xilanases, celulases e lipases (SARKER; AZAM; BONANOMI, 2017).

Outra forma de aproveitamento o material em processos biotecnológicos é a partir de seu pré-tratamento seguido de hidrólise enzimática e posterior utilização dos açúcares fermentescíveis que foram liberados (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008). A utilização desses procedimentos se faz necessária dada a natureza recalcitrante da biomassa lignocelulósica: a complexidade das interações intermoleculares existentes na matriz lignocelulósica dificulta a despolimerização da celulose e da hemicelulose em seus respectivos monômeros (ANTUNES, 2015).

Há uma diversidade de métodos de pré-tratamento e a escolha destes deve se dar em função do custo de sua execução, da disponibilidade dos equipamentos necessários e da fração da biomassa com a qual se deseja trabalhar (fração celulósica ou hemicelulósica) (ANTUNES, 2015). Opções de pré-tratamentos envolvendo a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar são: hidrólise ácida, tratamento alcalino, explosão a vapor e o tratamento com organossolventes.

O hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar é um dos substratos de baixo custo cuja composição permite sua utilização como fonte de nutrientes para a produção microbiana de carotenoides (FONTANA *et al.*, 1996; ZHUANG; JIANG; ZHU, 2020). O estudo de Goswami, Chaudhuri e Dutta (2015), por exemplo, demonstrou a viabilidade da produção de carotenoides pela bactéria *Dietzia maris* utilizando o hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono.

Este material pode ser empregado satisfatoriamente para a produção de carotenoides por leveduras, uma vez que alguns organismos notadamente produtores de biopigmentos (como *R. glutinis*) metabolizam uma ampla variedade de fontes de carbono e toleram condições de estresse ambiental (KOT *et al.*, 2016). Essas informações fornecem um embasamento para a condução de estudos de produção de biopigmentos pela levedura *P. kudriavzevii* em hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar.

2.2.2 Farelo de arroz

As biomassas amiláceas são aquelas que apresentam em sua composição altos teores de amido, o qual, por sua vez, é constituído de amilose e amilopectina. As sementes são particularmente ricas em amido, que tem a função de carboidrato de reserva e é armazenado no endosperma, permitindo a manutenção e viabilidade do embrião antes da germinação. Além do endosperma, as sementes são compostas do germe (embrião) e do farelo, que envolve o embrião e o endosperma e fornece resistência mecânica ao grão e proteção contra fatores externos (DENARDIN; SILVA, 2009; EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2006).

O beneficiamento de grãos (cevada, centeio, milho, soja, trigo e arroz) envolve, muitas vezes, a remoção do farelo, um material que apresenta uma diversidade de nutrientes, vitaminas, compostos fenólicos antioxidantes, fibras alimentares, magnésio, manganês, ferro, zinco, potássio e cobre (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2009).

O farelo de arroz é um subproduto proveniente do processamento do arroz integral em arroz polido e uma das biomassas lignocelulósicas mais abundantes no planeta (MILESSI *et al.*, 2013; SEN *et al.*, 2016). A produção de arroz polido gera os seguintes subprodutos: casca (19% a 23%), farelo (8% a 10%) e impurezas (3% a 5%) (SANTOS *et al.*, 2010). No cenário

brasileiro, há um potencial de produzir, aproximadamente, 1 milhão de toneladas do material por ano (PHILIPPINI, 2017).

Além de seu destino à alimentação animal, o farelo de arroz é usualmente utilizado como fertilizante agrícola e como fonte de óleos (LACERDA *et al.*, 2010). Apesar de existirem diversas formas de incorporar o material na indústria, ainda é comum em países asiáticos a prática da queima do farelo de arroz em campos abertos (SEN *et al.*, 2016).

O farelo de arroz é um material em cuja composição há uma porcentagem expressiva de proteínas (entre 10% e 15 %), alto conteúdo de celulose e hemicelulose e, em proporções menores, lipídeos, fibras e ácido fítico (SEN *et al.*, 2016; TSIGIE *et al.*, 2012). De acordo com Wang *et al.* (1999), as proteínas encontradas no material são: albumina (37%), globulina (36%), gluteína (22%) e prolamina (5%). Destaca-se, também, a variedade de aminoácidos essenciais e não essenciais presentes, como lisina, leucina, fenilalanina, tirosina, valina, ácido glutâmico, arginina e ácido aspártico (HAN; CHEE; CHO, 2014; PARRADO *et al.*, 2006; POURALI; ASGHARI; YOSHIDA, 2009).

O alto teor proteico deste farelo faz com que ele possa substituir fontes de nitrogênio de alto custo, como peptona e extrato de levedura (MILESSI *et al.*, 2013). Uma estratégia para a liberação das proteínas do farelo de arroz é o preparo de um extrato a partir da auto-hidrólise do material (MARTINIANO *et al.*, 2014).

Em processos biotecnológicos, o farelo de arroz tem sido utilizado tanto como substrato para a fermentação em estado sólido como em sua forma hidrolisada. Seu uso é direcionado para a suplementação de nitrogênio orgânico em meios de cultivo e, em relação à produção de bioetanol, a substituição de peptona e extrato de levedura por esse insumo pode representar uma redução de custos de 50% (MARTINIANO *et al.*, 2014; MILESSI *et al.*, 2013).

De acordo com a literatura, o uso do farelo de arroz como fonte de nitrogênio resultou em bioprocessos eficientes de produção de lipídeos (TSIGIE *et al.*, 2012) e hidrogênio (SEN *et al.*, 2016), etanol (MILESSI *et al.*, 2013). Hsu *et al.* (2010) ressaltam que uma das características do farelo de arroz que facilita seu uso em bioprocessos é seu baixo teor de lignina quando comparado a outras biomassas lignocelulósicas.

O farelo de arroz tem sido explorado pelo grupo de pesquisa pelo LBIOS há algumas décadas. O material foi utilizado como suplementação ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de xilitol (SILVA, 1989), etanol (MARTINIANO *et al.*, 2014; MILESSI *et al.*, 2013) e xilitol e etanol (DA SILVA *et al.*, 2014).

A utilização de hidrolisados de subprodutos do beneficiamento do arroz também faz parte das pesquisas desenvolvidas pelo grupo. O hidrolisado de palha de arroz foi avaliado para a produção de xilitol (MAYERHOFF; ROBERTO; SILVA, 1998), enquanto que o hidrolisado de farelo de arroz foi utilizado para a produção do biopolímero lasidioploidana (PHILIPPINI *et al.*, 2016).

2.2.3 Biomassa lignocelulósica – pré-tratamentos e sacarificação

Em geral, o termo pré-tratamento, quando utilizado no contexto do aproveitamento de materiais lignocelulósicos, refere-se a etapas que antecedem a digestão enzimática e têm o propósito de facilitar a digestibilidade da fração celulósica. Existem inúmeras estratégias de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica direcionadas à hidrólise preferencial de cada um de seus componentes: celulose, hemicelulose ou lignina.

A estrutura lignocelulósica pode ser pré-tratada por métodos físicos (explosão a vapor, fluidos supercríticos, moagem, pirólise, micro-ondas, cavitação hidrodinâmica e cavitação acústica), químicos (hidrólise ácida, tratamento alcalino, organossolventes) ou biológicos (deslignificação oxidativa, tratamento com microrganismos ligninolíticos), os quais são aplicados isoladamente ou em conjunto (KARP *et al.*, 2013; MADISON *et al.*, 2017; PHILIPPINI *et al.*, 2020).

A definição da sequência de técnicas para a desestruturação da matriz lignocelulósica ocorrerá em função da(s) fração(ões) que se deseja aproveitar. Soluções alcalinas saponificam as ligações éster que ligam a xilana da hemicelulose aos demais componentes. A partir dessa saponificação, a lignina se desprende dos carboidratos e a solução alcalina promove sua quebra em porções menores; o grau de polimerização e a cristalinidade da matriz hemicelulósica também são reduzidos (SUN; CHENG, 2002).

A utilização de soluções ácidas, por outro lado, permite a dissolução dos açúcares que constituem a hemicelulose (xilose, arabinose e manose), bem como uma pequena quantidade de glicose. Quando este procedimento é realizado após a remoção da lignina, a digestão enzimática da celulose, que permanece na fração sólida, é facilitada (ANTUNES, 2015; KUMAR *et al.*, 2009).

A lignina é uma macromolécula polifenólica amorfa que se liga covalentemente à hemicelulose e interage com a celulose por meio de ligações de hidrogênio (CHANDEL *et al.*, 2012). A remoção da lignina é, muitas vezes, necessária para o sucesso da hidrólise

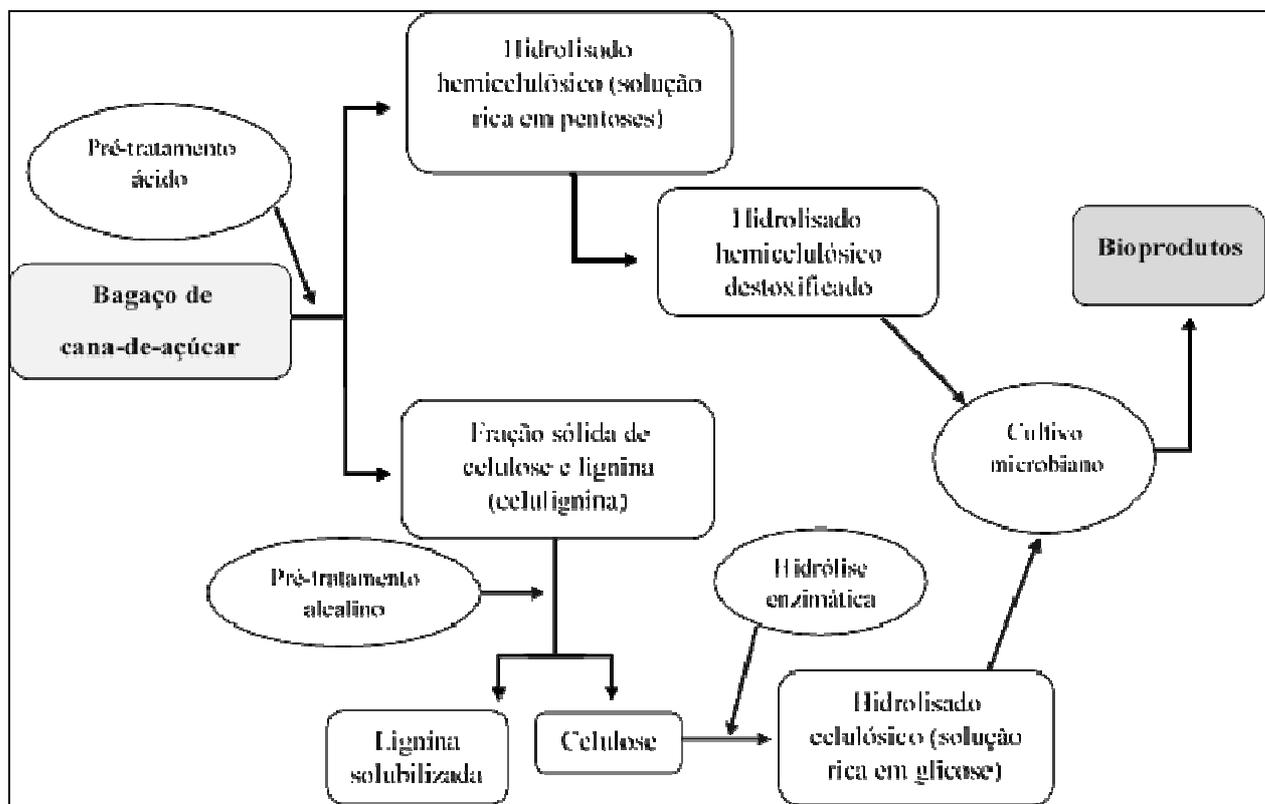
enzimática e o procedimento pode ser realizado com tratamentos alcalinos ou com a adição de solventes (ácido fórmico, butanol ou etanol) (ANTUNES *et al.*, 2019; SAHA, 2003).

A hemicelulose, por outro lado, é um heteropolímero ramificado composto por hexoses, pentoses e resíduos de ácido urônico. O baixo grau de polimerização do material, quando comparado ao da celulose, e sua estrutura amorfa fazem com que esse polissacarídeo seja facilmente hidrolisado com pré-tratamentos ácidos (ANTUNES *et al.* 2017). Ao realizar uma hidrólise ácida branda em temperaturas elevadas, seus principais açúcares (xilose, arabinose e outros) são solubilizados e podem ser aproveitados em processos fermentativos. Esse processo hidrolítico, no entanto, produz uma série de inibidores (ácidos, furfural e 5-hidroxiacetilfurfural) a partir da degradação dos açúcares, o que implica na necessidade de realizar uma etapa de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico antes de seu uso em processos microbianos (ANTUNES *et al.*, 2019; SAHA, 2003).

A celulose é um homopolímero de unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4 que se estruturam em regiões amorfas e cristalinas. Seu aproveitamento em processos biotecnológicos é, geralmente, precedido de sua hidrólise em monômeros ou dímeros de glicose, a qual é realizada por processos enzimáticos. Dada a complexidade estrutural desse polímero, faz-se necessária a utilização de um complexo de enzimas para a hidrólise: enzimas endo β -1,4-glucanases, atuantes nas regiões amorfas da celulose, são responsáveis por criar cadeias de extremidades livres; as exoglucanases e celobiohidrolases clivam as cadeias com extremidades livres em dímeros de celobiose; por fim, a β -glucosidase hidrolisa a celobiose em monômeros de glicose (KARP *et al.*, 2013).

A eficiência da hidrólise enzimática é decorrente da carga de sólidos utilizada na reação, da atividade enzimática e do efeito dos pré-tratamentos sobre a matriz lignocelulósica de forma a viabilizar o acesso das enzimas à celulose, assim, o rendimento do processo é bastante variável. Alguns autores relatam a recuperação de mais de 90% da glicose presente no bagaço de cana-de-açúcar por meio de pré-tratamentos seguidos de hidrólise enzimática (PHAN; TAN, 2014; TERÁN HILARES *et al.*, 2017). A Figura 7 apresenta, esquematicamente, as diferentes etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática para a obtenção dos monômeros de açúcares presentes na biomassa lignocelulósica.

Figura 7 – Sequência de pré-tratamentos e hidrólise enzimática para a liberação dos monômeros presentes nos carboidratos bagaço de cana-de-açúcar para sua utilização em bioprocessos



Fonte: adaptado de Antunes (2015) e Santos, Borschiver e Couto, 2011.

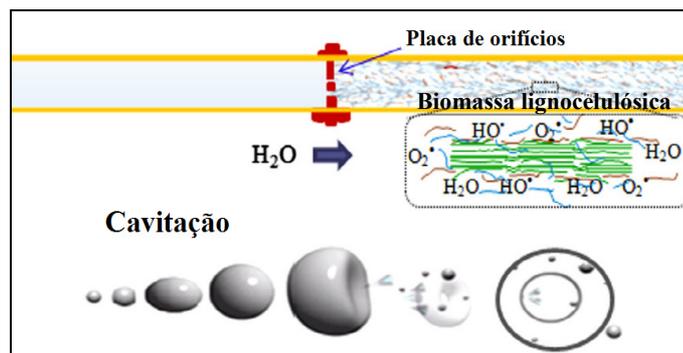
Considera-se que o tratamento ideal da biomassa lignocelulósica é aquele que apresenta alta eficiência, baixo custo e reduzida geração de subprodutos indesejados e de resíduos. Em busca do melhor equilíbrio entre essas três vertentes, diversas técnicas de pré-tratamento e combinações delas têm sido desenvolvidas como forma de assegurar a sustentabilidade dos bioprodutos obtidos a partir dos subprodutos agroindustriais e de promover a redução de custos, tornando-os mais competitivos do ponto de vista econômico (ANTUNES *et al.*, 2019).

2.2.3.1 Cavitação hidrodinâmica

O processo de cavitação hidrodinâmica (CH) consiste na geração, crescimento e subsequente colapso de microbolhas produzidas quando a pressão de um fluido é reduzida a um valor inferior à sua pressão de vapor e, em seguida, este retorna à pressão original. As alterações de pressão do fluido podem ser proporcionadas por uma placa de orifícios ou por um tubo de Venturi. As bolhas formadas durante o processo armazenam grande quantidade de

energia (seu interior atinge mais de 9500°C e 1000 atm) e rapidamente colapsam em regiões denominadas *hot spots*, liberando a energia nelas contidas e provocando a dissociação das moléculas de água em radicais livres ($\text{OH}\cdot$, $\text{H}\cdot$, HOO e $\text{O}_2\cdot$) (GOGATE; PANDIT, 2001). O fenômeno da cavitação hidrodinâmica está representado esquematicamente na Figura 8.

Figura 8 - Representação esquemática do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica por cavitação hidrodinâmica



Fonte: adaptado de Terán-Hilares *et al.* (2016).

A cavitação hidrodinâmica tem sido utilizada como uma forma de aumentar a velocidade de reações químicas em inúmeros processos e recentemente tem sido empregada com sucesso no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. A técnica apresenta dois efeitos principais sobre os materiais lignocelulósicos: um aumento da porosidade e uma elevada remoção da lignina, ambos contribuindo para maior eficiência da hidrólise enzimática (TERÁN HILARES *et al.*, 2020).

A energia liberada por microjatos a alta velocidade e ondas de choque provocadas pelo colapso das bolhas aumenta o volume dos microporos da biomassa e da área de superfície específica. O aumento da porosidade do material lignocelulósico faz com que a solução enzimática tenha acesso facilitado aos açúcares da celulose e da hemicelulose, favorecendo sua hidrólise (TERÁN HILARES *et al.*, 2020).

Ademais, os radicais livres gerados pelo efeito da cavitação sobre o fluido utilizado no processo provocam a oxidação e a degradação da lignina. Essa propriedade também contribui para facilitar o acesso do complexo enzimático à fração de glucana (ANTUNES *et al.*, 2019).

Comparada a métodos tradicionais de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, a cavitação hidrodinâmica é considerada uma técnica mais econômica no sentido energético, de utilização de catalizadores químicos e também, comparativamente, exige menos tempo (GOGATE; PANDIT, 2001). Outro fator a ser levado em consideração é que a técnica

depende de uma aparelhagem simples e pode ser executada em sistemas contínuos, o que é uma vantagem na utilização em larga escala (ANTUNES *et al.*, 2019).

No contexto do grupo de pesquisa no qual este trabalho foi desenvolvido, a técnica de cavitação hidrodinâmica começou a ser utilizada como técnica acessória ao pré-tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar (TERÁN HILARES *et al.*, 2016). Terán-Hilares *et al.* (2017) avaliaram a CH como uma estratégia para aumentar a eficiência do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica e, posteriormente, trabalhos do grupo investigaram a mudança da condução desse processo de uma operação em batelada para sistemas contínuos e semi-contínuos (TERÁN HILARES *et al.*, 2019).

As investigações mais recentes do grupo envolvendo a cavitação hidrodinâmica envolvem o processamento de alimentos (ARYA *et al.*, 2019). Terán e colaboradores (2019) avaliaram as propriedades físicas, a qualidade microbiológica e a estabilidade dos compostos bioativos do suco de tomate tratado por CH e observaram resultados melhores em todos os parâmetros analisados, em comparação com o suco de tomate controle.

Entre os estudos de aprimoramento da utilização da cavitação hidrodinâmica como técnica acessória ao pré-tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar, alguns foram direcionados ao emprego do hidrolisado obtido na produção de bioetanol (TERÁN HILARES *et al.*, 2017, 2018, 2020). Ressalta-se que o presente trabalho é pioneiro no grupo de pesquisa e na literatura publicada que utiliza o pré-tratamento alcalino assistido por cavitação hidrodinâmica para a elaboração de um hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar e seu emprego em um bioprocessamento de produção de biopigmentos.

A versatilidade da CH, em conjunto com a reduzida utilização de insumos proporcionada pela técnica fazem com que seu emprego no presente trabalho se apresente como uma vantagem no sentido de uma futura aplicação de escala dos bioprocessos avaliados nessa pesquisa. O processo de CH também se destaca por ser facilmente escalável (TERÁN HILARES *et al.*, 2016).

2.2.4 Cenário atual do uso de materiais lignocelulósicos na produção de biopigmentos

Segundo Venil, Zakaria e Ahmad (2013), um dos obstáculos para a produção biotecnológica de pigmentos ser economicamente competitiva é o alto custo dos insumos utilizados em sua produção. Dessa maneira, o uso de subprodutos agrícolas para o desenvolvimento de bioprocessos de produção de biopigmentos representa uma alternativa promissora para a redução dos custos do processo. Mata-Gómez *et al.* (2014) relatam que a

utilização de subprodutos agroindustriais na produção de biopigmentos depende das fontes de carbono e de nitrogênio, minerais e outras substâncias neles disponíveis.

Além das vantagens previamente apresentadas de utilizar a biomassa vegetal em processos biotecnológicos, Schneider *et al.* (2013) destacaram o papel dos efluentes das indústrias de alimentos e bebidas. Esses efluentes apresentam altos valores de DQO e de DBO (demanda química de oxigênio e demanda bioquímica de oxigênio, respectivamente), podendo causar poluição ambiental, se lançados diretamente no ambiente. A utilização deles como fonte de nutrientes para processos bioquímicos que empregam microrganismos é uma forma de obter produtos de alto valor agregado a partir de substratos de baixo custo e também realizar o tratamento desses materiais, reduzindo suas cargas orgânicas.

Há um grande número de trabalhos na literatura que avaliaram o uso de subprodutos agroindustriais como fonte de nutrientes para a obtenção de biopigmentos por fungos e leveduras, sendo a maioria voltada para a utilização de biomassas vegetais, como farelos, bagaços e sabugo. Alguns exemplos de obtenção de biopigmentos em meios de cultivo com subprodutos agroindustriais estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Exemplos de subprodutos agroindustriais utilizados na produção microbiana de biopigmentos

Biopigmento	Subprodutos agroindustriais	Microrganismo	Fonte
Carotenoides	Xarope de polpa de alfarroba e melão de cana-de-açúcar	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Freitas <i>et al.</i> (2014)
Astaxantina	Resíduos de trigo	<i>Yamadazyma guilliermondii</i> , <i>Y. lipolytica</i> , <i>X.dendrorhou</i> e <i>S. salmonicolor</i>	Dursun; Dalgıç (2016)
Carotenoides	Polpa e casca de café	<i>R. mucilaginosa</i> CCMA	Moreira <i>et al.</i> (2018)
Mistura de policetídeos	Bagaço de cana-de-açúcar	<i>Monascus ruber</i>	Terán Hilaes <i>et al.</i> (2018)
Carotenoides	Efluente de cervejaria	<i>R. glutinis</i>	Schneider <i>et al.</i> (2013)
Mistura de policetídeos	Bagaço de malte	<i>Monascus ruber</i>	Hamano e Kilikian (2006)
Riboflavina	Milhocina	<i>Ashbya gossypii</i>	Lim, Choi e Park (2001)

Fonte: própria autora.

Em relação aos subprodutos da indústria sucroalcooleira, a literatura reporta estudos que avaliam a produção de biopigmentos utilizando como substrato o melaço e o bagaço de cana-de-açúcar e seus hidrolisados. Freitas *et al.* (2014), por exemplo, verificaram que a utilização de melaço de cana como fonte de carbono para *Rhodospiridium toruloides* permitiu tanto a produção de biomassa quanto de carotenoides, porém, quando utilizado em altas concentrações, apresentou efeito inibitório sobre o crescimento celular.

O melaço de cana-de-açúcar tem sido frequentemente utilizado como substrato para a produção microbiana de biopigmentos e alguns trabalhos utilizam o substrato em combinação com outros subprodutos. Cipolatti *et al.* (2019), por sua vez, obtiveram uma produção de 830 µg/L de carotenoides totais ao cultivar *S. pararoseus* em meio contendo melaço de cana-de-açúcar e milhocina. Com os mesmos substratos, Rodrigues *et al.* (2019) verificaram a produção de 3726 µg/L de carotenoides totais por *R. mucilaginoso*.

Apesar do melaço de cana-de-açúcar se apresentar como um material rico em açúcares e economicamente mais vantajoso do que fontes de carbono sintéticas, sua utilização em bioprocessos requer atenção. Freitas *et al.* (2014) avaliaram, comparativamente, a influência do melaço de cana e do xarope de polpa de alfarroba na produção de carotenoides por *Rhodospiridium toruloides* e sugeriram a presença de substâncias tóxicas nesse composto, uma vez que a viabilidade celular foi afetada. De acordo com os autores, o efeito inibitório do melaço de cana sobre o crescimento de bactérias foi previamente relatado e atribuído à presença de fenóis.

Buzzini e Martini (1999) verificaram a produção de carotenoides pela levedura *R. glutinis* em diferentes subprodutos agrícolas: xarope de glicose, mosto de uva (concentrado ou não), melaço de beterraba e extrato das farinhas de milho e de soja. Os autores observaram que todos os subprodutos avaliados foram substratos viáveis para a carotenogênese e a utilização das diferentes fontes de carbono resultou em alterações nos tipos de carotenoides produzidos: enquanto o mosto de uva favoreceu a produção de β-caroteno, o cultivo em xarope de glicose não permitiu a síntese do composto e favoreceu a produção de torularodina.

O glicerol cru é um dos subprodutos agroindustriais mais utilizados em estudos de produção microbiana de biopigmentos. O material foi utilizado como única fonte de carbono no estudo conduzido por Cardoso *et al.* (2016) e foi observado aumento na produção de carotenoides totais em 27% e incremento de 1,5 vezes na produtividade em comparação com o uso de glicerol puro.

Os subprodutos provenientes do processamento do café (casca e polpa) também foram avaliados como fonte de nutrientes para a produção de carotenoides por leveduras e bactérias. Em seu estudo, Dias (2016) concluiu que esses materiais fornecem os nutrientes necessários para a carotenogênese e, para alguns dos microrganismos estudados, a produção dos pigmentos foi possível sem a adição de nenhum outro nutriente. O efluente de processamento da mandioca também permitiu a produção de carotenoides por *R. glutinis* sem a necessidade de adição de nenhum outro nutriente.

O campo biotecnológico de produção de biopigmentos por fungos e leveduras utiliza, frequentemente, a combinação de diferentes produtos agroindustriais para a elaboração dos meios de cultivo. Alguns exemplos são palha de arroz e glicerol cru (YEN; CHANG; CHANG, 2015), xarope de milho e água de arroz parabolizado (COLET; DI LUCCIO; VALDUGA, 2015), xarope de milho, melaço de cana-de-açúcar e glicerol cru (RODRIGUES *et al.*, 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do uso de subprodutos agroindustriais como fonte de carbono ou de nitrogênio para a produção de biopigmentos pela levedura *Pichia kudriavzevii* e caracterização desses bioprodutos.

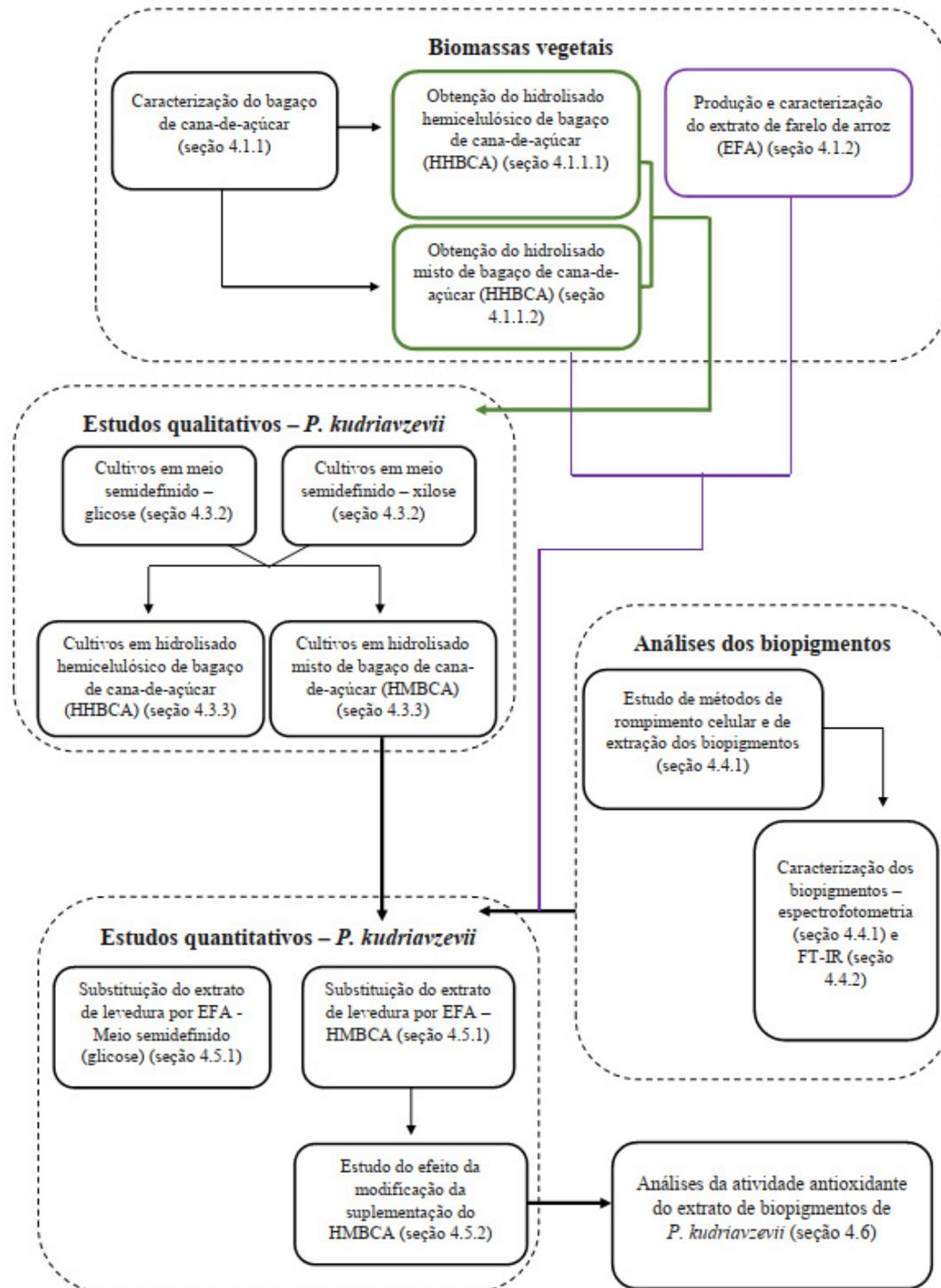
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir uma metodologia de extração dos biopigmentos intracelulares produzidos pela levedura em questão;
- Identificar a classe molecular à qual os biopigmentos produzidos por *P. kudriavzevii* pertencem;
- Avaliar o comportamento da produção de biopigmentos por *P. kudriavzevii*;
- Estudar a influência da fonte de carbono e de nitrogênio na produção de biopigmentos pela levedura em estudo;
- Avaliar o efeito da suplementação nutricional sobre a produção de biopigmentos por essa levedura;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato de biopigmentos de *P. kudriavzevii*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O fluxograma de atividades desenvolvidas no presente trabalho está apresentado na Figura 9. Cada etapa será descrita detalhadamente a seguir.

Figura 9 - Fluxograma das atividades desenvolvidas



4.1 SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS

4.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar – obtenção, caracterização e processamento

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho foi gentilmente cedido pela Usina São Francisco, localizada no município de Sertãozinho/SP. O material foi seco ao sol até que sua umidade fosse igual ou inferior a 12% e caracterizado de acordo com uma adaptação da metodologia estabelecida pelo *National Renewable Energy Laboratory* (2012).

De acordo com o referido procedimento, um alíquota de partículas finas do bagaço de cana-de-açúcar teve seu teor de umidade determinado, foi submetido à uma hidrólise ácida em autoclave e, interrompendo-se a reação com a adição de água destilada, o material foi filtrado em cadinhos porosos. A partir do filtrado, determinou-se as concentrações de açúcares e de lignina solúvel, enquanto que a massa retida nos cadinhos foi utilizada para a determinação da lignina insolúvel. Uma segunda alíquota do bagaço foi acondicionada em mufla (500°C, 8-12h) para determinação do teor de cinzas.

Uma vez realizada a caracterização do bagaço de cana-de-açúcar, ele foi separado de acordo com critérios granulométricos para a etapa de pré-tratamento. Para tal, partículas entre 1,41 mm e 0,841 mm foram selecionadas utilizando séries de peneiras Tyler (14-20 mesh).

4.1.1.1 Produção e caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

A metodologia adotada para a obtenção do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar foi aquela estabelecida por Chandel *et al.* (2014). De acordo com o referido procedimento, o bagaço de cana-de-açúcar teve seu teor de umidade determinado (Medidor de umidade Marte Científica ID50) e pré-tratado por meio de uma hidrólise ácida (H₂SO₄, 98% de pureza) em uma proporção de 100 mg de ácido para cada grama de bagaço (massa seca). O procedimento foi realizado em um reator de mistura de 200 L, à temperatura de 121°C, pressão de 1 atm e durante 20 minutos.

Transcorrido o tempo da hidrólise, o hidrolisado foi esfriado à temperatura ambiente, filtrado em filtro de tecido para remoção da fração sólida remanescente (celulignina) e armazenado a 4°C.

O hidrolisado hemicelulósico resultante foi concentrado a vácuo (evaporador rotativo Quimis Q344B) na temperatura de 70°C e destoxificado, de acordo com a metodologia a

daptada a partir de Alves *et al.* (1998). Segundo esta, o material foi submetido aos seguintes procedimentos:

- a) Alcalinização (NaOH 11 mol/L) até pH 7;
- b) Filtração a vácuo em papel de filtro Whatman® n° 1;
- c) Acidificação com H₃PO₄ até pH 5,5;
- d) Segunda etapa de filtração;
- e) Adição de carvão ativo na proporção de 2,5 % (m/v) e agitação da mistura a 200 rpm, 30°C e durante 1h;
- f) Terceira etapa de filtração;
- g) Autoclavagem.

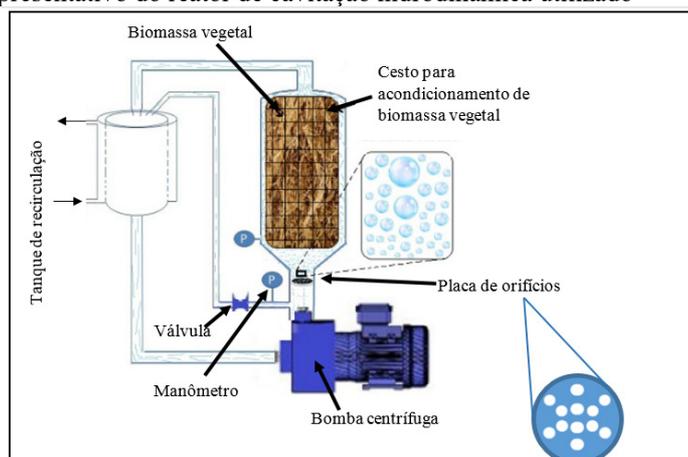
Concluída a destoxificação, uma alíquota do hidrolisado foi separada para filtração (Sep-pack C18, Millipore®) e posterior análise por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). A análise foi realizada em um cromatógrafo Agilent 1200 series, assim como descrito na seção 4.7.1.

4.1.1.2 Produção e caracterização do hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar

Nesta etapa, o bagaço de cana-de-açúcar foi tratado por hidrólise alcalina assistida por cavitação hidrodinâmica (TERÁN-HILARES *et al.*, 2017) e, subsequentemente, por hidrólise enzimática, de forma a se obter um hidrolisado constituído prevalentemente de glicose e xilose, o qual recebeu, no presente trabalho, a denominação de hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar (HMBCA).

Na primeira etapa, 40 g de bagaço de cana-de-açúcar foram acondicionados em um reator de cavitação hidrodinâmica (Figura 10), no qual uma solução alcalina (H₂O₂ 0,78% v/v e NaOH 0,3 mol/L) foi bombeada (bomba centrífuga de 1,5 CV) a uma vazão de 4 m³/h através de uma placa de orifícios (velocidade de fluido de 88 m/s e número de cavitação de 0,017). O tratamento do bagaço no sistema de cavitação hidrodinâmica foi realizado a uma pressão de 3 atm, temperatura de 70°C e durante 10 minutos. Finalizado o processo, o material tratado foi abundantemente enxaguado em água corrente e seco à temperatura ambiente.

Figura 10 - Esquema representativo do reator de cavitação hidrodinâmica utilizado



Fonte: adaptado de Terán-Hilares *et al.* (2017).

A hidrólise enzimática empregada para a obtenção do misto de bagaço de cana-de-açúcar foi realizada conforme Antunes *et al.* (2014), utilizou-se o complexo enzimático Cellic C-Tec 2 (Novozymes®). Neste procedimento, o bagaço pré-tratado foi acondicionado em frascos Erlenmeyer e, aos mesmos, adicionou-se tampão citrato (50 mmol/L, pH 4,8), na proporção 7,5% m/v, e o complexo enzimático (20 FPU/g de bagaço). Os frascos foram levados a um agitador orbital, à temperatura de 50°C, agitação de 250 rpm e durante 72h.

Finalizado o processo enzimático, o hidrolisado resultante foi filtrado a vácuo (papel de filtro Whatman n° 1) para a remoção das partículas remanescentes e autoclavado (110°C, 20 minutos). Por fim, o material foi centrifugado assepticamente (4000 rpm, 20 minutos), coletando-se o sobrenadante para os experimentos futuros. Amostras do hidrolisado final foram filtradas (Sep-pak C18, Millipore®) para a determinação de seus principais açúcares por CLAE (seção 4.8.1).

4.1.2 Farelo de arroz – obtenção, caracterização e processamento

O farelo de arroz foi gentilmente cedido por um estabelecimento de beneficiamento de arroz localizado na região do Piagui (Guaratinguetá/SP). Todas as biomassas vegetais foram acondicionadas em câmara fria (4°C).

A solubilização das proteínas presentes neste subproduto agroindustrial foi efetuada por meio do procedimento de auto-hidrólise em autoclave, assim como estabelecido por Milessi *et al.* (2013). O farelo, cuja umidade havia sido previamente identificada, foi umedecido com água destilada na razão sólido/líquido de 200 g/L e a mistura foi autoclavada a 0,5 atm (110°C) por 15 minutos. Em seguida, o material foi resfriado e centrifugado a 4000

A reativação da levedura foi realizada por meio da transferência de duas alçadas das colônias crescidas em placa de Petri para um meio de cultura líquido complexo (30 g/L de glicose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura). Os frascos de cultivo foram incubados a 30°C, sob agitação de 300 rpm e durante 48h. As células resultantes da ativação foram inoculadas em novas placas de Petri contendo o meio de cultivo sólido YMA (10 g/L de glicose, 5 g/L de peptona, 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte e 20 g/L de ágar bacteriológico) e novamente incubadas em estufa bacteriológica (30°C) durante 48 h e mantidas em refrigeração (4°C) para uso posterior.

4.3 ESTUDOS PRELIMINARES DE CRESCIMENTO CELULAR E CONSUMO DE AÇÚCARES POR *P. kudriavzevii*

4.3.1 Preparo do inóculo dos cultivos

Para os experimentos em meio líquido, selecionou-se uma placa de Petri da levedura e foram coletadas duas alçadas de células, inoculadas em meio complexo e cultivadas assim como descrito na seção 4.2. Após 48h de cultivo, a suspensão celular foi centrifugada e repetidamente lavada com água destilada estéril. Uma vez ressuspensa em água, coletou-se uma alíquota para definição de sua concentração por densidade óptica a 600 nm (espectrofotômetro Eppendorf BioSpectrometer® Fluorescence) (seção 4.7.4).

4.3.2 Cultivo em meio de cultura complexo (glicose e xilose de origem comercial como fonte de carbono)

O meio de cultura utilizado como base para os experimentos de produção de biopigmentos por *P. kudriavzevii* foi proposto por Hou-Rui *et al.* (2009), tendo sido empregado para a levedura em questão em outros processos biotecnológicos. A elaboração deste meio de cultivo foi realizada combinando três componentes: a) solução da fonte de carbono (glicose, 30 g/L); b) solução de ureia (2 g/L); c) “meio básico”, composto por K_2HPO_4 (4 g/L), KH_2PO_4 (6 g/L), $(NH_4)_2SO_4$ (2 g/L), extrato de levedura (0,5 g/l) e $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,2 g/L). A solução da fonte de carbono e o meio básico foram autoclavados (1 atm, 121°C, durante 15 minutos), já a solução de ureia foi esterilizada utilizando uma membrana filtrante de 0,22 μm (Millipore®) e armazenada em recipiente estéril.

Inicialmente, realizou-se a modificação da composição do meio de cultura em função da natureza e da concentração de duas fontes de carbono: glicose e xilose de origem comercial. A fonte de carbono utilizada e suas respectivas concentrações nas variações do meio de cultura proposto por Hou-Rui *et al.* (2009) estão apresentadas na Tabela 8. Ressalta-se que os demais componentes do meio foram mantidos em suas concentrações originais.

Tabela 8 - Natureza e concentração da fonte de carbono em diferentes variações do meio de cultivo estabelecido por Hou-Rui *et al.* (2009)

Meio de cultivo	Fonte de carbono	Concentração
G1	Glicose	30 g/L
G2	Glicose	45 g/L
G3	Glicose	60 g/L
X1	Xilose	30 g/L
X2	Xilose	45 g/L
X3	Xilose	60 g/L

Fonte: própria autora. Nota: G: glicose; X: xilose.

Os experimentos foram conduzidos em duplicata. Frascos Erlenmeyer foram inoculados com 0,5 g/L de células e incubados sob agitação de 250 rpm, temperatura de 30 °C e durante 144h (agitador orbital New Brunswick Scientific™ Innova 400). Em intervalos periódicos, avaliou-se, qualitativamente, a produção de biopigmentos e retirou-se amostras de 1 mL para as seguintes análises: crescimento celular (seção 4.7.4) e consumo de açúcares (CLAE, seção 4.7.1).

4.3.3 Cultivos em hidrolisado hemicelulósico e hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar

Os cultivos em hidrolisado hemicelulósico e hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar foram precedidos do crescimento do inóculo de forma semelhante ao descrito na seção 4.3.1, porém modificando-se a fonte de carbono: as células destinadas ao cultivo em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (HHBCA) foram preliminarmente cultivadas em xilose, enquanto aquelas destinadas ao cultivo em hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar (HMBCA) foram cultivadas em glicose.

Nesta etapa, ambos os hidrolisados foram empregados como fonte de carbono e complementados com um meio nutricional que forneceu as fontes de nitrogênio e sais

necessários para o crescimento da levedura, o mesmo meio nutricional utilizado nos ensaios descritos na seção 4.3.2 (HOU-RUI *et al.*, 2009), porém excluindo a fonte de carbono original do meio.

As condições de cultivo estabelecidas para o experimento em HHBCA foram as mesmas previamente utilizadas nos ensaios em meio complexo com glicose e xilose (seção 4.3.2) e durante 168h, enquanto o ensaio em HMBCA, conduzido após alguns testes preliminares, foi desenvolvido com 2 g/L de concentração celular inicial, 300 rpm de agitação, 30°C e durante 168h. Os ensaios também foram preparados em duplicata, utilizando-se frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL dos hidrolisados adicionados do meio nutricional.

Diferentemente dos experimentos com glicose e xilose de origem comercial, esta etapa não envolveu a variação da concentração inicial de açúcares. Optou-se por utilizar uma concentração intermediária às previamente estudadas (seção 4.3.2).

4.4 EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS BIOPIGMENTOS

4.4.1 Estudo de métodos de rompimento celular, extração e caracterização espectrofotométrica dos biopigmentos

A metodologia de extração dos biopigmento adotada no presente trabalho foi definida em função de duas variáveis-resposta: eficiência de lise celular e máxima absorvância, na região entre 400 e 550 nm, do extrato obtido. A eficiência de lise foi observada por microscopia óptica (aumento de 1000 vezes, microscópio Nikon Eclipse E200), efetuando-se a coloração das amostras com uma solução de safranina, e por espectrofotometria, avaliando-se variações na absorvância nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm, os quais correspondem, respectivamente, às regiões de absorção de ácidos nucleicos e de proteínas. Ressalta-se que as análises foram realizadas entre as etapas de rompimento celular e adição de solventes.

Em um primeiro momento, obteve-se uma suspensão celular por meio do procedimento descrito na seção 4.3.1. Após sucessivas lavagens das células com água destilada, estas foram ressuspensa de forma que a concentração celular da suspensão fosse de 60 g/L. Os procedimentos de ruptura celular e extração dos biopigmentos produzidos por *P. kudriavzevii* foram desenvolvidos com base nos estudos de Valduga *et al.* (2009) e Sedmak,

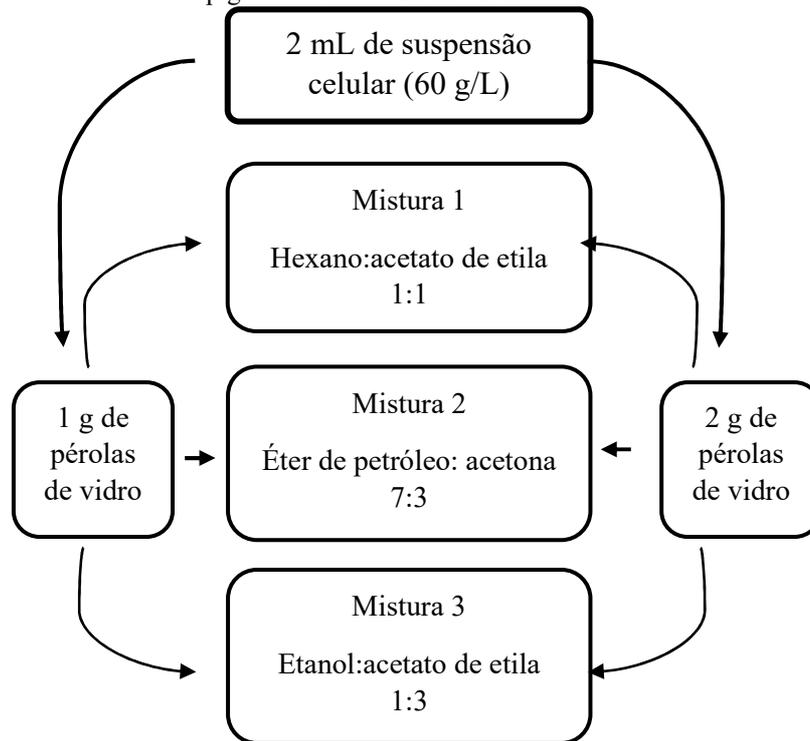
Weerasinghe e Jolly (1990), sendo que a metodologia definida neste último foi adaptada de forma a ser mais eficiente para o microrganismo em estudo.

Seguindo-se a metodologia de Valduga *et al.* (2009), 2 mL da suspensão foram levados a um almofariz de porcelana no qual se verteu nitrogênio líquido (N₂(l)) e se realizou a maceração das células com um pistilo até que todo o material apresentasse aspecto opaco e triturado. Em seguida, adicionou-se dimetilsulfóxido (DMSO) na proporção de 2:1 m/v. A mistura foi transferida para tubos de ensaio e aquecida em banho termostático a 55°C durante 30 minutos, agitando-se os tubos periodicamente. Após o aquecimento, o material foi transferido para tubos de centrífuga e se adicionou 2 mL da solução da solução extratora acetona/metanol 7:3 v/v.

Repetidas centrifugações (4000 rpm, 5°C, 20 minutos) foram executadas e se considerou como a finalização da extração o momento em que tanto o pellet celular quanto o sobrenadante se tornaram incolores. Ao final de cada centrifugação, o sobrenadante contendo os biopigmentos foi coletado e armazenado para ser posteriormente concentrado (Concentrador a vácuo Christ RVC 2-18 CD plus) a 35°C. O extrato final foi armazenado ao abrigo de luz e sob refrigeração e analisado por espectrofotometria (Eppendorf Biospectrometer® Fluorescence), realizando-se uma varredura entre 400 e 550 nm (seção 4.7.5).

A metodologia descrita por Sedmak, Weerasinghe e Jolly (1990) foi modificada em função da necessidade de encontrar uma combinação de solventes eficiente na extração dos biopigmentos intracelulares de *P. kudriavzevii*, uma vez que a natureza dessas moléculas era desconhecida, bem como sua polaridade, solubilidade e demais características químicas. As combinações de estratégias de rompimento celular e de extração do bioproduto de interesse que foram adotadas no presente trabalho estão esquematizadas na Figura 12.

Figura 12 - Esquema representativo das combinações de métodos de rompimento celular e de misturas de solventes para obtenção do extrato de biopigmentos de *P. kudriavzevii*



Fonte: própria autora.

Os procedimentos de ruptura e extração de biopigmentos (seis combinações) baseados em Sedmak, Weerasinghe e Jolly (1990) foram realizados da seguinte maneira: 2 mL da suspensão celular de *P. kudriavzevii* (60 g/L) foram acondicionados em tubos de centrífuga com pérolas de vidro de 0,5 mm de diâmetro e levados a um agitador do tipo vórtex (Scientific Industries Genie 2 G560) durante 25 minutos, de forma a efetuar a lise celular por estresse mecânico. Foi avaliado o efeito da massa de pérolas de vidro (1 grama ou 2 gramas) sobre o rompimento das células.

Uma vez efetuada a ruptura, adicionou-se aos tubos contendo a biomassa lisada 1 mL das combinações de solventes para extração e solubilização dos biopigmentos. As combinações foram definidas com base na literatura: hexano:acetato de etila 1:1 v/v (REBECCA *et al.*, 2014), éter de petróleo: acetona 7:3 v/v (ALBUQUERQUE, 2015) e etanol:acetato de etila 1:3 v/v (MONKS *et al.*, 2012). Após leve agitação manual, os tubos foram centrifugados (Hitachi Himac CF16RN) a 4000 rpm, 5°C e durante 25 minutos. Para cada combinação de massa de pérolas de vidro, foram destinados dois tubos de centrífuga, de forma a obter um volume final de extrato bruto de 2 mL.

Ao término da centrifugação, o sobrenadante, constituído da mistura de solventes contendo os biopigmentos extraídos, foi coletado com uma pipeta de Pasteur, transferido para

um tubo de microcentrífuga e novamente centrifugado (Eppendorf Minispin 22331), de forma a remover qualquer traço de água do extrato orgânico. Após a separação total da água residual, o extrato foi coletado, avolumado para 2 mL em balão volumétrico (volume original da mistura extratora), armazenado em frasco âmbar e destinado à análise espectrofotométrica (varredura entre 400 e 550 nm, espectrofotômetro Eppendorf BioSpectrometer® Fluorescence). Todos os procedimentos envolvidos na obtenção do extrato bruto de biopigmentos de *P. kudriavzevii* foram realizados ao abrigo de luz.

Os extratos obtidos com cada uma das técnicas de rompimento celular e com cada uma das misturas de solventes foram analisados por espectrofotometria, realizando uma varredura entre 400 e 550 nm (Eppendorf Biospectrometer® Fluorescence). A partir dos resultados obtidos na varredura espectrofotométrica, identificou-se o comprimento de onda no qual se registrou o maior valor de unidades absorvância e se comparou os valores obtidos com os diferentes solventes (teste de Tukey, $p \leq 0,05$). O método que proporcionou, estatisticamente, a obtenção do valor mais alto de unidades de absorvância foi selecionado para a avaliação da produção de carotenoides nos cultivos submersos, que foi expressa em mg de carotenoides totais por litro de cultivo (mg/L) ou mg de carotenoides totais por grama de biomassa seca (mg/g). Os valores de concentração foram calculados com base em uma curva-padrão de uma solução de β -caroteno em etanol:acetato de etila 7:3, no comprimento de onda de 453 nm (Eppendorf BioSpectrometer® Fluorescence).

4.4.2 Caracterização da(s) molécula(s) de biopigmentos produzida(s) por *P. kudriavzevii* - FT-IR

Como forma de realizar uma caracterização parcial do extrato dos biopigmentos produzidos por *P. kudriavzevii*, realizou-se a análise de seu espectro na região do infravermelho (FT-IR) em comparação com o espectro do β -caroteno padrão. A análise de FT-IR foi efetuada no aparelho Frontier (Perkin Elmer Frontier FT-IR).

O extrato de biopigmentos utilizado para tal análise foi obtido a partir de células cultivadas em meio de cultivo complexo (30 g/L de glicose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura) durante 48h.

O procedimento de extração foi realizado de acordo com a metodologia previamente definida no presente estudo. A biomassa obtida a partir de 50 mL de cultivo foi centrifugada, lavada com água deslilada e concentrada para 60 g/L. Em seguida, 1mL da suspensão celular foi adicionado a um tubo contendo pérolas de vidro, o qual foi submetido à agitação em

vórtex (25 minutos), recebeu 1mL da mistura etanol:acetato de etila 1:3 e realizou-se uma centrifugação para obtenção do extrato de biopigmentos.

4.5 MODIFICAÇÕES DO MEIO NUTRICIONAL E SEUS EFEITOS SOBRE O CRESCIMENTO CELULAR E A PRODUÇÃO DE BIOPIGMENTOS POR *P. kudriavzevii*

4.5.1 Estudos da substituição do extrato de levedura pelo extrato de farelo de arroz como fonte de nitrogênio

Os cultivos realizados substituindo o extrato de levedura por extrato de farelo de arroz foram realizados, em um primeiro momento, utilizando-se glicose de origem comercial como fonte de carbono. Em seguida, a mesma estratégia de cultivo foi adotada para o estudo desta substituição, utilizando-se o hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono.

A substituição do extrato de levedura pelo extrato de farelo de arroz foi fundamentada sobre a concentração de proteínas solúveis. Dessa maneira, determinou-se a concentração, em ambos os extratos, pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951) e se calculou o volume necessário de extrato de farelo de arroz para fornecer a mesma concentração de proteínas solúveis que estaria presente no meio de cultivo de Hou-Rui *et al.* (2009).

A concentração inicial de açúcares desses cultivos foi de 30 g/L. Com exceção do extrato de levedura, substituído pelo extrato de farelo de arroz, os demais componentes do meio de cultivo proposto por Hou-Rui *et al.* (2009) foram mantidos em suas concentrações originais. Variações na concentração de açúcares e no crescimento celular foram analisadas a cada 24h, conforme descrito nas seções 4.7.1 e 4.7.4, respectivamente.

Em relação aos biopigmentos, as amostragens diárias foram utilizadas para os cálculos da produção de biopigmentos por volume de cultivo (mg/L), da produção específica de carotenoides totais por unidade de biomassa celular (mg/g de biomassa seca), produtividade de carotenoides totais ((mg/L)/h) e conversão de açúcares fermentescíveis em carotenoides totais (mg de carotenoides totais/g de açúcares fermentescíveis). Detalhamentos sobre os métodos de quantificação estão apresentados no item 4.7.8.

Os experimentos foram realizados em triplicata, retirando-se amostras a cada 24h. Os cultivos foram inoculados com 2 g/L de células e conduzidos a 300 rpm, 30°C e durante 120h.

4.5.2 Estudo do efeito da modificação da suplementação do hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar

Esta etapa se constituiu da remoção gradual dos componentes do meio de cultura, de forma a analisar o efeito dos diferentes nutrientes sobre o crescimento celular e produção de biopigmentos por *P. kudriavzevii*. Os meios de cultivo desenvolvidos nesta etapa foram baseados em hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono e extrato de farelo de arroz como fonte complexa de nitrogênio. A composição dos meios de cultura modificados está apresentada na Tabela 9. Os ensaios com esses meios de cultivo foram realizados em triplicata, a partir de uma concentração inicial de células de 2 g/L, a 300 rpm, 30°C e durante 120h.

Tabela 9 - Composição dos meios de cultura modificados a partir de Hou-Rui *et al.* (2009) para o cultivo submerso de *P. kudriavzevii* em HMBCA

Meio de cultura	Fonte de carbono	EL (g/L)	EFA (g/L)	Ureia (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	K ₂ HPO ₄ (g/L)	MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)
Hou-Rui <i>et al.</i> (2009)	30 g/L de glicose	0,5	0	2	2	6	4	0,2
MM 1	HMBCA	0	0,5	2	2	6	4	0
MM 2	HMBCA	0	0,5	2	2	6	0	0
MM 3	HMBCA	0	0,5	2	2	0	0	0
MM4	HMBCA	0	0,5	2	0	0	0	0
MM 5	HMBCA	0	0,5	0	2	0	0	0
MM 6	HMBCA	0	0,5	0	0	0	0	0

Fonte: própria autora. Nota: MM: Meio modificado; HMBCA: hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar; EL: Extrato de levedura; EFA: extrato de farelo de arroz.

No caso desse conjunto de experimentos, não se realizou a amostragem a cada 24h, as análises foram realizadas apenas ao final do cultivo. A concentração final de açúcares foi determinada conforme especificado na seção 4.7.1, enquanto que o crescimento celular foi analisado por turbidimetria (seção 4.7.4). Os resultados referentes à produção de carotenoides

totais (produção, produção específica, produtividade volumétrica e conversão de açúcares fermentescíveis em carotenoides totais) foram obtidos conforme descrito na seção 4.7.8.

4.6 ANÁLISES DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DE BIOPIGMENTOS DE *P. kudriavzevii*

A atividade antioxidante foi examinada em função da captura de dois radicais livres: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e 2,2-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS). A análise envolvendo a captura do DPPH foi adaptada da metodologia proposta por Mensur *et al.* (2001) e do Comunicado Técnico 127 (RUFINO *et al.*, 2007a). A avaliação da captura do ABTS, por outro lado, foi realizada por meio da utilização das metodologias definidas por Thaipong *et al.* (2006) e pelo Comunicado Técnico 128 (RUFINO *et al.*, 2007b)

Em ambas as metodologias, a atividade antioxidante foi expressa em função de uma curva de calibração de trolox e os resultados foram expressos em micromol equivalente de trolox por volume de amostra ($\mu\text{mol ET/mL}$). Detalhes do procedimento estão apresentados na seção 4.7.9.

4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.7.1 Determinação das concentrações de glicose, xilose, celobiose, arabinose e ácido acético

As análises de concentração dos açúcares e de etanol nos cultivos de *P. kudriavzevii* foram realizadas em um cromatógrafo Agilent 1200 series equipado com uma coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,7 mm, Bio-Rad), à temperatura de 45°C, utilizando-se como eluente uma solução de H₂SO₄ 0,001 N (fluxo de 0,6 mL/min) e detecção por índice de refração RID 6A. Foram utilizados padrões de celobiose, glicose, xilose, arabinose e etanol.

4.7.2 Determinação de proteínas solúveis

A concentração de proteínas solúveis do extrato de levedura e do extrato de farelo de arroz foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951), utilizando-se uma curva padrão de referência elaborada com uma solução de albumina bovina. As medidas de absorvância foram obtidas a 660 nm (Eppendorf BioSpectrometer[®] Fluorescence).

4.7.3 Determinação de nitrogênio Kjeldahl

A análise de nitrogênio Kjeldahl foi realizada no Laboratório de Tecido Vegetal do Departamento de Ciências do Solo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP). A digestão das amostras foi realizada no bloco digestor TE-036/1 Série: 99578 (Tecnal) e o destilador de nitrogênio utilizado foi o modelo TE-040125 Série: 97713 (Tecnal). A temperatura máxima para o processo foi 350°C e o tempo de digestão foi de 4h.

4.7.4 Turbidimetria

Análises turbidimétricas foram conduzidas para determinação da concentração celular da levedura em estudo. Para o procedimento, combinou-se dados de massa seca de *P. kudriavzevii* com uma curva de calibração realizada a partir da leitura de absorvância (600 nm) de uma suspensão celular da levedura.

Inicialmente, a levedura foi cultivada em meio líquido durante 48 h, assim como descrito na seção 4.3.1 e, após esse período, as células foram separadas do meio de cultivo por meio de centrifugação (4000 rpm, 15 minutos) e lavadas em água destilada por três vezes. Coletou-se 15 mL da suspensão celular e depositou-se o material em um cadinho de porcelana o qual foi levado à estufa de secagem (60°C) para determinação da massa seca. Os cadinhos foram esfriados em dessecador e pesados em balança analítica, sendo considerados como totalmente secos quando se observou a constância de suas massas. O restante da suspensão celular foi diluído diversas vezes e mediu-se a absorvância de cada diluição para que se estabelecesse uma correlação linear entre a o fator de diluição e a absorvância (espectrofotômetro Eppendorf BioSpectrometer® Fluorescence).

A massa seca da suspensão celular depositada nos cadinhos foi utilizada para determinação da concentração celular em cada diluição cuja absorvância foi medida e, por fim, efetuou-se um ajuste linear ($r \geq 0,99$) dos dados e obteve-se uma equação que relaciona a absorvância com a concentração celular. Essa equação foi utilizada para as medidas de concentração celular utilizadas no presente trabalho.

4.7.5 Varreduras espectrofotométricas

As varreduras em espectrofotômetro foram realizadas no aparelho Eppendorf BioSpectrometer® Fluorescence, utilizando-se cubetas de quartzo (caminho óptico de 10 mm).

Selecionou-se a faixa de comprimento de onda desejada para cada amostra: a quantificação dos biopigmentos foi realizada a partir da identificação dos picos na região entre 400 nm e 600 nm, enquanto a análise espectrofotométrica pertinente à identificação dos biopigmentos, por sua vez, foi realizada na faixa de comprimentos de onda entre 190 nm e 700 nm. Os valores de absorvância medidos pelo aparelho foram determinados a cada nanômetro.

4.7.6 Medias de pH

Os valores de pH dos meios de cultivo foram medidos em potenciômetro de bancada (Lucadema mPA-210), sendo este calibrado com soluções-tampão padronizadas nos valores de pH 4,0, 7,0 e 10,0.

4.7.7 Microscopia óptica

As imagens de microscopia óptica apresentadas neste trabalho foram realizadas no microscópio Nikon Eclipse E200 e capturadas com a câmera Prime Cam HD Lite 1080p. As amostras foram coradas com uma solução de safranina e ampliadas mil vezes para observação das células e registro das imagens.

4.7.8 Determinação de carotenoides totais

A quantificação da produção dos carotenoides totais produzidos neste estudo foi realizada com base em uma curva-padrão elaborada com uma solução de β -caroteno (Sigma-Aldrich) em etanol:acetato de etila 1:3, no comprimento de onda de 453 nm e utilizando-se cubetas de quartzo (Eppendorf BioSpectrometer® Fluorescence). A partir da curva-padrão, foram determinadas as concentrações de carotenoides totais, as quais foram utilizadas para o cálculo dos seguintes parâmetros:

- a) Produção de biopigmentos por volume de cultivo: determinou-se a concentração de carotenoides totais na amostra utilizada para extração (2 mL da biomassa celular concentrada a 60 g/L) e se realizou o cálculo para a estabelecer a concentração de carotenoides totais na biomassa produzida em 50 mL de meio de cultivo (volume original). Esta foi expressa em miligramas de carotenoides totais por litro de cultivo (mg/L);

- b) Produção específica de carotenoides totais por unidade de biomassa celular: a partir da determinação da concentração de carotenoides totais por volume de meio, dividiu-se a massa de carotenoides totais obtida na extração pela massa de células utilizada na extração. Em seguida, realizou-se o cálculo reverso para a obtenção da massa de carotenoides totais sobre a massa de células obtida no cultivo. O resultado foi expresso em miligramas de carotenoides totais por grama de biomassa seca (mg/g de biomassa seca);
- c) Produtividade de carotenoides totais: no ponto de maior produção, dividiu-se a concentração (mg/L) pelo número de horas do cultivo da referida amostra. Esta foi expressa em miligramas de carotenoides totais por litro de meio por hora ((mg/L)/h);
- d) Conversão de açúcares fermentescíveis em carotenoides totais: na amostra de produção máxima, dividiu-se a concentração (mg/L) de carotenoides totais pela concentração de açúcares fermentescíveis consumida no determinado ponto de amostragem. Foi apresentada como miligramas de carotenoides totais por gramas de açúcares fermentescíveis (mg/g).

4.7.9 Atividade antioxidante – captura do DPPH e do ABTS

Estes ensaios foram realizados com o extrato bruto de biopigmentos de células obtidas a partir do meio de cultivo modificado (seção 4.5.2) que propiciou a maior produção específica de carotenoides totais e com a metodologia de extração definida por meio da combinação de técnicas proposta na seção 4.4.1.

A determinação da atividade antioxidante a partir do radical livre DPPH foi realizada a partir de uma solução de DPPH em metanol, na concentração de 0,06 mmol/L. Esta foi diluída até que sua absorvância fosse de $1,1 \pm 0,02$ ($\lambda = 515$ nm) e realizou-se, durante 30 minutos, a reação entre a solução do radical (2850 μ L) e a amostra (150 μ L).

Calculou-se os valores de atividade antioxidante correlacionando-se os resultados obtidos em 515 nm com uma curva-padrão. Os resultados foram expressos em equivalentes de trolox por mL (μ mol ET/mL).

Para a metodologia envolvendo o radical ABTS, preparou-se uma solução de persulfato de potássio a 140 mmol/L adicionada a uma solução 7,4 mmol/L de [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico] (ABTS) a 7,4 mmol/L. A mistura foi armazenada à temperatura ambiente e ao abrigo de luz durante 16h.

Após esse período, o reagente teve sua absorvância ajustada para $0,7 \pm 0,05$ ($\lambda = 734$ nm), efetuando-se sua diluição com metanol. A reação entre o extrato de biopigmentos e o radical ABTS ocorreu durante 30 minutos, ao abrigo de luz. Os resultados foram comparados com uma curva-padrão de trolox e expressos em equivalentes de trolox por mL ($\mu\text{mol ET/mL}$).

4.7.10 FT-IR

Para a realização da análise do extrato por FT-IR, este foi concentrado (Concentrador a vácuo Christ RVC 2-18 CDplus) até a total evaporação do solvente e o precipitado foi ressuspenso em clorofórmio e armazenado sob refrigeração ao abrigo de luz. As amostras foram depositadas em pastilhas de NaCl, secas ao ar até completa evaporação do solvente e analisadas no espectrômetro Perkin Elmer Frontier FT-IR, na região do espectro infravermelho entre 622 e 3920 cm^{-1} .

4.8 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS

As análises estatísticas elaboradas para a comparação dos resultados das diferentes metodologias de extração e dos resultados referentes à produção de carotenoides totais e crescimento celular dos experimentos conduzidos neste trabalho foram realizadas no programa Statistica[®] 7.0. Implementaram-se testes de comparação de médias e os intervalos de confiança considerados foram de 5% ou de 10%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR – CARACTERIZAÇÃO E PROCESSAMENTO

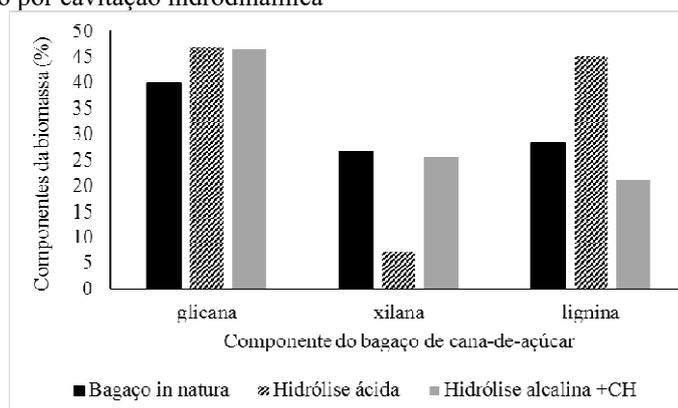
De acordo com os resultados da caracterização do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, sua composição química está descrita na Tabela 10. Os extrativos foram quantificados apenas no bagaço *in natura* e as variações nas porcentagens de glicana, xilana e lignina da fração sólida remanescente após a hidrólise ácida e o pré-tratamento alcalino assistido por cavitação hidrodinâmica (CH) estão apresentadas na Figura 13.

Tabela 10 - Composição percentual do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (seco e moído)

Componente	Porcentagem (%)
Glucanas	39,52
Xilanas	25,63
Lignina total	30,36
Cinzas	1,22
Extrativos	2,9

Fonte: própria autora.

Figura 13 - Composição percentual de glicana, xilana e lignina no bagaço de cana-de-açúcar após tratamento ácido e alcalino assistido por cavitação hidrodinâmica



Nota: CH: Cavitação hidrodinâmica. Fonte: própria autora.

Tem sido demonstrado por diversas pesquisas que a composição química do bagaço de cana-de-açúcar sofre alterações em função da variedade de cultivar, idade do cultivo, parâmetros agronômicos e condições edafoclimáticas (BENJAMIN; CHENG; GÖRGENS, 2013; CHANDEL *et al.*, 2014; SINDHU *et al.*, 2016; SZCZARBOWSKI *et al.*, 2014), no

entanto, pode-se afirmar que os dados apresentados para o bagaço *in natura* são coerentes com a composição usualmente relatada para as variedades de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil. Em média, o bagaço de cana-de-açúcar da agricultura brasileira apresenta a seguinte composição: 38% a 46% de celulose, 19% a 32% de hemicelulose, 19% a 31% de lignina, 1% a 3% de cinzas e 4,6% a 9,1% de extrativos (CANILHA *et al.*, 2012).

Os resultados apresentados na Figura 13 evidenciam o efeito de cada um dos pré-tratamentos sobre a estrutura do bagaço de cana-de-açúcar: enquanto o pré-tratamento ácido hidrolisa preferencialmente a hemicelulose (xilanas), o pré-tratamento alcalino assistido por cavitação hidrodinâmica é responsável, principalmente, por remover a lignina. A porcentagem de celulose (glicanas), por outro lado, aumenta proporcionalmente após ambos os pré-tratamentos e pode ser subsequentemente hidrolisada por um processo enzimático.

Vale lembrar que o destino da fração sólida e da porção hidrolisada é diferente em cada processo. Enquanto que o hidrolisado obtido pelo primeiro tipo de pré-tratamento (hemicelulose solubilizada) é coletado, destoxificado e utilizado em bioprocessos, enquanto que a fração solúvel oriunda do segundo pré-tratamento é descartada e a fração sólida é submetida a uma posterior hidrólise enzimática favorecida pela remoção de lignina.

As condições de pré-tratamento alcalino assistido por cavitação hidrodinâmica foram previamente otimizadas por Terán-Hilares *et al.* (2016). Os autores verificaram que o emprego desta técnica permitiu a remoção de 54,6% da lignina presente no bagaço de cana-de-açúcar.

Foi observada, também, uma modificação estrutural na fibra do bagaço de cana-de-açúcar por meio do impacto das bolhas formadas no processo de cavitação hidrodinâmica, que colapsam e liberam uma grande quantidade de energia (TERÁN-HILARES *et al.*, 2020). Imagens de micrografia eletrônica de varredura evidenciaram que a fibra do bagaço pré-tratado apresentava perfurações e maior rugosidade em relação ao bagaço *in natura* (TERÁN-HILARES *et al.*, 2016). Vale ressaltar que o reator de cavitação hidrodinâmica utilizado nesta pesquisa foi o mesmo que o utilizado por Terán-Hilares *et al.* (2016).

A influência do processo de cavitação hidrodinâmica sobre a hidrólise enzimática foi previamente relatada por Madison *et al.* (2017). Os autores verificaram que a digestibilidade enzimática de um bagaço de cana-de-açúcar tratado por cavitação hidrodinâmica e cal foi 67% maior do que a de um bagaço tratado apenas por cal.

Terán-Hilares *et al.* (2020) também observaram um efeito positivo da utilização desta técnica sobre a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. No referido estudo, os

autores obtiveram $20,1 \pm 1,07$ % e $54,47 \pm 0,34$ % de liberação de açúcares redutores totais a partir de 24h de hidrólise enzimática do bagaço em um processo convencional (conduzido em frascos Erlenmeyer sobre agitação) e com a utilização de cavitação hidrodinâmica, respectivamente.

5.1.1 Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

O hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (HHBCA) utilizado no presente trabalho foi obtido por meio de um processo de hidrólise branda (Figura 14), e, dessa forma, obteve-se um hidrolisado rico em xilose (ANTUNES *et al.*, 2017; CHANDEL *et al.*, 2014). O hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar utilizado no presente trabalho apresentava, após ser concentrado e destoxificado, a seguinte composição: 0,3 g/L de glicose, 31 g/L de xilose, 1,6 g/L de ácido acético, $5 \cdot 10^{-4}$ g/L de 5-hidroximetilfurfural e $1 \cdot 10^{-3}$ g/L de furfural.

O hidrolisado hemicelulósico obtido apresentou as proporções esperadas entre seus diferentes açúcares, pois, conforme descrito na literatura, o processo de hidrólise ácida utilizado como pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar é mais eficiente em desestabilizar e romper as moléculas de hemicelulose do que as de celulose, permitindo uma maior liberação de xilose do que de glicose (AGUILAR *et al.*, 2002; FONSECA *et al.*, 2011; LAVARACK; GRIFFIN; RODMAN, 2002; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Além disso, o resultado da análise composicional desse hidrolisado é coerente com trabalhos anteriores desenvolvidos no grupo de pesquisa no qual esta pesquisa se insere (MARCELINO *et al.*, 2017; MARTINIANO *et al.*, 2014; PHILIPPINI *et al.*, 2019).

A concentração de ácido acético no hidrolisado destoxificado (1,60 g/L) foi semelhante ao apresentado na literatura em relação aos mesmos tipos de processos hidrolíticos e de destoxificação. Philippini *et al.* (2019), por exemplo, avaliaram a composição do hidrolisado hemicelulósico destoxificado de cinco variedades de cana-de-açúcar e observaram concentrações de ácido acético entre $1,99 \pm 0,08$ e $2,85 \pm 0,17$ g/L. Outros valores apresentados na literatura são: 2,7 g/L (BONTURI *et al.*, 2017), 1,26 g/L (CHANDEL *et al.*, 2014) e 4,02 g/L (VAZ DE ARRUDA *et al.*, 2017).

A presença de concentrações reduzidas de inibidores furfural e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) não foi considerada como um fator interferente nos cultivos submersos com *P. kudriavzevii*, uma vez que essa levedura é particularmente tolerante a inibidores e há indícios de que seja capaz de metabolizar esses compostos (DÍAZ-NAVA *et al.*, 2017; FONSECA,

2009; HOU-RUI *et al.*, 2009). O estudo de Fonseca (2009), por exemplo, demonstrou que o cultivo de *P. kudriavzevii* em hidrolisado não destoxificado e concentrado de bagaço de cana-de-açúcar contendo $1,6 \cdot 10^{-2}$ g/L de furfural, $2 \cdot 10^{-2}$ g/L de 5-HMF, 0,6 g/L de siringaldeído e 0,3 g/L de ácido ferúlico reduziu a concentração desses inibidores em 100%, 85%, 16,7% e 16,7%, respectivamente.

Em relação ao efeito da presença de inibidores sobre bioprocessos, tem sido observado que diferentes espécies de leveduras respondem de maneira distinta à presença de inibidores. A literatura relata que a levedura *Pichia stipitis* sofre reduções em seu crescimento celular e produção de etanol na presença de 3,5 g/L a 5 g/L de ácido acético (BELLIDO *et al.*, 2011; NIGAM, 2001), ao passo que Narendranath, Thomas e Ingledew (2001) observaram uma concentração mínima inibitória de ácido acético de 6 g/L sobre o crescimento celular de *S. cerevisiae*. A levedura *P. kudriavzevii*, por sua vez, é considerada uma espécie com resistência a múltiplos fatores de estresse e a literatura apresenta sua capacidade de tolerar uma concentração de ácido acético de até 18 g/L (YUAN; GUO; HWANG, 2017).

A capacidade da levedura *P. kudriavzevii* de crescer em ambientes com alta salinidade e alta concentração de inibidores tem sido relatada em inúmeras publicações (DÍAZ-NAVA *et al.*, 2017; HOU-RUI *et al.*, 2009; RADECKA *et al.*, 2015; ROŞU *et al.*, 2019; XIAO *et al.*, 2014). Em relação aos furfurais, destaca-se a publicação de Kwon *et al.* (2011), a qual demonstrou que a concentração de furfural e de 5-HMF que inibiu completamente a levedura foi de 7 g/L.

Considerando-se a capacidade natural da levedura de tolerar e, até mesmo, metabolizar os furanos comumente presentes em hidrolisados hemicelulósicos, as reduzidas concentrações de tais compostos ($1 \cdot 10^3$ g/L de furfural e $5 \cdot 10^4$ g/L de 5-HMF) não foram consideradas como variáveis significativas nos estudos conduzidos com esse hidrolisado. Ressalta-se que, em trabalhos prévios (FONSECA, 2009), esta linhagem de *P. kudriavzevii* foi utilizada para destoxificar o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

5.1.2 Hidrolisado misto do bagaço de cana-de-açúcar (HMBCA)

O bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pelo processo alcalino foi submetido a uma hidrólise enzimática durante 72h e a concentração dos açúcares liberados por esse processo foi determinada por CLAE. Neste trabalho, foram realizados dois blocos de experimentos com hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar (HMBCA), sendo que o primeiro abrange um experimento preliminar, de caráter qualitativo, e o segundo compreende os principais

experimentos desta pesquisa, os quais avaliaram, quantitativamente, a produção de carotenoides totais.

Em ambos os hidrolisados, observou-se uma proporção de, aproximadamente, 2:1 entre as concentrações de glicose e xilose: 26,71 e 14,43 g/L, respectivamente, no experimento do primeiro bloco, e 18 e 9,80 g/L, respectivamente, nos experimentos principais. Ambos os hidrolisados apresentaram reduzidas concentrações de celobiose (1,18 g/L e 0,88 g/L no experimento do primeiro e do segundo bloco, respectivamente) e de arabinose (1,23 e 1,32 g/L no primeiro e no segundo bloco, respectivamente). A concentração de ácido acético também foi analisada: 0,7 g/L no hidrolisado utilizado no primeiro bloco e de 1,69 g/L no hidrolisado utilizado para os demais cultivos.

Após a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por cavitação hidrodinâmica, obteve-se um hidrolisado misto de coloração clara, rico em glicose, porém com uma concentração maior de xilose em relação a hidrolisados obtidos por pré-tratamento alcalino sem o processo de cavitação hidrodinâmica (PHILIPPINI *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2015). Sugere-se que uma maior liberação de xilose em relação a processos alcalinos realizados da forma tradicional (frascos agitados) seja devida às modificações estruturais que a CH provoca no bagaço, que pode favorecer a hidrólise pelas xilanases presentes no complexo.

Conforme discutido na seção 5.1.1, a levedura *P. kudriavzevii* é tolerante à presença de inibidores e, dado que estudos anteriores dessas condições de pré-tratamento observaram baixos níveis desses compostos, as concentrações deles não foram mensuradas. Em condições semelhantes de pré-tratamento, Terán-Hilares *et al.* (2017) obtiveram as seguintes concentrações de compostos inibidores: 0,02 g/L (0,208 mmol/L) de furfural, $2 \cdot 10^{-4}$ g/L ($1,6 \cdot 10^{-6}$ mmol/L) de 5-HMF e 0,09 g/L de fenóis totais. Esses valores permitiram que se supusesse que o hidrolisado misto obtido no presente trabalho dispensaria uma etapa de destoxificação (JUNG; KIM, 2017).

Ao realizar a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar submetido ao pré-tratamento alcalino assistido por cavitação hidrodinâmica, obteve-se a liberação de mais de 15 g/L de glicose e mais de 9 g/L de xilose. Esses resultados indicam a importância das modificações estruturais e composicionais proporcionadas pela cavitação hidrodinâmica sobre o bagaço de cana-de-açúcar, pois este procedimento foi realizado sobre o bagaço *in natura*, sem necessidade de qualquer tratamento prévio.

Comparativamente, no estudo de Philippini (2017), realizou-se a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar desprovido de extrativos e esta permitiu a liberação de,

aproximadamente, 2 g/L de glicose, enquanto que 14 g/L e 30 g/L de glicose foram obtidos a partir da hidrólise enzimática da celulignina e da polpa celulósica, respectivamente. Pode-se depreender, a partir destes resultados, que a concentração de glicose do hidrolisado da polpa celulósica do bagaço de-cana-de-açúcar produzido por Philippini (2017) assemelha-se à quantidade presente no HMBCA obtido neste trabalho (26,71 g/L).

É importante observar que, apesar da similaridade entre os resultados de concentração de glicose no hidrolisado, o estudo de Philippini (2007) utilizou-se de várias etapas de pré-tratamento para obter 30 g/L de glicose. O resultado de 26,71 g/L do presente estudo, no entanto, foi obtido com dois procedimentos (pré-tratamento e hidrólise enzimática), o que representa economia de tempo, energia e recursos.

Evidencia-se que o emprego de cavitação hidrodinâmica como pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar é uma abordagem recente e ainda pouco explorada para a obtenção de hidrolisados desta biomassa lignocelulósica. Ademais, a utilização desta técnica como pré-tratamento de material lignocelulósico para a obtenção de um hidrolisado composto prevalentemente de glicose e xilose e seu emprego para a produção de biopigmentos não foi, até o presente momento, relatada na literatura, o que destaca o caráter inovador deste trabalho.

Pesquisas recentes que utilizaram a cavitação hidrodinâmica para o pré-tratamento de biomassa vegetal tiveram como foco os seguintes materiais: palha de milho (NAKASHIMA *et al.*, 2016), junco (KIM *et al.*, 2015), palha de trigo (PATIL *et al.*, 2016), sabugo de milho (THANGAVELU *et al.*, 2018) e bagaço de cana-de-açúcar (MADISON *et al.*, 2017; TERÁN HILARES *et al.*, 2017). A versatilidade desta técnica em conjunto com os benefícios de economia de energia e insumos que proporciona (TERÁN HILARES *et al.*, 2017) fundamentam a atenção que ela tem recebido da biotecnologia e ressalta a necessidade de mais estudos que explorem as potencialidades da cavitação hidrodinâmica, não apenas no tratamento de materiais lignocelulósicos, mas também na obtenção de produtos microbianos intracelulares, como óleos e biopigmentos.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE FARELO DE ARROZ

Uma vez que o extrato aquoso de farelo de arroz foi utilizado como fonte de nitrogênio para os cultivos submersos, ele foi caracterizado quanto à concentração de nitrogênio Kjeldahl e proteínas solúveis. A partir das análises, constatou-se que o extrato de farelo de arroz, obtido conforme as condições de autólise utilizadas neste trabalho, possui $0,643 \pm 0,042$ g/L de nitrogênio Kjeldahl e 8,35 a 8,55 g/L de proteínas solúveis.

A temperatura (121°C) e a pressão (1 atm) utilizadas para o procedimento de autólise do farelo de arroz permitiram a obtenção de um extrato proteico, assim como verificado nos estudos de Martiniano *et al.* (2014) e Milessi *et al.* (2013). Além disso, a ausência da adição de ácidos ou álcalis no processo reduz consideravelmente a extração de outros componentes desta biomassa amilácea, como lignina e açúcares, e diminui os custos do processo e a geração de resíduos prejudiciais ao meio ambiente. Essas observações estão em concordância com os resultados apresentados por Pourali, Asghari e Yoshida (2009).

No referido estudo, foi avaliada a composição das fases solúveis em hexano, acetona e água da fração líquida proveniente do tratamento do farelo de arroz com água subcrítica (variação de temperatura entre 100 e 360°C). Pourali, Asghari e Yoshida (2009) identificaram que, no extrato aquoso, diferentes biomoléculas predominam em diferentes faixas de temperatura: aminoácidos são liberados entre 100 e 150°C, carboidratos entre 150 e 200°C, enquanto que na faixa entre 200 e 300°C predominam os ácidos orgânicos. As frações em hexano e acetona (nas quais se encontrariam os lipídeos) aumentaram a partir de 200°C. Uma vez que, no presente trabalho, realizou-se uma autólise em autoclave (121°C, 1 atm), as condições do procedimento se assemelham àquelas nas quais Pourali, Asghari e Yoshida (2009) observaram a liberação da fração proteica.

A composição da água residual do arroz paraboilizado foi avaliada por Colet *et al.* (2017) para sua utilização como fonte de nutrientes para a produção de carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor*. A concentração de nitrogênio Kjeldahl medida foi de 0,125 g/L, valor cerca de cinco vezes inferior ao aferido no presente estudo. Assim como observado para outras biomassas vegetais, a composição do farelo de arroz pode variar em funções de condições regionais e/ou da variedade de cultivar analisada (ISSARA; RAWDKUEN, 2016; LACERDA *et al.*, 2010).

A Tabela 11 apresenta os nutrientes detectados no extrato de farelo de arroz utilizado no presente trabalho (ICP-OES) em comparação com valores encontrados na literatura.

Tabela 11 - Composição nutricional do extrato de farelo de arroz determinada por Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) e comparação com dados da literatura

Material	K (%)	P (%)	Mg (%)	Na (%)	Fe (ppm)	Zn (ppm)	Ni (ppm)	Ca (ppm)	Cr (ppm)	Cu (ppm)	Mn (ppm)
EFA (presente trabalho)	4,665	1,56	1,865	0,05	<LQ	<LD	<LD	725,61	<LQ	<LQ	<LQ
Água de arroz parboilizado (COLET <i>et al.</i> , 2017)	-	-	0,212	0,0373	8,33	11,59	-	452,28	-	1,23	-
Extrato enzimático proteico de farelo de arroz (PARRADO <i>et al.</i> , 2006)	-	-	0,79	-	-	-	-	599	-	-	-
Extrato aquoso de arroz integral (CARVALHO <i>et al.</i> , 2011)	-	-	1,688	-	0,077	0,018	-	1,203	-	0,018	0,016
Farelo de arroz integral (LIMA <i>et al.</i> , 2000)	-	1,87	-	-	82,65	53,89	-	300	-	4,19	103,46

Fonte: própria autora. Nota: EFA: extrato de farelo de arroz; >LD: leitura abaixo do limite de detecção do equipamento (0,01 mg/L); >LQ: leitura abaixo do limite de quantificação do equipamento (0,1 mg/L). (-): não determinado.

Conforme esperado para a análise composicional de variedades agrícolas, há uma variação nas porcentagens dos principais elementos químicos que compõem o farelo de arroz, sendo ocasionada pela diversidade genética dos exemplares amostrados, por condições de cultivo e fatores geográficos e edafoclimáticos (CHAUD; ARRUDA; FELIPE, 2009; FARIA; BASSINELLO; PENTEADO, 2012). Contudo, verifica-se, tanto no farelo de arroz *in natura* (integral) quanto nos extratos aquosos, a prevalência de alguns elementos, destacando-se o potássio, o fósforo, o magnésio e o cálcio. Tanto a diversidade de nutrientes presentes no farelo de arroz como suas concentrações são fatores relevantes do ponto de vista biotecnológico, pois indicam que esse subproduto agroindustrial pode ser processado de forma a liberar uma grande variedade de nutrientes para o crescimento microbiano e a obtenção de bioprodutos de alto valor agregado, assim como demonstrados pelos estudos de Tsigie *et al.* (2012), Martínez e Santos (2012) e Martiniano *et al.* (2014).

A partir da Tabela 10 se verifica, igualmente, que os processos de extração utilizados pelos autores citados diferem, em termos de eficiência, na capacidade de liberar determinados nutrientes, o que pode ser explicado não apenas pela técnica utilizada, mas também pela composição original da biomassa em análise. Ressalta-se, igualmente, que o farelo de arroz é notoriamente rico em ácido fítico, que, por possuir propriedades quelantes, pode dificultar a liberação de alguns cátions (como ferro, zinco, magnésio e cálcio) (FABIAN; JU, 2011; WATANABE *et al.*, 2015).

Assim como demonstrado nos estudos de Martiniano *et al.* (2014) e Milessi *et al.* (2013), a autólise do farelo de arroz resultou em um extrato com teor proteico (8,35-8,55 g/L) suficiente para sustentar o crescimento de leveduras e a obtenção de bioprodutos. Destaca-se a versatilidade dessa fonte nutricional, que tem sido utilizada em bioprocessos com foco na obtenção de butanol (KAID *et al.*, 2019), bioetanol (CHANDEL *et al.*, 2009), biohidrogênio (AZMAN *et al.*, 2016), xilitol (ACOSTA MARTÍNEZ; APARECIDA; SANTOS, 2012) e óleo microbiano (TSIGIE *et al.*, 2012).

5.3 ESTUDOS PRELIMINARES DE CRESCIMENTO CELULAR E CONSUMO DE AÇÚCARES POR *P. kudriavzevii*

Inicialmente, foram propostos estudos para avaliar o comportamento geral da levedura *P. kudriavzevii* em diferentes condições de cultivo. Nesta sessão, avaliou-se as seguintes fontes de carbono: glicose, xilose, hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar e hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar. Os resultados analisados nestes

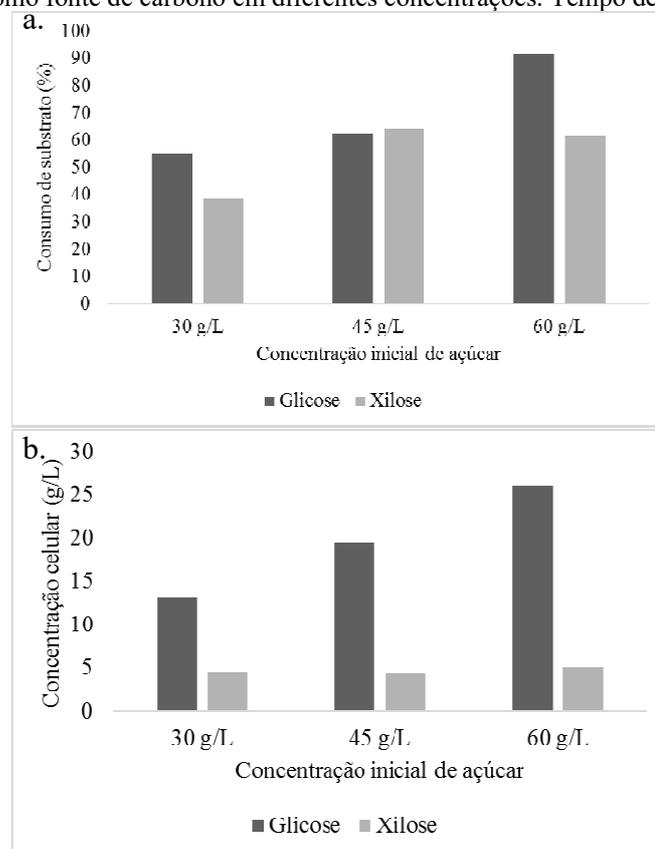
cultivos foram: concentração de açúcares e concentração celular ao longo do tempo e identificação visual da presença de biopigmentos nas células, a qual correspondeu a um estudo qualitativo da produção de biopigmentos.

Os resultados obtidos estão apresentados nos itens 5.3.1, 5.3.2 e 5.3.3 e forneceram subsídios para os experimentos quantitativos de produção de biopigmentos.

5.3.1 Cultivo em meio de cultura complexo (glicose e xilose de origem comercial como fonte de carbono)

A avaliação do comportamento da levedura frente a diferentes fontes de carbono e suas concentrações foi realizada em função de seu crescimento celular e da porcentagem de consumo de açúcares. Meios de cultura complexos foram desenvolvidos com concentrações iniciais de 30 g/L, 45 g/L ou 60 g/L de glicose ou xilose. Os valores máximos de concentração de biomassa celular e o consumo percentual de açúcar estão apresentados na Figura 14.

Figura 14 - a. Consumo de substrato; b. concentração celular máxima (b) da levedura *P. kudriavzevii* utilizando glicose ou xilose como fonte de carbono em diferentes concentrações. Tempo de cultivo: 168h



Fonte: própria autora.

A partir dos resultados apresentados na Figura 14 observa-se, primeiramente, que nenhuma das condições experimentais avaliadas permitiu o esgotamento da fonte de carbono, mesmo após 168h de cultivo. Contudo, nota-se que a levedura apresentou maior capacidade de consumir glicose do que xilose quando os açúcares foram fornecidos nas concentrações de 30 g/L e 60 g/L, além do fato de que o cultivo em 60 g/L de glicose foi a condição que proporcionou a maior porcentagem de consumo (91,68%). Sugere-se que concentrações altas de glicose sejam favoráveis à natureza osmofílica da espécie, sobre a qual Oberoi *et al.* (2012) demonstraram a preservação da capacidade fermentativa da espécie em meio de cultivo contendo 200 g/L de glicose.

Os resultados obtidos em glicose (Figura 14a) evidenciam que, nos ensaios com concentrações iniciais de 30 g/L e 45 g/L, uma fração considerável do açúcar consumido foi convertida em biomassa, pois as porcentagens de consumo foram de 54,99% e 62,41%, respectivamente, e os valores máximos de concentração celular foram de 13,11 g/L no ensaio com 30 g/L e de 19,49 g/L no cultivo com 45 g/L. Comparativamente, o consumo de glicose no ensaio com 60 g/L foi quase que completo e a concentração celular final se aproximou de 30 g/L, o que indica que essa condição propiciou a produção de metabólitos e moléculas de armazenamento, como lipídeos, não quantificados no presente trabalho.

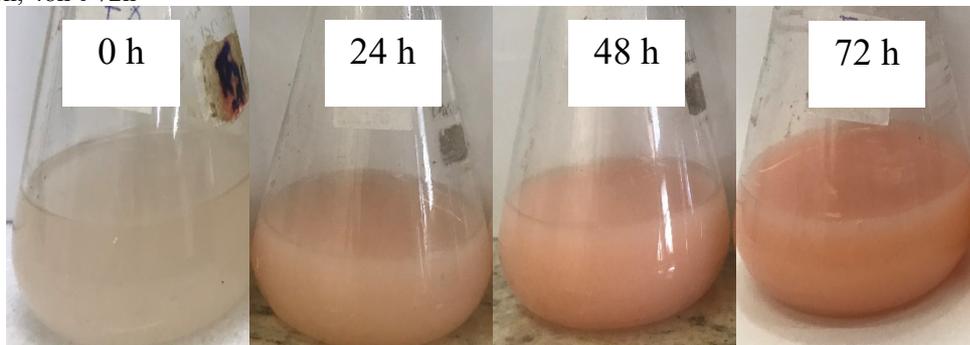
Em relação ao consumo de xilose, os resultados são condizentes com os achados de Marcelino (2016), o qual utilizou a mesma linhagem de levedura para a produção de biossurfactantes. O autor observou que, em um hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar contendo 40 g/L de xilose, a referida linhagem consumiu 28% do açúcar, enquanto que Fonseca (2009) verificou consumo de 11,5% da xilose do mesmo tipo de hidrolisado cuja concentração inicial de açúcar era de 11,3 g/L. Esses dados são indicativos da baixa atividade do metabolismo de pentoses dessa levedura e justificam a reduzida produção de biomassa verificada no presente trabalho (Figura 14b). Aponta-se, também, o fato de alguns autores relatarem a incapacidade de algumas linhagens de *P. kudriavzevii* de assimilar e metabolizar xilose (DÍAZ-NAVA *et al.*, 2017; OBEROI *et al.*, 2012).

Ainda sobre os ensaios realizados em xilose, observa-se que, diferentemente do ocorrido para os cultivos em glicose, o fornecimento de concentrações mais altas de açúcar não resultou em maior acúmulo de biomassa (Figura 14b): os maiores valores de concentração celular foram de 4,60 g/L, 4,45 g/L e 5,06 g/L para as condições com 30 g/L, 45 g/L e 60 g/L de xilose, respectivamente. Esses resultados indicam que o fornecimento desse açúcar como única fonte de carbono pode ter propiciado uma condição de estresse ao

microrganismo que resultou em uma supressão do crescimento celular em favorecimento da síntese de bioprodutos não investigados no presente trabalho. A literatura relata a produção de inúmeros metabólitos por *P. kudriavzevii*, sendo alguns exemplos biossurfactantes (KATEMAI *et al.*, 2008; MARCELINO *et al.*, 2019), enzimas (COSTAS; DEIVE; LONGO, 2004; GREPPI *et al.*, 2015), arabitol e glicerol (DHALIWAL *et al.*, 2011). Ressalta-se, também, a possibilidade de metabolização da fonte de carbono para a produção de biopigmentos.

A avaliação da variação da concentração de açúcares ao longo do tempo de cultivo evidenciou que, de maneira global, a velocidade de consumo deles foi maior nas primeiras 72h de cultivo e, nos intervalos seguintes, observou-se pouca variação. O intervalo de 72h também coincidiu com o final da fase logarítmica de crescimento celular e, visualmente, com o aparecimento da coloração alaranjada na biomassa celular (Figura 15), não sendo observada variação de coloração até o final do cultivo. Tal observação é um indicativo de que a produção de biopigmentos por *P. kudriavzevii* se dá, principalmente, no final da fase exponencial de crescimento celular.

Figura 15 - Coloração do cultivo de *P. kudriavzevii* em glicose de origem comercial (60 g/L), nos intervalos de 0h, 24h, 48h e 72h



Fonte: própria autora.

Considerando-se que os biopigmentos produzidos por *P. kudriavzevii* são metabólitos intracelulares, o acúmulo de biomassa é um fator fundamental para a produção biotecnológica de tais compostos, pois uma maior produção por volume de meio é interessante para conduzir um bioprocessamento em escalas maiores. O estudo conduzido por Yehia *et al.* (2013), por exemplo, evidenciou que a condição mais favorável para a produtividade volumétrica e acúmulo de carotenoides celulares por *R. glutinis* foi a mesma na qual se registrou os valores mais expressivos de densidade celular e massa celular seca.

De acordo com Heer e Sharma (2017) e com El-Banna, El-Razek e El-Mahdy (2012), a concentração e o tipo de fonte de carbono são variáveis que influenciam substancialmente a produção de biopigmentos por leveduras. Os autores ressaltam que variar o tipo de substrato utilizado como fonte de carbono pode resultar em modificações na coloração do pellet celular não apenas por alterar a intensidade de cor, mas também por modificar os tipos de pigmentos produzidos pelos microrganismos.

Em uma análise global, considerou-se que a estratégia mais viável para dar continuidade aos estudos da produção de biopigmentos por *P. kudriavzevii* seja a utilização de glicose como a principal fonte de carbono e em concentrações inferiores a 60 g/L. Os cultivos em xilose foram menos promissores para a obtenção de biomassa celular, fator relevante para a obtenção de produtos intracelulares

Conforme observado nos experimentos preliminares, concentrações elevadas de açúcar prolongariam o processo, aumentando seu custo e a chance de contaminação. Uma vez que não se observou intensificação da cor dos cultivos após 72h, acreditou-se não ser necessário o prolongamento da fase estacionária de crescimento celular.

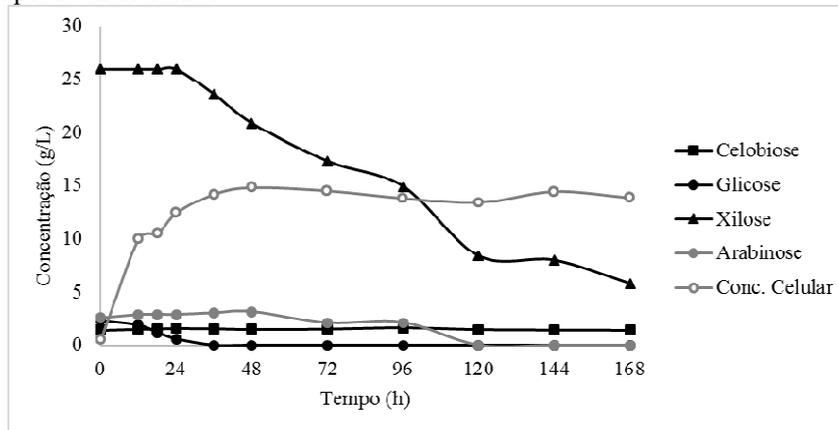
5.3.2 Cultivo em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

Devido à capacidade desta linhagem de *P. kudriavzevii* de metabolizar pentoses e ao fato de que as primeiras observações de sua produção de biopigmentos terem sido em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (MARCELINO, 2016), o potencial de tal substrato para a obtenção de biopigmentos foi avaliado em caráter preliminar. Como suplementação nutricional do hidrolisado, adotou-se o meio de cultivo proposto por Hou-Rui *et al.* (2009), que já havia sido utilizado para essa linhagem (FONSECA, 2009). Um aspecto considerado como favorável da suplementação para esta pesquisa foi a presença de ureia e extrato de levedura, uma vez que alguns autores defendem que fontes orgânicas complexas de nitrogênio podem resultar em maior acúmulo de pigmentos, quando comparadas a fontes inorgânicas (BHOSALE; GADRE, 2001a; EL-BANNA; EL-RAZEK; EL-MAHDY, 2012).

O comportamento da levedura em relação ao consumo de açúcares e ao crescimento celular em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (HHBCA) ao longo das 168h de cultivo está apresentado na Figura 16. Observa-se que a glicose foi rapidamente consumida, esgotando-se em 36h, enquanto que o consumo de xilose se deu

de forma mais intensa após 48 h e, ao fim de 168h, a concentração do açúcar era cerca de 20% de sua concentração inicial.

Figura 16 - Variação nas concentrações de açúcares e do crescimento celular de *P. kudriavzevii* em HHBCA ao longo do tempo. 168h de cultivo



Fonte: própria autora. Nota: HHBCA: hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Embora o cultivo em hidrolisado hemicelulósico não tenha permitido o consumo total de xilose, a porcentagem de consumo da pentose registrada no presente trabalho (77,77%) foi considerada satisfatória em relação a estudos previamente elaborados com a mesma levedura. Ao cultivar *P. kudriavzevii* no mesmo tipo de hidrolisado e com a mesma suplementação nutricional, Fonseca (2009) observou diferentes comportamentos da levedura em hidrolisado hemicelulósico não concentrado e concentrado cinco vezes, porém, mesmo em uma baixa concentração inicial de xilose (11,3 g/L), o consumo desse açúcar foi de 11,5%. Tais resultados indicam a necessidade do estudo de condições de cultivo mais favoráveis ao metabolismo de pentoses por esse microrganismo.

Ao observar, na Figura 16, a variação da concentração de arabinose e de celobiose ao longo do cultivo, nota-se que, apesar das reduzidas concentrações iniciais desses açúcares, a arabinose foi totalmente consumida após 96h, enquanto que a concentração de celobiose se manteve constante até o final do cultivo. Assim como discutido em relação ao metabolismo de xilose, linhagens diferentes da mesma espécie se comportam de maneira distinta em relação à assimilação e metabolização de diferentes açúcares

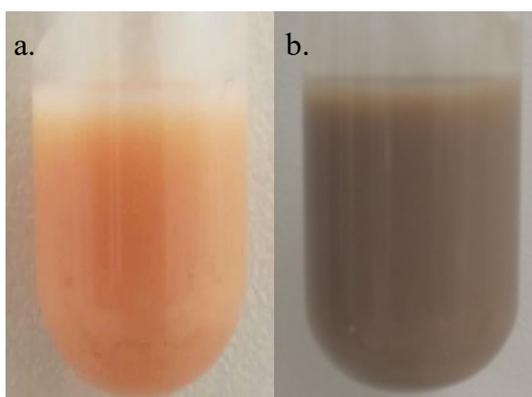
O cultivo de *P. kudriavzevii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar resultou em uma concentração celular máxima de 20,60 g/L. Comparando-se com os resultados obtidos nos meios de cultura complexos, considera-se que o hidrolisado hemicelulósico tenha sido um substrato favorável para o crescimento celular e sugere-se que a presença de outros compostos, além dos açúcares, tenha contribuído para a obtenção

de biomassa por *P. kudriavzevii*, uma vez que exemplos na literatura demonstram a capacidade dessa levedura em assimilar e metabolizar compostos fenólicos, furfurais, ácido acético, ácido ferúlico, siringaldeído e etanol (HOU-RUI *et al.*, 2009; KWON *et al.*, 2011; YUAN; GUO; HWANG, 2017), compostos comumente presentes neste tipo de hidrolisado.

Os resultados obtidos em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar se diferenciaram daqueles em meio complexo não apenas pelo crescimento celular, mas também em relação ao consumo de xilose. No início do cultivo, o hidrolisado suplementado apresentava 25,93 g/L dessa pentose e, em 168h, registrou-se uma porcentagem de consumo de 77,77%. Constata-se, portanto, que o cultivo em hidrolisado hemicelulósico permitiu um melhor aproveitamento dos açúcares em relação aos cultivos em meio complexo: enquanto que o cultivo com 45 g/L de xilose propiciou uma porcentagem de consumo de 64,35%, a levedura consumiu 54,99% da xilose presente no meio com concentração inicial de 30 g/L.

A avaliação qualitativa da produção de biopigmentos por *P. kudriavzevii* no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar foi dificultada pela cor inerente do material (Figura 17). Além de não ter sido observada a coloração alaranjada no meio de cultivo, observou-se que, ao final do processo, o pellet celular possuía uma coloração acinzentada que impediu a constatação visual da presença dos biopigmentos na célula.

Figura 17 - Aspecto visual dos cultivos de *P. kudriavzevii* em meio complexo baseado em glicose (a) e em HHBCA (b)



Fonte: própria autora. Nota: HHBCA: hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Ao estudar o comportamento da mesma levedura no mesmo tipo de hidrolisado, Fonseca (2009) relatou a formação de um precipitado de coloração escura ao longo do cultivo que se depositou junto ao pellet de biomassa celular após a centrifugação,

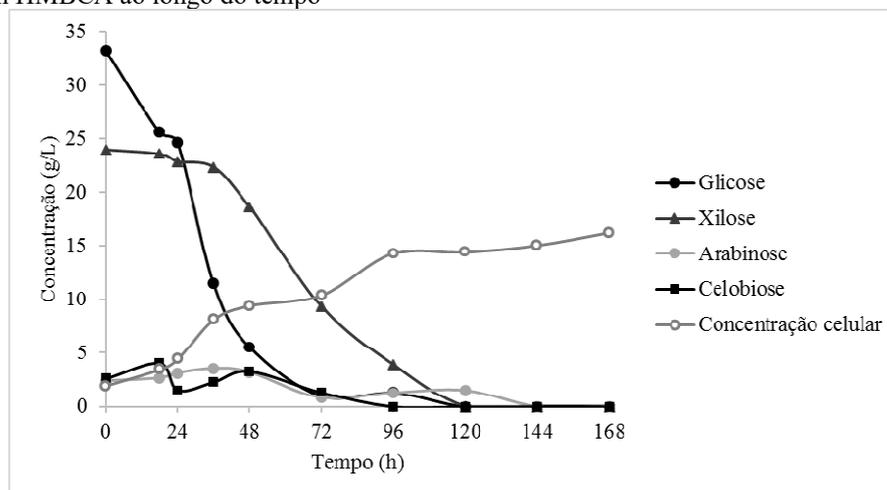
interferindo nas análises espectrofotométricas. Infere-se que o mesmo fenômeno tenha ocorrido neste trabalho e sugere-se que possa ter sido ocasionado por reações entre compostos do hidrolisado e moléculas a ele incorporadas como suplementação nutricional.

Uma vez que a alteração de cor da biomassa celular de *P. kudriavzevii* por compostos provenientes do HHBCA poderia dificultar as análises do extrato dos biopigmentos intracelulares produzidos por essa levedura, optou-se por descontinuar os estudos envolvendo a utilização desse hidrolisado. De qualquer forma, parte dos açúcares de cinco carbonos puderam ser aproveitados no hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar.

5.3.3 Cultivo em hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar

Assim como avaliado no cultivo em hidrolisado hemicelulósico, o crescimento celular e o consumo de açúcares por *P. kudriavzevii*, quando cultivada em hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar (HMBCA), foram registrados ao longo de 168h de cultivo. Os resultados estão apresentados na Figura 18.

Figura 18 - Variação nas concentrações de açúcares e do crescimento celular de *P. kudriavzevii* em cultivo submerso em HMBCA ao longo do tempo



Fonte: própria autora. Nota: HMBCA: hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar.

A partir da Figura 18, constata-se que este meio de cultivo propiciou melhor aproveitamento dos açúcares do que nos experimentos anteriores, uma vez que a levedura foi capaz de consumir 100% da glicose e da xilose presentes no meio. Além disso, observa-se que o consumo de xilose aumentou expressivamente quando a concentração de glicose atingiu cerca de 5 g/L (a partir das 48h de cultivo), ocasionando o crescimento

diáuxico do microrganismo (YOUNG; LEE; ALPER, 2010). O estudo preliminar em HHBCA também evidenciou o aumento do consumo de xilose após o esgotamento da glicose.

A Figura 18 apresenta outra informação de destaque: verifica-se que ocorreu, igualmente, o consumo completo dos açúcares presentes em baixas concentrações (arabinose e celobiose). O mesmo fenômeno não ocorreu no cultivo da levedura em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, pois, nesse meio, a celobiose não foi consumida.

Como interpretação dessa diferença metabólica, sugere-se que a repressão catabólica propiciada pela glicose tenha influenciado o processo em HMBCA, uma vez que a celobiose se esgotou apenas após o consumo total desta hexose; considera-se também que uma maior concentração de glicose no meio (comparando-se os dois hidrolisados avaliados) possa ter favorecido, de forma global, o metabolismo da levedura, resultando na habilidade de consumir a celobiose. Em relação à levedura *Spathaspora passalidarum*, Long *et al.* (2012) verificaram que, em um cultivo contendo glicose, xilose e celobiose, o microrganismo foi capaz de cofermentar celobiose e xilose após a depleção da glicose, permitindo inferir que um fenômeno semelhante possa ter ocorrido com *P. kudriavzevii* neste estudo.

Ademais, vale lembrar que o cultivo em hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar foi realizado com 300 rpm de agitação e com concentração inicial de células de 2 g/L, enquanto que os experimentos anteriores foram realizados com 250 rpm e concentração inicial de células de 0,5 g/L, podendo-se considerar, portanto, que o incremento da velocidade de agitação e da concentração do inóculo tenham sido favoráveis ao metabolismo da levedura e permitiram maior consumo de substratos. Embasamento para tal hipótese são os estudos de Freer (1991) e de Freer e Greene (1990), os quais identificaram uma possível relação entre o metabolismo de celodextrinas e aeração em algumas espécies de leveduras.

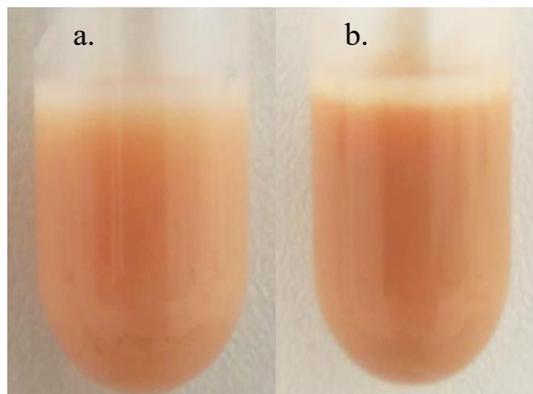
Ao analisar a literatura pertinente à produção de carotenoides por leveduras, percebeu-se que alguns trabalhos fazem uso de concentrações iniciais de células entre 2% e 10% (FREITAS *et al.*, 2014; HUSSEINY *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2019). Observou-se, igualmente, que taxas de aeração elevadas tendem a favorecer a carotenogênese por leveduras.

O crescimento celular em hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar atingiu seu valor máximo em 96h de cultivo: 16,2 g/L. Considerando-se que a soma dos principais açúcares presentes no HMBCA suplementado no início do cultivo era de, aproximadamente, 44 g/L, verificou-se que o comportamento cinético de *P. kudriavzevii* neste meio de foi semelhante àquele observado em meio complexo contendo 45 g/L de glicose de origem comercial. Tais resultados são de grande importância para esta pesquisa, uma vez que indicam a viabilidade do emprego desse substrato de baixo custo para a obtenção de biomassa celular e de bioprodutos utilizando essa levedura.

Hidrolisados ricos em glicose de diferentes biomassas vegetais têm sido avaliados para a produção de etanol por *P. kudriavzevii* (CHAMNIPA *et al.*, 2018; KWON *et al.*, 2011; OBEROI *et al.*, 2012; PHONG *et al.*, 2019; YUANGSAARD *et al.*, 2013), demonstrando a exequibilidade de bioprocessos nesse tipo de substrato com a levedura em questão. Enquanto que alguns desses estudos verificaram a incapacidade da espécie em utilizar pentoses como substratos (acarretando em baixo aproveitamento dos açúcares do hidrolisado), o mesmo não ocorre com a linhagem utilizada na presente pesquisa e esse fator é relevante por abrir a possibilidade da obtenção de bioprodutos em hidrolisados com concentrações de xilose superiores às utilizadas nos estudos citados, como o hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar empregado neste trabalho.

Em relação à avaliação qualitativa de produção de biopigmentos, verificou-se que o cultivo realizado em hidrolisado enzimático de bagaço de cana-de-açúcar apresentou o mesmo padrão de cor observado nos experimentos em meio complexo e não exibiu a coloração escura do cultivo em hidrolisado hemicelulósico (Figura 19). Essa observação é relevante para o presente estudo, uma vez que a produção biotecnológica de biopigmentos a partir de subprodutos agroindustriais reforça o caráter sustentável desse bioprocessos e evidencia o potencial de inovação do trabalho, uma vez que há poucos registros de produção de biopigmentos por leveduras em hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar.

Figura 19 - Aspecto visual dos cultivos de *P. kudriavzevii* em meio complexo baseado em glicose (a) e em HMBCA (b)



Fonte: própria autora. Nota: HMBCA: hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar.

De acordo com Xiao *et al.* (2014), a viabilidade comercial de um bioprocesso em uma biorrefinaria depende da utilização de substratos de baixo custo e, para isso, são desejáveis microrganismos que: tolerem os inibidores presentes nos hidrolisados e metabolizem os diversos açúcares presentes na biomassa. Nesse contexto, pode-se considerar que a levedura *P. kudriavzevii* é um microrganismo-chave para o desenvolvimento de novos bioprocessos baseados nos princípios da sustentabilidade, da química verde e com potencial de serem levados para a escala industrial, como é o caso da produção biotecnológica de biopigmentos.

Ressalta-se, igualmente, que a característica natural desta espécie de crescer e se manter ativa em temperaturas superiores a 35°C, altas concentrações de sais e possibilidade de produção de uma ampla diversidade de bioprodutos (enzimas, surfactantes, *single cell oil*, etanol, etc.) faz com que *P. kudriavzevii* seja vantajosa para as condições usualmente empregadas em processos industriais.

5.4 EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS BIOPIGMENTOS

Os estudos preliminares de cultivo de *P. kudriavzevii* em diferentes fontes de carbono evidenciaram que a glicose foi um substrato mais favorável para o crescimento celular do que a xilose e, ademais, que a utilização do HMBCA como fonte de carbono foi mais viável para a produção de biopigmentos por esta levedura, uma vez que os resultados obtidos com este substrato se assemelharam àqueles obtidos em HHMBA. Dada estas definições, realizou-se o estudo de técnicas de rompimento celular, extração e caracterização parcial do extrato de biopigmentos.

5.4.1 Estudo de métodos de rompimento celular e de extração dos biopigmentos

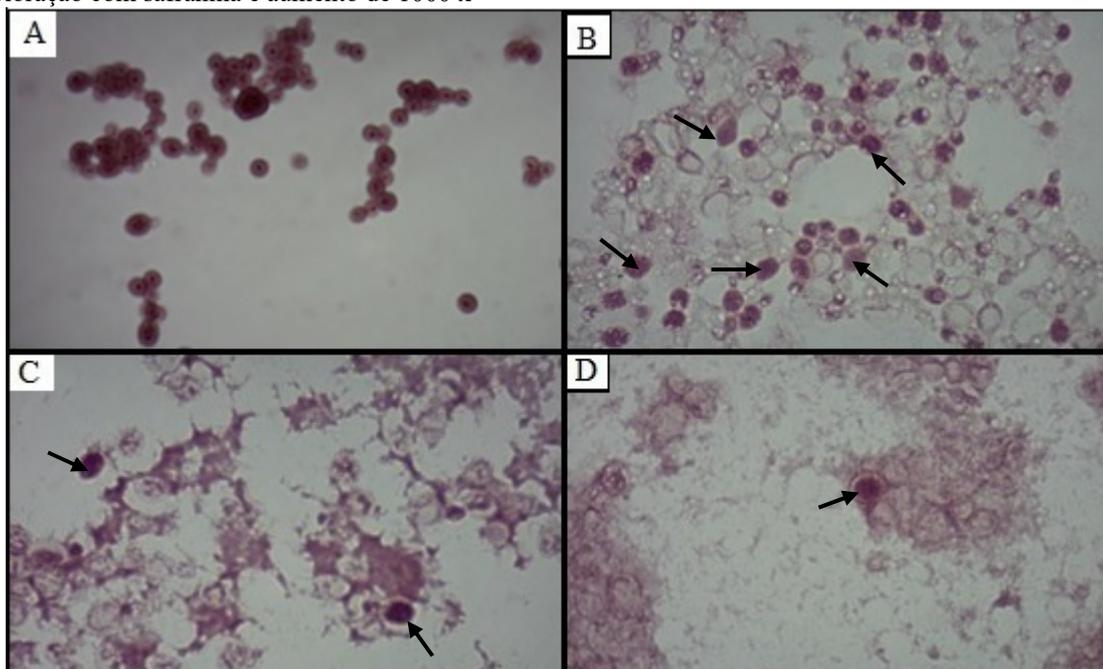
A seleção dos métodos de rompimento celular e de extração dos biopigmentos avaliados no presente trabalho foi fundamentada no custo e na possibilidade de aproveitamento da estrutura já presente no laboratório durante o período da pesquisa. Martiniano (2017), ao produzir leveduras enriquecidas com selênio, realizou a lise celular por meio da utilização de pérolas de vidro, possibilitando a avaliação deste método no presente trabalho.

De acordo com a disponibilidade no departamento, foi igualmente viável a avaliação do rompimento celular a partir do congelamento da levedura com nitrogênio líquido e a subsequente maceração, conforme descrito no estudo de Valduga *et al.* (2009) e Colet *et al.* (2017). A lise celular também foi avaliada por liofilização e maceração ou submentendo-se as células a uma sonda de extração, porém esses métodos foram considerados insatisfatórios.

Em relação aos solventes utilizados na extração, sua escolha foi determinada pelas informações encontradas na literatura. Buscou-se avaliar misturas comumente utilizadas e com polaridades distintas, dado o desconhecimento da natureza dos carotenoides em análise.

Entre os métodos escolhidos, a definição do método mais eficiente para o rompimento das células de *P. kudriavzevii* se deu por base em duas variáveis-resposta: aspecto microscópico das células rompidas e presença de ácidos nucleicos no sobrenadante. Na Figura 20, estão apresentadas micrografias das células de *P. kudriavzevii* íntegras e desintegradas após os diferentes processos de ruptura (N₂ líquido e pérolas de vidro).

Figura 20 - Micrografias de células de *P. kudriavzevii* submetidas a diferentes métodos de rompimento. Coloração com safranina e aumento de 1000 x



Fonte: própria autora. Nota: a) células íntegras; b) congelamento com N₂ líquido seguido de maceração em almofariz; c) agitação em vórtex com 1 g de pérolas de vidro; d) agitação em vórtex com 2 g de pérolas de vidro. Microscópio Nikon E200 e câmera Prime Cam HD Lite 1080p. →: células íntegras.

A avaliação das micrografias apresentadas na Figura 20 evidencia que cada tratamento exerceu um efeito diferente sobre a biomassa celular: comparando com a micrografia A, na qual são apresentadas células íntegras, as micrografias B, C e D retratam um grau crescente de ruptura, o que é perceptível pela redução no número de estruturas ovais com conteúdo densamente preenchido (células íntegras) indicadas pelas setas.

Os métodos de rompimento celular investigados neste trabalho (congelamento com N₂ líquido seguido de maceração e agitação em vórtex com pérolas de vidro) são ambos baseados em forças mecânicas de abrasão, porém o congelamento com nitrogênio líquido seguido de maceração se mostrou desfavorável ao rompimento. Conforme observado na Figura 20, seção B, há um número muito maior de células íntegras do que nas micrografias referentes aos tratamentos com pérolas de vidro (seções C e D), o que pode ser explicado pelo tipo de congelamento efetuado pelo nitrogênio líquido, pois, conforme discutido por Voda *et al.* (2012), o congelamento rápido provoca o crescimento de cristais de gelo dentro das células sem causar danos expressivos à sua estrutura, enquanto que o congelamento lento permite que os cristais cresçam a ponto de atravessar a parede celular, causando seu colapso e desintegração.

Uma correlação negativa entre o congelamento e a eficiência de extração de carotenoides das leveduras *R. mucilaginosa* e *S. pararoseus* também foi identificada no estudo de Lopes *et al.* (2017). De acordo com os autores, fissuras na parede celular causadas pelo congelamento seriam suficientes para ocasionar a perda de conteúdo citoplasmático, fazendo com que o volume celular seja menor do que o das pérolas de vidro ou que as células se tornem pequenas a ponto de não serem atingidas pelas turbulências ocasionadas por dispositivos ultrassônicos. Fonseca *et al.* (2011) verificaram que o congelamento da biomassa de *Phaffia rhodozyma* não exerceu uma influência significativa sobre o processo de extração de astaxantina.

Diferentemente do resultado de ruptura celular obtido com a técnica de congelamento com nitrogênio líquido seguido de maceração, a Figura 20 evidencia que a abrasão das células com pérolas de vidro submetidas à agitação em vórtex deixou um número muito reduzido de células íntegras. O uso de microesferas de vidro ou zircônia como agentes de rompimento celular, tanto para bactérias como para fungos, leveduras e algas, foi eficientemente usado no processamento *downstream* para a obtenção de biopigmentos intracelulares (LIU *et al.*, 2013b; LOPES *et al.*, 2017; SERIVE *et al.*, 2012), portanto o resultado favorável é condizente com relatos anteriores.

Entre os trabalhos que realizaram o rompimento celular com pérolas de vidro, há uma diversidade de relações suspensão celular:pérolas de vidro. Como exemplos, podemos citar: relação 1:1 v/m (DAVOLI; WEBER, 2002), 1:1,5 v/m (RAMANAN; CHUAN LING; ARIFF, 2008) ou 1:2,5 m/m (GECIOVA; BURY; JELEN, 2002). O estudo de Sedmak, Weerasinghe e Jolly (1990), no qual esta pesquisa se baseou, utilizou a proporção 1:1 v/m, porém, devido ao fato de que a levedura em estudo é outra e de que há variadas proporções entre a quantidade de suspensão celular e de pérolas de vidro, optou-se por avaliar mais de uma proporção.

De acordo com as micrografias apresentadas na Figura 20, seções C e D, o uso de 2 g de pérolas para 2 mL de suspensão celular resultou em um número ainda mais reduzido de células íntegras do que o tratamento que fez uso de 1 g para o mesmo volume celular. Uma vez que pigmentos intracelulares se localizam, comumente, em estruturas lipídicas, como a membrana plasmática (MIHALCEA *et al.*, 2015; PARK; KIM; CHU, 2007), considera-se que não seja necessário um rompimento total das células para a extração dessas moléculas. A abertura de fissuras que permitam o contato dos solventes apolares (utilizados para a extração dos biopigmentos) pode ser suficiente.

Além da avaliação morfológica das células após cada procedimento de ruptura, determinou-se a presença de ácidos nucleicos e proteínas no sobrenadante por espectrofotometria, nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm, respectivamente. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 12. Pode-se considerar que ácidos nucleicos e proteínas sejam os principais componentes intracelulares de leveduras e seu extravasamento é uma medida importante da eficiência de métodos de rompimento celular (KAWARSKA *et al.*, 2014).

Tabela 12 - Determinação da presença de ácidos nucleicos (260 nm) e proteínas (280 nm) no sobrenadante obtido após rompimento celular com as diferentes técnicas

Método de rompimento	Comprimento de onda (nm)	
	260	280
Agitação com 1 g de pérolas de vidro	34,92±5,049a	20,72±3,550a
Agitação com 2 g de pérolas de vidro	30,99±2,461a	18,57±0,651a
N ₂ líquido e maceração	6,106±1,485b	2,915±0,423b

Fonte: própria autora. Nota: Valores apresentados: médias±desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Em relação às leituras espectrofotométricas do sobrenadante obtido após os procedimentos de lise celular, verificou-se que, em ambos os comprimentos de onda analisados, todos os tratamentos permitiram o extravasamento de oligonucleotídeos (260 nm) e de proteínas (280 nm) celulares, porém, enquanto os resultados obtidos com pérolas de vidro não diferiram entre si, o rompimento com nitrogênio líquido proporcionou uma menor liberação de ácidos nucleicos ($p \leq 0,05$). Esses resultados corroboram com as observações microscópicas do aspecto da biomassa celular lisada (Figura 20) em que havia um grande número de células íntegras após o tratamento com nitrogênio líquido e um reduzido número destas nos tratamentos com pérolas de vidro.

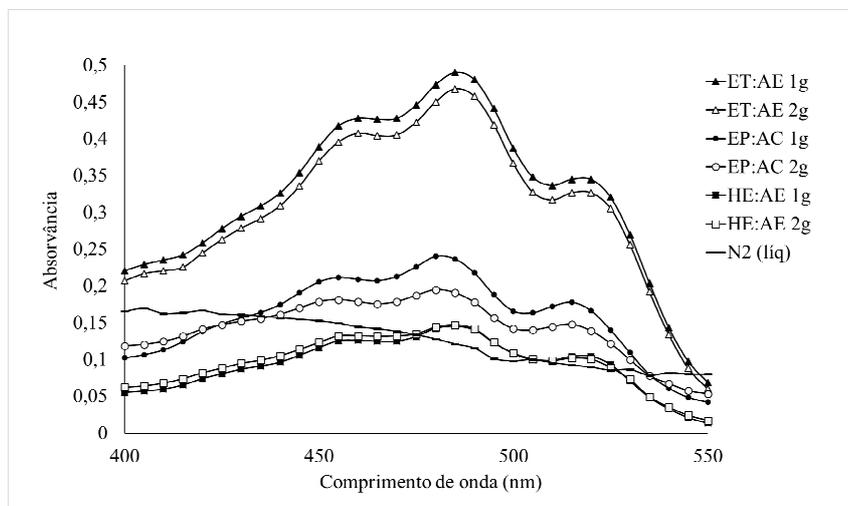
Assim como observado por microscopia óptica (Figura 20), o uso de 1 g ou 2 g de pérolas de vidro se mostrou similar no que diz respeito à liberação de proteínas e ácidos nucleicos ($p \leq 0,05$). Essa observação difere de resultados obtidos por outros autores, segundo os quais um aumento na quantidade de pérolas foi associado a uma maior eficiência de rompimento celular, uma vez que ocorrem mais interações entre as pérolas (GECIOVA; BURY; JELEN, 2002; LIU *et al.*, 2016), contudo a obtenção de resultados semelhantes de rompimento celular com uma quantidade menor de pérolas de vidro foi considerada um fator positivo por reduzir a necessidade do insumo.

A avaliação de diferentes métodos de rompimento da biomassa de *S. cerevisiae* foi realizada por Kawarska *et al.* (2014) e verificou-se que a autólise das células acompanhada de sonicação ou moagem em moinho de bolas resultaram em uma maior liberação de proteínas intracelulares e de material genético do que o tratamento em autoclave; o rompimento por moagem sem a prévia autólise celular também se mostrou eficiente. Esses resultados são concordantes com as observações do presente estudo e reforçam a eficácia de métodos baseados em forças de cisalhamento para a desintegração de células de leveduras.

Uma vez comparados os efeitos dos diferentes métodos de rompimento sobre a integridade celular, verificou-se a eficiência da extração dos biopigmentos com ambas as quantidades de pérolas de vidro previamente testadas. Dado que a ruptura celular efetuada pela maceração das células após congelamento com nitrogênio líquido foi considerada insatisfatória (grande número de células íntegras remanescentes e conteúdo de proteínas e ácidos nucleicos liberados no sobrenadante inferior ao dos demais tratamentos), esse método foi desconsiderado nas próximas etapas.

Para cada tratamento com pérolas de vidro, adicionou-se uma das três misturas de solventes avaliadas: etanol:acetato de etila 1:3, éter de petróleo:acetona 7:3 e hexano:acetato de etila 1:1. Considerando-se que os biopigmentos de *P. kudriavzevii* não foram previamente caracterizados, investigou-se combinações de solventes com polaridades distintas. Os resultados das varreduras espectrofotométricas dos extratos de biopigmentos de *P. kudriavzevii*, no intervalo de comprimento de onda entre 400 nm e 550 nm, estão apresentados na Figura 21.

Figura 21 - Valores de absorvância dos extratos de biopigmentos de *P. kudriavzevii*, obtidos por diferentes metodologias de rompimento celular e extração (λ : 400-550 nm)



Fonte: própria autora. Nota: ET:AE 1g = etanol:acetato de etila 1:3 + 1 g de pérolas de vidro; ET:AE 2g = etanol:acetato de etila 1:3 + 2 g de pérolas de vidro; EP:AC 1g = éter de petróleo:acetona 7:3 + 1 g de pérolas de vidro; EP:AC 2g = éter de petróleo:acetona 7:3 + 2 g de pérolas de vidro; HE:AE 2g = hexano:acetato de etila 1:1 + 2 g de pérolas de vidro; N2 (líq): nitrogênio líquido.

Primeiramente, a varredura evidencia a presença de um pico de absorção principal, entre 482 e 500 nm, e dois picos secundários (457 - 460 nm e 515 - 517 nm). É importante ressaltar que, independentemente da mistura de solventes utilizada, o comportamento espectral das amostras exibiu o mesmo padrão: os picos de absorvância se apresentaram na mesma região, apenas em intensidades diferentes. O fato da variação da absorvância ao longo dos comprimentos de onda ser similar para todas as misturas de solvente avaliadas é um indicativo de que os pigmentos obtidos são, em maior ou menor medida, solúveis nas misturas de solventes avaliadas.

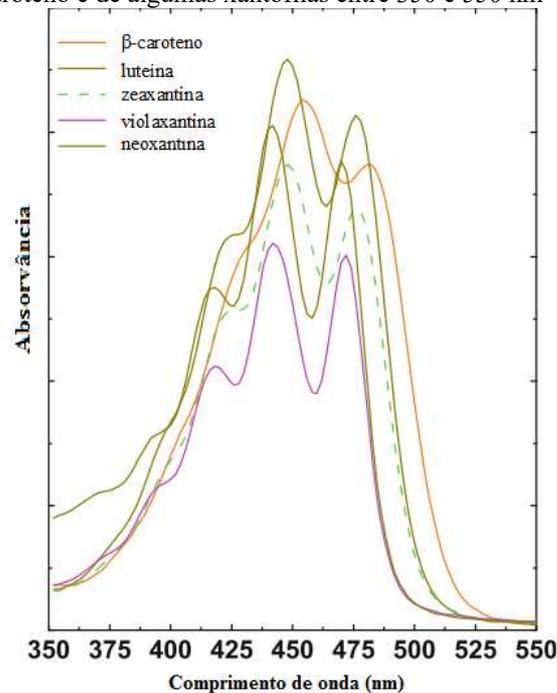
A Figura 21 evidencia que o espectro de absorção na região entre 400 e 550 nm do extrato obtido pelo método envolvendo nitrogênio líquido. Diferentemente dos demais, esse espectro não apresenta picos definidos, o que pode ser devido à baixa concentração de biopigmentos no extrato e/ou à presença de interferentes neste.

Comparando-se o comportamento da absorvância do extrato dos biopigmentos produzidos por *P. kudriavzevii* com o aspecto do espectro dos principais grupos de biopigmentos (prodigiosina, flavonoides, quinonas, policetídeos, carotenoides, fitocromos e citocromos), verifica-se que o padrão apresentado na Figura 21 se assemelha particularmente ao espectro dos carotenoides. De acordo com Weedon (1965), o espectro de carotenoides na região do visível apresenta, em geral, três bandas de absorção, sendo essa descrição compatível com o espectro dos extratos dos biopigmentos de *P. kudriavzevii*

(Figura 21). Ressalta-se, igualmente, que a posição das bandas é proporcional ao número de ligações conjugadas e ao número e tipo de substituintes (SOLOVCHENKO, 2010).

Weedon (1965) também ressalta que as xantofilas (carotenoides oxigenados) não apresentam o típico espectro em três bandas, mas, sim, uma única banda praticamente simétrica ou uma única banda acompanhada de duas inflexões leves em ambos os lados. A Figura 22 apresenta as bandas de absorção de alguns carotenoides na região do espectro entre 350 e 550 nm.

Figura 22 - Espectro do β -caroteno e de algumas xantofilas entre 350 e 550 nm



Fonte: adaptado de Solovchenko (2010).

No presente estudo, verificou-se que os picos dos extratos obtidos com etanol:acetato de etila 1:3 e éter de petróleo:acetona 7:3 coincidiram (489 nm), porém o pico do extrato obtido com hexano:acetato de etila 1:1 foi em 482 nm. Conforme apresentado por Solovchenko (2010), o deslocamento dos picos de absorvância de um carotenoide ocorre de acordo com o solvente e com o conteúdo de água da amostra, sendo que a absorvância de alguns tipos de carotenoides são mais sensíveis do que outros ao tipo de solvente, contudo Lichtenthaler (1987) descreve que a mudança do pico de absorvância nem sempre ocorre ou pode ser de ordem de 0,4 nm a 0,6 nm.

Analisando-se os espectros dos biopigmentos de *P. kudriavzevii* na região entre 400 e 550 nm, verifica-se sua semelhança com o espectro de carotenoides totais produzidos por

leveduras do gênero *Rhodotorula*, havendo similaridade, inclusive, nos comprimentos de onda em que ocorrem os picos de absorvância. De acordo com Maldonade *et al.* (2007), esse gênero produz quatro carotenoides (β -caroteno, γ -caroteno, toruleno e torularrodina) e seus espectros de absorção apresentam picos em 453– 455 nm, 479- 482 nm e 512- 513 nm. Os autores também afirmam que espectros com esse formato são típicos de misturas de carotenoides. Resultados semelhantes foram apresentados por Albuquerque (2015), que, ao avaliar diferentes métodos de extração de carotenoides da levedura *Sporobolomyces ruberrimus*, concluiu que a levedura produz β -caroteno, toruleno e torularrodina e que alguns dos extratos obtidos possuíam pico máximo de absorvância entre 485,5 e 489 nm.

A Figura 21 também evidencia que a mistura etanol:acetato de etila 1:3 foi a que proporcionou o valor mais alto de absorvância no comprimento de onda de 489 nm, a medida obtida com a mistura éter de petróleo:acetona 7:3 foi intermediária às demais e cerca de metade do valor obtido com etanol e acetato de etila. A mistura hexano:acetato de etila 1:1, por outro lado, resultou nos menores valores de absorvância. Os valores de absorvância obtidos com cada uma das misturas em 489 nm estão apresentados na Tabela 13, assim como a produção específica de biopigmentos por unidade de biomassa celular.

Tabela 13 - Comparação entre os resultados de absorvância a 489 nm e de produção específica (UA/ g de biomassa) de biopigmentos por *P. kudriavzevii*

Tratamento	Abs ₄₈₉	UA ₄₈₉ / g de biomassa
Etanol:acetato de etila 1:3 + 1 g de pérolas de vidro	0,490±0,088a	4,083±0,735a
Etanol:acetato de etila 1:3 + 2 g de pérolas de vidro	0,468±0,052a	3,900±0,437a
Éter de petróleo:acetona 7:3 + 1 g de pérolas de vidro	0,237±0,026b	1,972±0,220b
Éter de petróleo:acetona 7:3 + 2 g de pérolas de vidro	0,191±0,095b	1,589±0,794b
Hexano:acetato de etila 1:1 + 1 g de pérolas de vidro	0,145±0,067b	1,208±0,562b
Hexano:acetato de etila 1:1 + 2 g de pérolas de vidro	0,147±0,030b	1,228±0,251b

Fonte: própria autora. Nota: Valores apresentados: médias±desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Em concordância com os demais resultados apresentados nesta seção, os dados apresentados na Tabela 13 evidenciam que a massa de pérolas de vidro utilizada para a ruptura celular não exerceu um efeito significativo na extração de biopigmentos. Dado que os resultados obtidos por microscopia e por avaliação da presença de componentes

intracelulares no sobrenadante apontam para a mesma resposta, optou-se por realizar as etapas futuras do trabalho com 1 g de pérolas de vidro.

No que diz respeito às misturas de solventes utilizadas, a mistura etanol:acetato de etila 1:3 foi superior às demais nas duas respostas avaliadas (absorvância em 489 nm e produção específica de biopigmentos por unidade de biomassa celular). Os valores de absorvância e de produção específica de biopigmentos obtidos com as demais misturas extratoras não diferiram entre si ($p \leq 0,05$).

De acordo com Lichtenthaler (1987), a dissolução de um carotenoide em diferentes solventes pode provocar mudanças na absorvância em um dado comprimento de onda pela formação de cristais em solventes pelos quais o pigmento tem baixa afinidade. Sendo assim, acredita-se que as variações na absorvância e na produção dos biopigmentos em estudos podem ser interpretadas como maior ou menor afinidade do biopigmento pelos solventes utilizados, uma vez que todos os ensaios foram realizados com a mesma suspensão celular e na mesma concentração (60 g/L).

O extrato de biopigmentos foi obtido por centrifugação da biomassa rompida adicionada da mistura de solventes. Diferentemente do observado para as células rompidas com nitrogênio líquido (em que o sobrenadante contendo os pigmentos era líquido e translúcido), o sobrenadante obtido após centrifugação das células lisadas com pérolas de vidro se apresentou como um gel opaco, o qual foi transferido para tubos de microcentrífuga para a realização de novas centrifugações até que todo o pigmento migrasse para a fração líquida apolar. O aspecto do sobrenadante após a primeira centrifugação está apresentado na Figura 23.

Figura 23 - Sobrenadante com aspecto gelificado e contendo os biopigmentos extraídos



Fonte: própria autora.

Métodos mecânicos de rompimento celular, como a abrasão por pérolas de vidro, são notoriamente conhecidos por produzir fragmentos celulares de tamanho muito reduzido, o que dificulta o processamento *downstream* do produto de interesse (ISLAM; ARYASOMAYAJULA; SELVAGANAPATHY, 2017; LIU *et al.*, 2016). Com adição de sulfato de sódio anidro e centrifugação do gel a 10.000 rpm, foi possível obter um extrato bruto de biopigmentos livre de água, translúcido e alaranjado (Figura 24).

Figura 24 - Extrato bruto de biopigmentos produzidos por *P. kudriavzevii*

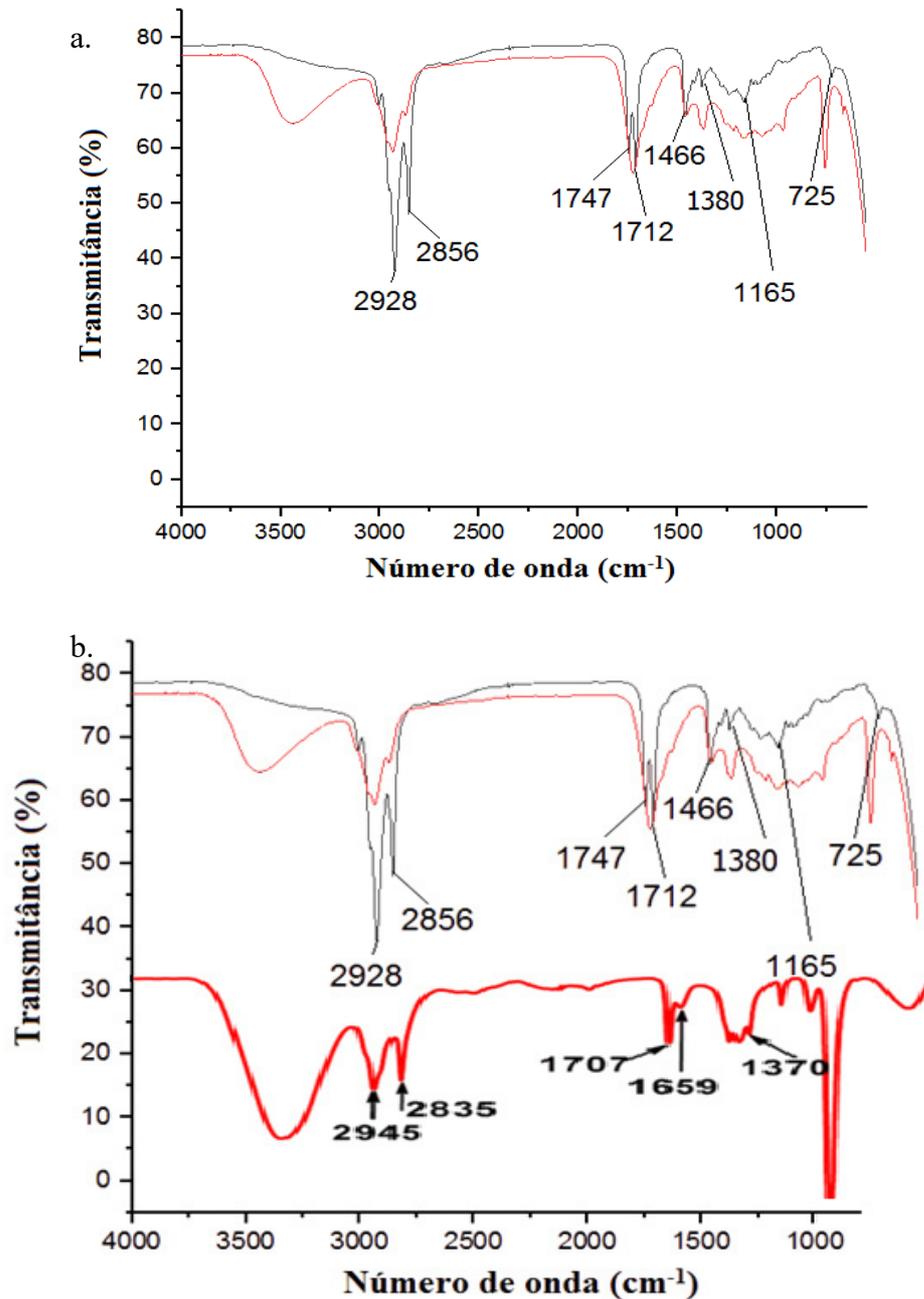


Fonte: própria autora.

5.4.2 Caracterização do extrato de biopigmentos por FT-IR

A identificação de grupos orgânicos presentes no extrato de biopigmentos de *P. kudriavzevii* foi realizada em comparação com o espectro na região do infravermelho do β -caroteno padrão e com espectros na região do infravermelho de outros carotenoides apresentados na literatura. No âmbito do presente trabalho, o espectro da amostra foi plotado em conjunto com o espectro do β -caroteno padrão (Sigma-Aldich). Os resultados obtidos por FTIR estão apresentados na Figura 25.

Figura 25 – a. Espectro de absorção na região do infravermelho do extrato de biopigmentos de *P. kudriavzevii* e do β -caroteno padrão (Sigma-Aldich); b. Justaposição do espectro de absorção na região do infravermelho obtido no presente trabalho e do espectro de absorção na região do infravermelho (ATR-FTIR) do carotenoide torularodina produzido pela levedura *Rhodotorula rubra*.



Fonte: a. própria autora; b. adaptado de Ungureanu *et al.* (2016). Nota: Linha preta: extrato de *P. kudriavzevii*; linha vermelha: β -caroteno padrão.

Para as regiões de destaque apresentadas na Figura 24, foram consideradas aquelas referentes a grupamentos funcionais, vibrações e picos. Os valores das principais bandas identificadas estão resumidos na Tabela 14.

Tabela 14 - Bandas ou picos do espectro no infravermelho referentes a grupamentos químicos ou vibrações do extrato de biopigmentos de *P. kudriavzevii* e do do β -caroteno padrão (Sigma-Aldich)

Banda/Pico	Grupo funcional/vibração
1165 cm^{-1}	Dobramento para fora do plano da ligação =C-H
1380 cm^{-1}	Pico referente ao anel beta-ionona (deformação angular das ligações C-H de grupos metílicos).
1466 cm^{-1}	Deformações angulares típicas de grupos metilênicos
1712-1747 cm^{-1}	Grupamento C=O
2856 cm^{-1}	Estiramentos simétricos de $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$
2928 cm^{-1}	Estiramentos assimétricos dos alcanos

Fonte: própria autora.

A Figura 25a indica que os espectros na região do infravermelho analisados apresentam ligações conjugadas C=C, evidenciadas por uma banda de baixa intensidade em 1163 cm^{-1} (PÂRLOG, 2011; ROHMAN *et al.*, 2010). Ademais, o estiramento assimétrico dos grupos metilênicos e metílicos (banda de 2846 a 2922 cm^{-1}) pode ser confirmado pela presença de uma banda fraca em 722 cm^{-1} , referente à deformação angular do tipo balanço em grupos metilênicos.

Grupamentos metilênicos também foram identificados no espectro na região do infravermelho do carotenoide cantaxantina produzido pela bactéria *Dietzia maris*, os quais foram identificados na região de 2859,4 cm^{-1} (GOSWAMI; CHAUDHURI; DUTTA, 2015). A presença de ligações $-\text{CH}$ também se destaca no espectro na região do infravermelho do β -caroteno e dos carotenoides produzidos por *Sporidiobolus pararoseus*, identificadas em 2920 cm^{-1} (SAHA *et al.*, 2015).

Manimala e Murugesan (2018) caracterizaram os carotenoides produzidos pelo gênero de leveduras *Sporobolomyces* com a finalidade de propor aplicações desses biopigmentos na indústria alimentícia. De acordo com a análise do espectro na região no infravermelho, os autores identificaram bandas semelhantes àquelas presentes no espectro do extrato de biopigmentos de *P. kudriavzevii*: a banda entre 2862 e 2931 cm^{-1} mostrou estiramentos simétricos ou assimétricos do grupamento $-\text{CH}_3$; em 1366 cm^{-1} , observa-se a deformação simétrica do grupo $-\text{CH}_3$.

O espectro de carotenoides na região do infravermelho foi detalhadamente analisado por Marshall (1998). Conforme essa análise, a banda entre 1100 cm^{-1} e 1350 cm^{-1} diz respeito à deformação angular em conjunto com o estiramento dos grupamentos C=C e C-C. Os anéis β -ionona, por sua vez, dão origem a bandas nas regiões de 1250, 1360 e 1450 cm^{-1} , coincidindo com vibrações nos grupos metila.

Semelhantemente ao estudo de Marshall (1998), a presença de anéis β -ionona em carotenoides foi identificada no espectro na região do infravermelho correspondente a $1366\text{-}1367\text{ cm}^{-1}$ (KUSHWAHA, K. *et al.*, 2014). De acordo com esses autores, as vibrações ocorrem nessa região por causa da ligação simétrica C-H ou CH_3 . A partir das análises realizadas por Marshall (1998) e por Kushwaha *et al.* (2014), portanto, pode-se atribuir à banda localizada em 1378 cm^{-1} do espectro no infravermelho das amostras apresentadas na Figura 25a vibrações relativas à presença do grupamento β -ionona.

A banda identificada na região entre 1711 cm^{-1} e $1745,4\text{ cm}^{-1}$ pode ser atribuída à presença do grupo carbonila. O aspecto do espectro dos biopigmentos de *P. kudriavzevii* na região entre 400 e 550 nm (Figura 21) pode se relacionar à presença de átomos de oxigênio nessas moléculas, dado que este não apresenta picos nitidamente marcados, mas, sim, um pico acompanhado de duas inflexões em ambos os lados, assemelhando-se, portanto, ao espectro na região do visível de xantofilas (carotenoides oxigenados) (WEEDON, 1965).

Assim como observado no espectro de absorção no infravermelho dos biopigmentos produzidos por *P. kudriavzevii*, o espectro na mesma região da torularodina (Figura 25b) apresenta um pico na região entre 2900 cm^{-1} e 2950 cm^{-1} , o qual foi atribuído ao estiramento assimétrico dos grupos $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_4$. Em 2835 cm^{-1} , os autores identificaram uma banda referente ao estiramento simétrico dos alcanos, que se sugere corresponder à banda de 2856 cm^{-1} no espectro de absorção na região do infravermelho do extrato de biopigmentos de *P. kudriavzevii*.

O pico em 1707 cm^{-1} no espectro da torularodina foi atribuído ao estiramento da ligação C=O de um grupo carboxila livre, o qual pode ser comparável à banda entre 1712 cm^{-1} e 1742 cm^{-1} existente no espectro do extrato de biopigmentos do presente estudo. Vale ressaltar que a torularodina é um carotenoide produzido exclusivamente por fungos e leveduras (KOT *et al.*, 2018).

A análise da presença de grupamentos químicos nos biopigmentos produzidos por *P. kudriavzevii* realizada neste trabalho foi feita com o extrato bruto, utilizando solventes orgânicos para a remoção de compostos liberados a partir das células rompidas e, portanto,

sabe-se que as bandas exibidas pelo seu espectro na região do infravermelho não correspondem, necessariamente, à estrutura dos biopigmentos; lipídeos, fenóis e outras moléculas apolares poderiam estar presentes nesse extrato. Contudo, a similaridade entre o espectro no infravermelho do extrato de pigmentos obtido nessa pesquisa e o espectro do β -caroteno padrão, em conjunto com a coincidência de bandas usualmente atribuídas à carotenoides na literatura e com a presença de bandas relativas a grupos hidrocarbônicos, permitem inferir que os biopigmentos produzidos por *P. kudriavzevii* sejam, de fato, carotenoides.

5.5 ESTUDO DO MEIO NUTRICIONAL E SEUS EFEITOS SOBRE O CRESCIMENTO CELULAR E A PRODUÇÃO DE BIOPIGMENTOS POR *P. kudriavzevii*

Os resultados preliminares obtidos nos cultivos submersos de *P. kudriavzevii* (seções 5.3.1 a 5.3.3) salientaram que a levedura em estudo é capaz de crescer utilizando tanto a glicose como a xilose como fonte de carbono. Ademais, observou-se, qualitativamente, a produção de biopigmentos em todos os cultivos, em meios de cultura complexos ou no hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar.

Apesar do crescimento da levedura em xilose, que a produção de biomassa celular com esse açúcar é reduzida, assim como o aspecto do cultivo com esse açúcar não apresentou a mesma intensidade de cor. Sendo assim, prosseguiu-se com o estudo de modificações nutricionais no meio de cultivo como estratégia para reduzir os custos desse bioprocessamento, fornecendo-se glicose como única ou principal fonte de carbono.

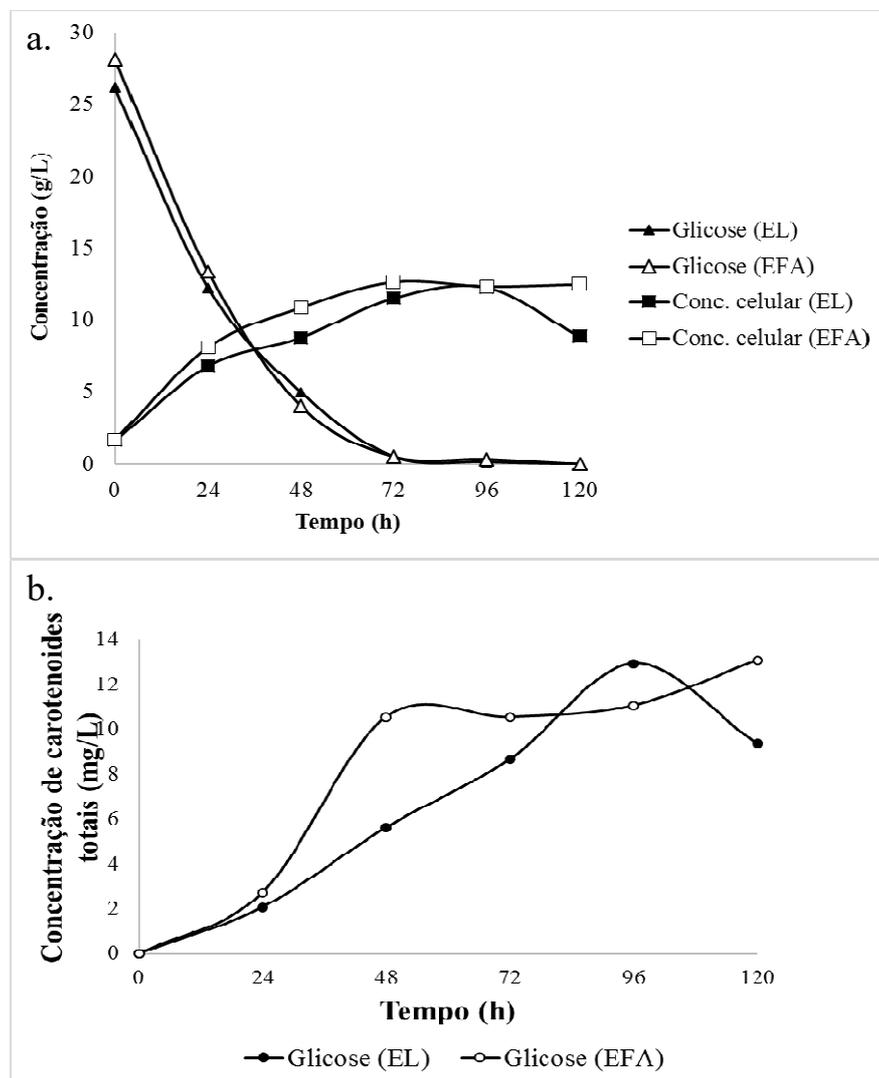
Uma vez definida a metodologia para extração e quantificação dos biopigmentos de *P. kudriavzevii*, a produção destes foi avaliada em quatro meios de cultivo, sendo dois em glicose de origem comercial e dois em hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar, substituindo o extrato de levedura por extrato de farelo de arroz. Os resultados obtidos estão discutidos nas próximas seções.

5.5.1 Estudo da produção de carotenoides em função da modificação da fonte complexa de nitrogênio – cultivos em glicose

Inicialmente, avaliou-se a possibilidade de substituição do extrato de levedura por extrato de farelo de arroz em meio de cultura contendo glicose comercial como fonte de carbono. O meio de cultivo proposto por Hou-Rui *et al.* (2009) foi comparado com sua versão modificada, na qual o extrato de levedura foi substituído por extrato de farelo de

arroz. Efetuou-se, em ambos os meios de cultura, uma alteração do pH inicial para 5,0, de forma que os resultados obtidos fossem comparáveis a estudos conduzidos em hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar, uma vez que esse foi o pH inicial do hidrolisado. Os resultados de consumo de glicose, crescimento celular e produção de carotenoides totais por volume de cultivo estão apresentados na Figura 26.

Figura 26 - a. Variação na concentração de glicose e na produção celular; b. Produção de carotenoides totais por *P. kudriavzevii* utilizando-se extrato de farelo de arroz ou extrato de levedura como fonte complexa de nitrogênio



Fonte: própria autora. Nota: EL extrato de levedura; EFA: extrato de farelo de arroz.

A Figura 26 evidencia que a utilização do extrato de farelo de arroz, em substituição ao extrato de levedura, produziu resultados semelhantes ao cultivo em que se manteve as mesmas fontes de nitrogênio que aquelas propostas por Hou-Rui *et al.* (2009)

(ureia, extrato de levedura e sulfato de amônia). Em ambos os cultivos, a concentração de glicose foi reduzida a menos de 0,5 g/L em um período de 96h e o crescimento celular atingiu um máximo de, aproximadamente, 12 g/L.

Comparando-se os dados obtidos nesse ensaio com os resultados preliminares deste trabalho (Figura 14), verifica-se que a adoção de novas condições fermentativas (300 rpm de agitação e concentração inicial de células de 2 g/L) favoreceu o consumo deste açúcar, pois o esgotamento da fonte de carbono não havia ocorrido nos cultivos anteriores. Assim como descrito na literatura, a velocidade de agitação é um fator-chave na produção de carotenoides, bem como pode intensificar o consumo de glicose (VALDUGA *et al.*, 2011).

Alguns estudos identificam uma relação positiva entre o aumento da agitação e valores mais elevados de produção de carotenoides (AKSU; EREN, 2005; VALDUGA *et al.*, 2009b). É necessário avaliar, contudo, o nível de aeração mais favorável ao processo, uma vez que valores elevados de aeração podem levar à formação de agentes oxidantes, os quais prejudicam o crescimento celular e alteram o padrão de produção de carotenoides (VARMIRA *et al.*, 2018).

No que tange à produção de carotenoides totais por volume de meio de cultivo, a variação temporal nos meios de cultivo com as diferentes fontes complexas de nitrogênio foi semelhante. A produção máxima foi de 12,94 mg/L e 13,07 mg/L nos cultivos com extrato de levedura e extrato de farelo de arroz, respectivamente.

Observou-se, também, que a maior produção de carotenoides totais ocorreu às 96h do cultivo com extrato de levedura e foi reduzida no tempo de 120h: de 12,94 mg/L para 9,5 mg/L. No mesmo intervalo, a produção de carotenoides totais no cultivo com extrato de farelo de arroz (de 11,06 mg/L a 13,07 mg/L). Esse evento pode estar relacionado ao início da fase de morte celular, conforme observado na Figura 26a, e/ou à depleção de alguns nutrientes no meio de cultivo, que pode não ter ocorrido no meio de cultivo com extrato de farelo de arroz dada a complexidade composicional desse material.

A diferença de tempo de cultivo para a obtenção do maior valor de produção de biopigmentos (96h com extrato de levedura e 120h com EFA) refletiu-se na produtividade volumétrica dos cultivos, a qual foi ligeiramente maior com extrato de levedura ((0,13 mg/L)/h) do que no cultivo com EFA ((0,11 mg/L)/h). Considerando-se o custo reduzido do extrato do farelo de arroz, a diferença de produtividade volumétrica não foi considerada como uma desvantagem significativa do uso desse insumo em substituição ao extrato de levedura neste bioprocessos.

Em relação à produção específica de carotenoides totais por unidade de biomassa celular, ambos os cultivos apresentaram o valor de 0,22 mg/g de biomassa seca. Uma vez que a concentração celular dos dois cultivos era semelhante nos intervalos de tempo de máxima produção (12,28 g/L com extrato de levedura e 12,5 g/L com EFA), verificou-se uma relação diretamente proporcional entre a concentração celular e a concentração de carotenoides totais.

Infere-se que a proporcionalidade entre o crescimento celular e a carotenogênese esteja relacionada a condições de cultivo favoráveis, pois esse padrão nem sempre é observado (BRAUNWALD et al., 2013; CHOUDHARI; SINGHAL, 2008). Chanchay et al. (2012), por exemplo, verificaram que, em condições de estresse, o crescimento celular foi inibido, mas a carotenogênese foi intensificada.

A evolução da produção específica de carotenoides por unidade de biomassa celular, por outro lado, foi mais pronunciada no cultivo com farelo de arroz: entre 24e 48h, esta passou de 0,05 a 0,18 mg/g de biomassa seca. No mesmo intervalo temporal, a variação foi de 0,03 a 0,09 mg/g de biomassa no cultivo com extrato de levedura. A partir desses resultados, sugere-se que a carotenogênese tenha sido favorecida pela presença de metais e elementos-traço do extrato de farelo de arroz, conforme apresentado na Tabela 10.

Em relação à produção volumétrica de carotenoides, percebe-se que há uma grande variação entre espécies e processos. Alguns exemplos estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Exemplos de produção volumétrica de carotenoides totais por leveduras cultivadas em cultivo submerso

Levedura	Concentração inicial de açúcares	Produção de carotenoides totais	Referência
<i>R. glutinis</i> MT-5	40 g/L de glicose	60 mg/L	Taskin et al., 2011
<i>R. toruloides</i>	45,95 g/L de glicose	1,33 mg/L	Machado et al., 2019
<i>R. mucilaginosa</i> CCT 7688	70 g/L de melaço de cana-de-açúcar e 3,4 g/L de milhocina	1248.5 µg/L	Rodrigues et al., 2019
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	48 g/L de glicerol e 35,6 g/L de milhocina	950 µg/L	Cipolatti et al., 2019
<i>S. pararoseus</i>	6 g/L de melaço de cana-de-açúcar e 36,5 g/L de milhocina	1310 µg/L	Cipolatti et al., 2019

Fonte: própria autora

Observa-se, a partir da literatura, que a produção de carotenoides varia da ordem de μg a mg/L e a produção pelo mesmo microrganismo pode ser incrementada centenas de vezes com a otimização das condições de cultivo. De qualquer forma, considera-se que a concentração de carotenoides totais mensurada a partir de um extrato bruto de biopigmentos produzidos por *P. kudriavzevii* é satisfatória e se enquadra na faixa de produções obtidas por outras leveduras carotenogênicas.

De acordo com Mata-Gómez *et al.* (2014), a produção específica de carotenoides totais pode ser classificada em baixa (até $100 \mu\text{g/g}$), média (de $101 \mu\text{g/g}$ a $505 \mu\text{g/g}$) e alta (acima de $500 \mu\text{g/g}$). Os resultados máximos de produção específica de carotenoides totais por unidade de biomassa celular obtidos nos cultivos em glicose de *P. kudriavzevii* são próximos a $200 \mu\text{g/g}$ e, apesar da quantificação ter sido realizada com um extrato bruto de carotenoides totais, considera-se que a produção de carotenoides por *P. kudriavzevii* seja relevante do ponto de vista biotecnológico e possa atingir valores mais elevados com a otimização das condições de cultivo.

Considerando-se a alocação da fonte de carbono no cultivo com extrato de levedura, constatou-se que, no tempo correspondente à produção máxima, obteve-se $0,51 \text{ g}$ de carotenoides totais por g de glicose. No meio de cultura com EFA, a conversão foi de $0,46 \text{ mg}$ por g de glicose. Mais uma vez, observa-se similaridade entre os resultados com as diferentes fontes de nitrogênio complexas. Esses resultados apontam para a possibilidade de substituir o extrato de levedura por extrato de farelo de arroz sem modificações expressivas das atividades metabólicas essenciais da levedura em estudo.

Em ambos os cultivos, a produção de biopigmentos teve início na fase exponencial de crescimento e aumentou durante a fase estacionária, porém observa-se, a partir da Figura 26b, que enquanto o cultivo em extrato de levedura propiciou aumento contínuo da produção específica de biopigmentos por unidade de biomassa celular desde seu início, esta aumentou expressivamente a partir das 24h de cultivo no meio com extrato de farelo de arroz. Uma vez que o farelo de arroz é um material de composição complexa (conforme destacado na Tabela 11) e seu extrato não passa pelas etapas de processamento envolvidas no preparo do extrato de levedura, acredita-se que alguns mecanismos de transporte e assimilação dos diversos componentes presentes em seu extrato possam interferir na assimilação das proteínas e aminoácidos solúveis pela levedura, o que resultaria no prolongamento do tempo para que a levedura direcionasse seu metabolismo para a produção de biopigmentos.

Entre 24 e 48h, a concentração de glicose em ambos os meios reduziu cerca de três vezes. No mesmo período, a produção de biopigmentos sofreu sua variação mais expressiva em ambos os meios de cultivo: de 2,07 a 5,62 mg/L e de 2,72 a 10,54 mg/L no cultivo com extrato de levedura e extrato de farelo de arroz, respectivamente. Considerando que a produção de carotenoides é habitualmente favorecida por altas relações C/N (SAENGE *et al.*, 2011), assume-se que a concentração inicial de glicose tenha favorecido a síntese de carotenoides precursores dos demais, os quais prevaleceram e se acumularam ao longo da fase de crescimento estacionária.

Na Figura 26, nota-se que a produção de biopigmentos aumentou mesmo após a estabilização do crescimento celular. A varredura espectrofotométrica na região entre 400 e 550 nm indica que o extrato obtido é composto por uma mistura de carotenoides e esse fator corrobora para explicar a variação da produção de biopigmentos ao longo do tempo. A literatura reporta que leveduras carotenogênicas usualmente produzem mais de um tipo de biopigmento e há casos em que um carotenoide é precursor da próxima molécula (ZOZ *et al.*, 2015).

Em relação à levedura *Rhodotorula glutinis*, por exemplo, observa-se que a espécie produz quatro tipos de carotenoides, sendo que a produção de β -caroteno prevalece na fase de crescimento exponencial, enquanto os demais são sintetizados na fase estacionária (AKSU; EREN, 2005; TKÁČOVÁ *et al.*, 2017). Esse comportamento pode ser uma explicação para a variação na produção de biopigmentos observada na Figura 26, uma vez que é possível mais de um biopigmento estar sendo analisado no comprimento de onda de 489 nm e a prevalência de cada um deles ser diferente em momentos distintos do cultivo.

Ademais, as diferenças na produção de biopigmentos ao longo do tempo apresentadas na Figura 26 podem se relacionar ao fato de mudanças na composição do meio de cultivo poderem promover ou suprimir a síntese de determinados carotenoides, como evidenciado no trabalho de El-Banna, El-Razek e El-Mahdy (2012). Na referida pesquisa, os autores constataram que *R. glutinis* var. *glutinis* produz, proporcionalmente, mais toruleno quando cultivada em meio contendo peptona e mais β -caroteno quando a fonte de nitrogênio é nitrato de amônio. Considerando que os meios de cultivo em estudo possuíam três fontes de nitrogênio (extrato de levedura/extrato de farelo de arroz, ureia e sulfato de amônio) e cada uma delas é metabolizada de forma diferente, é possível que elas tenham contribuído para a alteração do perfil de carotenoides.

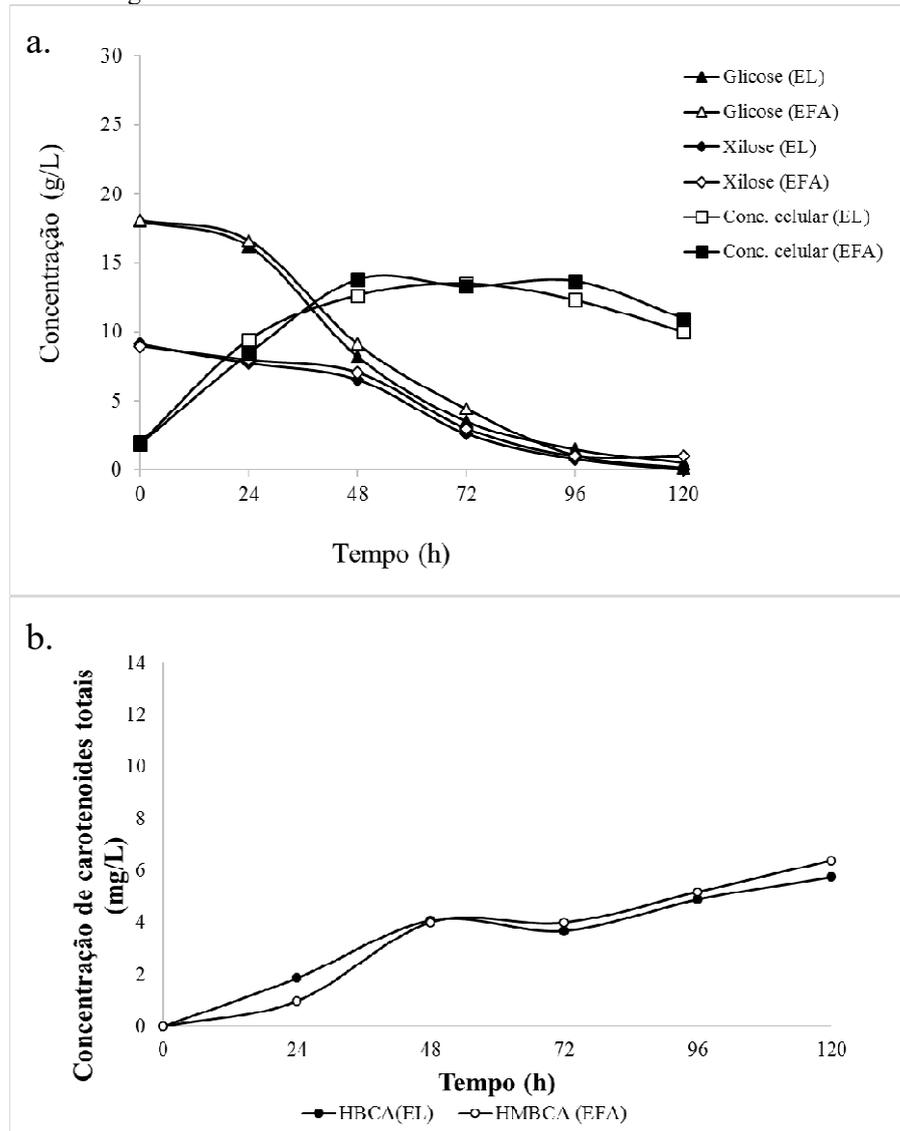
A similaridade dos resultados obtidos com extrato de levedura e com extrato de farelo de arroz é considerada um resultado relevante deste trabalho e favorece a viabilidade econômica do processo biotecnológico de obtenção dessas moléculas, uma vez que o extrato de levedura é um insumo que impacta consideravelmente o custo de um bioprocessamento fermentativo (MILESSI *et al.*, 2013; RODRIGUES; TEIXEIRA; OLIVEIRA, 2006). Ademais, a substituição da fonte de nitrogênio comercial pelo extrato obtido a partir de um subproduto agroindustrial de alta disponibilidade e valor irrisório é uma forma de diminuir o impacto ambiental relacionado ao acúmulo e disposição do farelo de arroz e de conduzir esse bioprocessamento em direção à sustentabilidade.

5.5.2 Estudo da produção de biopigmentos em função da modificação das fontes de carbono e de nitrogênio complexa – cultivos em hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar

Em meios de cultivo baseados em glicose (Figura 26), demonstrou-se que o emprego do extrato de farelo de arroz como fonte de nitrogênio é tão eficiente quanto o emprego de extrato de levedura para a produção de biomassa celular e de biopigmentos por *P. kudriavzevii*. Apesar dos resultados favoráveis, a utilização de glicose de origem comercial ainda representa um custo alto para o desenvolvimento deste bioprocessamento em escalas maiores. Sendo assim, o efeito da substituição dessa fonte de carbono pelo hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar (HMBCA) foi avaliado, bem como a possibilidade de obter biopigmentos utilizando dois insumos provenientes de subprodutos agroindustriais no meio de cultivo, o hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar e o extrato de farelo de arroz (EFA). Os resultados estão apresentados na Figura 27.

Ressalta-se que a condução geral deste trabalho teve como princípio a redução dos custos de obtenção de biopigmentos. Por esse motivo, optou-se por utilizar como fonte de nutrientes extratos e hidrolisados provenientes de subprodutos agroindustriais em suas concentrações originais, ou seja, dispensando etapas de concentração, pois consomem tempo e energia e podem alterar a composição dos materiais.

Figura 27 - a. Variação na concentração de açúcares e no crescimento celular; b. Produção de carotenoides totais por *P. kudriavzevii* utilizando HMBCA como fonte de carbono e EFA ou extrato de levedura como fonte complexa de nitrogênio



Fonte: própria autora. Nota: HMBCA: hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar; EL: extrato de levedura; EFA: extrato de farelo de arroz.

Em relação ao crescimento celular, observa-se, a partir da Figura 27a, que os valores máximos de concentração celular foram próximos àqueles obtidos nos meios em glicose: 12,28 g/L, 12,50 g/L, 12,30 g/L e 13,70 g/L nos meios com glicose e extrato de levedura, glicose e extrato de farelo de arroz, HMBCA e extrato de levedura, e HMBCA e extrato de farelo de arroz, respectivamente. Pode-se dizer, portanto, que, em meio de cultivo no qual a fonte de carbono era o HMBCA, o extrato de farelo de arroz também foi igualmente propício ao crescimento celular desta levedura em relação ao extrato de levedura.

A substituição da glicose de origem comercial pelo HMBCA, contudo, prolongou o tempo de esgotamento da glicose: em 96h, os meios com glicose de origem comercial possuíam menos de 0,5 g/L desse açúcar, enquanto nos meios com HMBCA a concentração era maior do que 1 g/L. Sugere-se que outros compostos presentes no HMBCA, como xilose, celobiose, arabinose e oligômeros, sejam competitivos com a assimilação, transporte e/ou metabolismo da glicose ou, então, que o metabolismo desses outros nutrientes possa diminuir a necessidade de consumo desse açúcar.

Em concordância com os resultados preliminares obtidos em HMBCA (seção 5.3.3), o consumo de xilose foi discreto nas primeiras 48h e se intensificou quando a concentração de glicose se reduziu a, aproximadamente, metade de sua concentração inicial, porém, diferentemente do que foi observado na Figura 18, o crescimento celular não aumentou com o consumo desse açúcar. Uma vez que estudos prévios demonstraram a produção de outros bioprodutos (surfactantes e enzimas) em meio de cultivo contendo xilose (CACHUMBA, 2017; MARCELINO, 2016), é possível que outras rotas metabólicas tenham sido ativadas pelo metabolismo da pentose e desviaram os recursos que seriam utilizados para a produção de biomassa.

Observa-se, também, que a fase de crescimento exponencial teve duração de 48h, ao passo que esta se encerrou após 72h nos cultivos discutidos na seção 5.5.1. A menor duração da fase de crescimento exponencial pode ser atribuída à concentração de glicose presente no HMBCA, cerca de 2/3 daquela presente nos meios de cultivo com glicose de origem comercial e também à dificuldade da levedura em metabolizar a xilose, característica que ficou evidente nos cultivos em meio complexo (seção 5.3.1).

A possibilidade de substituição de uma fonte de carbono de origem comercial por substratos orgânicos de baixo custo e obtidos a partir de fontes renováveis é um passo importante na obtenção de bioprodutos de alto valor agregado. Considera-se que a fonte de carbono possa representar a maior fração do custo de cultivos microbianos (SCHNEIDER *et al.*, 2013) e, uma vez que a síntese de carotenoides é favorecida por altas relações C/N (SAENGE *et al.*, 2011), o crescimento celular e a produção de biopigmentos por *P. kudriavzevii* em meios de cultivo que utilizam fontes de carbono provenientes de um subproduto agroindustrial são considerados resultados promissores no sentido de propiciar a viabilidade econômica da obtenção desses bioprodutos no futuro.

O extrato de levedura é um material complexo que fornece, além de compostos nitrogenados (peptídeos, aminoácidos e ácidos nucleicos), fontes de carbono, vitaminas,

elementos-traço e fragmentos celulares solúveis (CHANCHAY *et al.*, 2012; KLOTZ; KUENZ; PRÜSSE, 2017). No trabalho de Chanchay *et al.* (2012), esta fonte de nitrogênio apresentou um melhor desempenho do que as demais em relação à produção de carotenoides por *R. rubra* e à atividade antioxidante desses pigmentos. Sendo assim, as observações que evidenciam a equivalência entre o extrato de levedura e o extrato de farelo de arroz nos bioprocessos em estudo corroboram a escolha do extrato de farelo de arroz como fonte complexa de nitrogênio para a obtenção de biopigmentos por *P. kudriavzevii*. O desempenho deste nutriente nos ensaios descritos nas seções 5.5.1 e 5.5.2 é atribuído à riqueza nutricional do farelo de arroz e de seu extrato, conforme apresentado na Tabela 10.

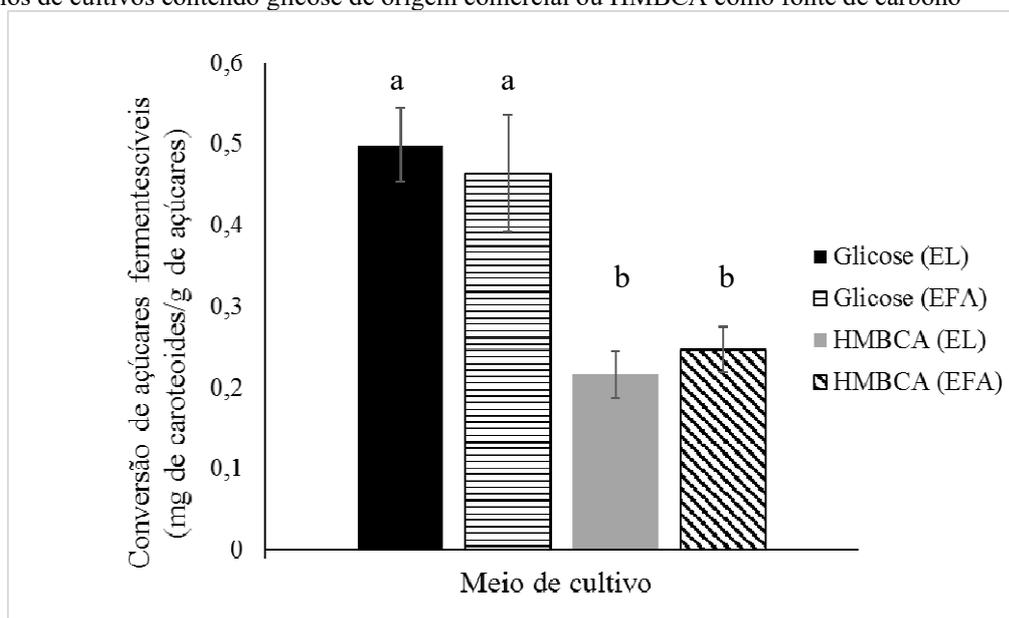
Comparando-se os resultados obtidos nos meios com glicose de origem comercial e aqueles realizados com HMBCA, constata-se que, para ambas as fontes de nitrogênio, a produção de carotenoides totais foi menor nos ensaios com HMBCA: os maiores valores foram de 5,76 mg/L e 6,30 mg/L nos ensaios com extrato de levedura e extrato de farelo de arroz, respectivamente. Ambos os valores de produção foram obtidos em 120h de cultivo.

A maior produção específica de carotenoides totais também foi obtida em 120h e foi de 70,58 µg/g e 106,5 µg/g de biomassa seca nos cultivos com extrato de levedura e extrato de farelo de arroz, respectivamente. Diferentemente do observado para os cultivos contendo glicose de origem comercial como fonte de carbono, a variação temporal da produção específica de carotenoides totais por unidade de biomassa, em ambos os meios de cultivo com HMBCA como fonte de carbono, foi praticamente constante. Sugere-se que o aumento gradual da produção específica seja decorrente da maior complexidade do HMBCA em relação à glicose de origem comercial, uma vez que também se observou uma menor velocidade de consumo de açúcares nos cultivos com essa fonte de carbono.

Em relação à produção específica verificou-se, adicionalmente, que o cultivo contendo extrato de farelo de arroz resultou em um valor mais alto do que o meio com extrato de levedura, indicando, mais uma vez, a viabilidade de seu emprego como fonte complexa de nitrogênio nesse bioprocessos. O maior valor de produção específica pode se relacionar à composição nutricional do EFA (Tabela 11).

Considerando-se a alocação da fonte de carbono para a produção de biopigmentos, os cultivos em glicose de origem comercial e em HMBCA apresentaram resultados distintos de conversão de açúcares fermentescíveis em carotenoides totais. Estes estão apresentados na Figura 28.

Figura 28 - Valores médios e desvio padrão da conversão de açúcares fermentescíveis em carotenoides totais em meios de cultivos contendo glicose de origem comercial ou HMBCA como fonte de carbono



Fonte: própria autora. Nota: Letras iguais representam valores que não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey da diferença mínima significativa ($p \leq 0,05$).

Conforme apresentado na Figura 28, houve uma maior taxa de conversão de açúcares fermentescíveis em carotenoides totais nos cultivos em glicose de origem comercial do que naqueles com HMBCA. O crescimento celular e o consumo de açúcares, no entanto, foram semelhantes em todos os cultivos, o que sugere a interferência de outros fatores na produção de biopigmentos, como a relação C/N e a presença da xilose.

Sabe-se que o metabolismo de pentoses requer a ativação de enzimas não-constitutivas e exige mais da maquinaria celular, o que pode ter dificultado a carotenogênese. Contudo, considera-se que a capacidade de metabolizar a xilose seja uma característica vantajosa dessa linhagem de *P. kudriavzevii*, pois estima-se que apenas 1,5% das leveduras catalogadas sejam capazes de assimilar esta pentose (ANTUNES, 2015).

Dada a versatilidade metabólica da espécie, a assimilação de xilose é de grande serventia no contexto das biorrefinarias, pois estudos apontam para a possibilidade de obtenção de etanol de segunda geração (ELAHI; REHMAN, 2018), ácido xilônico (ALONSO; RENDUELES; DÍAZ, 2014) e biosurfactantes (MARCELINO *et al.*, 2019), a partir de açúcares C5 com essa espécie de levedura. Uma vez que a produção de carotenoides totais foi possível em meio de cultivo baseado em HMBCA, aponta-se para a possibilidade de obter mais de um produto de alto valor agregado a partir do cultivo da mesma levedura.

Apesar do crescimento celular não ter aumentado após o esgotamento da glicose, acredita-se que a xilose tenha exercido um papel na carotenogênese, uma vez que produção de carotenoides totais aumentou entre 96 e 120h (Figura 27b). Sugere-se que o metabolismo da pentose se relacione a condições de estresse metabólico que possam ter favorecido a síntese de carotenoides. Heer e Sharma (2017) relatam que oligossacarídeos, por serem de fácil assimilação e metabolização, são substratos mais favoráveis para a produção microbiana de biopigmentos do que dissacarídeos e, seguindo-se essa linha de pensamento, pode-se considerar uma possível diferença na utilização de diferentes oligossacarídeos sobre a carotenogênese.

Não há muitos estudos que avaliem a utilização de pentoses como fonte de carbono para a produção de biopigmentos por leveduras, o que dificulta maiores elucidções sobre o comportamento da produção de carotenoides totais no bioprocessamento em estudo. O estudo de Yen, Chang e Chang (2015) verificou que o cultivo de *R. glutinis* em xilose foi desfavorável ao acúmulo de lipídeos e, uma vez que as vias metabólicas de síntese de lipídeos e de carotenoides são interligadas, a produção desses biopigmentos pode ter sido igualmente comprometida. Dada a similaridade da rota metabólica da carotenogênese entre as leveduras, sugere-se que o fornecimento de xilose tenha tido um efeito semelhante no metabolismo de *P. kudriavzevii*.

Em leveduras, a via metabólica de produção de carotenoides é dependente da disponibilidade de acetil-CoA, a qual se dá em função da concentração de citrato citosólico (ZHANG *et al.*, 2019). Quando as fontes de nitrogênio são exauridas, ocorre a liberação de amônia por meio da desaminação do AMP, catalisada pela enzima AMP-desaminase.

A redução da concentração de AMP desregula o ciclo do ácido cítrico, pois a enzima isocitrato desidrogenase é dependente deste composto. Desta forma, o citrato é mantido na mitocôndria até atingir uma concentração crítica e ser exportado para o citoplasma, sendo clivado em acetil-CoA e oxalacetato. O acetil-CoA derivado dessa reação desloca o fluxo de carbono para a via do mevalonato (KOT *et al.*, 2016).

De acordo com tal explanação, portanto, sugere-se que os cultivos em glicose tenham permitido um alto consumo das fontes de nitrogênio enquanto ainda havia uma quantidade razoável de carbono no meio, ao passo que, nos cultivos em HMBCA, a levedura deve ter consumido os açúcares sem a utilização completa ou quase completa das fontes de nitrogênio. Pode-se inferir que a condição nutricional propiciada pela utilização

de HMBCA como fonte de carbono desfavoreceu o direcionamento do fluxo de carbono em direção à via do mevalonato.

A utilização da xilose se apresenta como uma vantagem para o desenvolvimento de bioprocessos com a levedura *P. kudriavzevii*, e o emprego do HMBCA como fonte de carbono pode ser considerado uma estratégia viável que permite o aproveitamento desse açúcar e a produção de biopigmento de forma mais vantajosa do que o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, visto que ele não possui compostos de coloração escura que interferem na coloração da biomassa e na extração dos biopigmentos.

5.5.3 Estudo do efeito da modificação da suplementação do hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar

Uma vez que não foram encontrados trabalhos prévios que discorressem sobre a produção de biopigmentos por *P. kudriavzevii*, verificou-se que seriam necessários estudos adicionais que fornecessem informações sobre o papel de diferentes nutrientes na síntese desses metabólitos. Apesar de ter sido verificado nos experimentos apresentados nas seções anteriores que o meio de cultivo proposto por Hou-Rui *et al.* (2009) permite a produção de biopigmentos por *P. kudriavzevii*, levantou-se a hipótese de que nem todos os constituintes do meio seriam necessários e/ou favoráveis para este bioprocessos. Ademais, conjecturou-se que os nutrientes e micronutrientes presentes no extrato de farelo de arroz pudessem ser suficientes para abrir mão do uso de alguns componentes de origem comercial originalmente presentes nesse meio. Dessa forma, procedeu-se um estudo da remoção gradual dos componentes do meio.

Além das fontes de carbono e nitrogênio, o meio de cultivo apresentado por Hou-Rui *et al.* (2009) é constituído dos seguintes nutrientes: K_2HPO_4 (4 g/L), KH_2PO_4 (6 g/L), $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (0,2 g/L). O primeiro estudo (MM1) avaliou a possibilidade de remoção do sulfato de magnésio devido à sua reduzida concentração no meio de cultivo e à presença desse metal no extrato de farelo de arroz.

O segundo meio de cultivo modificado (MM2) foi definido pela remoção de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ e de K_2HPO_4 . O fosfato bibásico de potássio não é usualmente utilizado em cultivos para a produção de carotenoides e, além do mais, o excesso de íons fosfato inibe a atividade da enzima fitoeno sintase, uma das principais da via carotenogênica. A possibilidade de remoção dos dois sais de potássio também foi avaliada (MM3), uma vez

que esses nutrientes também poderiam já estar presentes em quantidades suficientes no extrato de farelo de arroz.

As modificações do meio de cultivo de Hou-Rui *et al.* (2009) também foram realizadas no sentido de avaliar diferenças na produção de carotenoides totais em função do uso de fontes inorgânicas ou orgânicas, simples ou complexas, de nitrogênio. Desse modo, foram definidos meios de cultivo compostos por: a) hidrolisado misto de farelo de cana-de-açúcar, ureia e extrato de farelo de arroz (MM4); b) hidrolisado misto de farelo de cana-de-açúcar, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e extrato de farelo de arroz (MM5); c) apenas hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar e extrato de farelo de arroz (MM6).

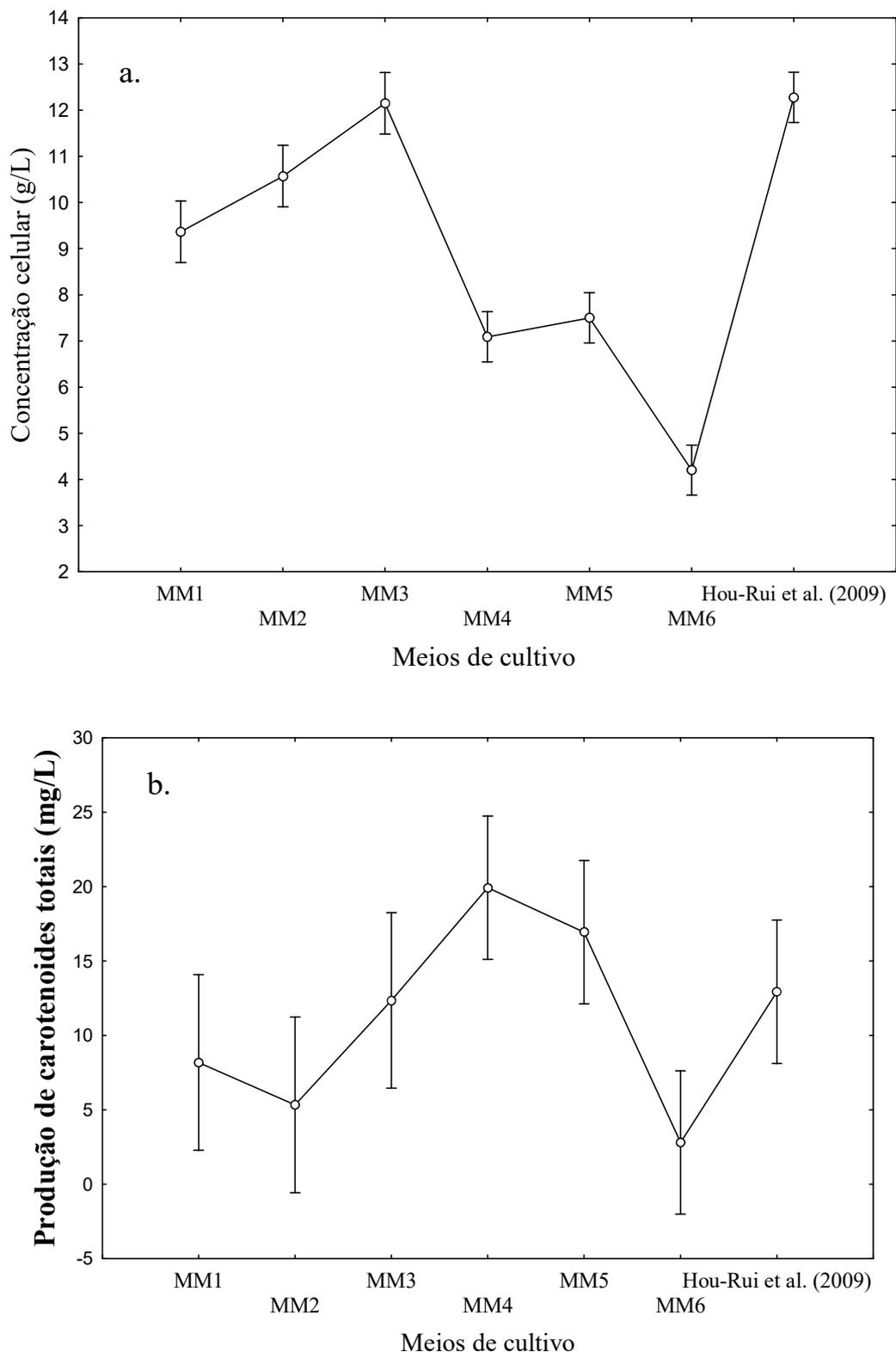
Os estudos sobre o efeito da fonte de nitrogênio complexa (seções 5.5.1 e 5.5.2) identificaram que o extrato de farelo de arroz é adequado como substituto do extrato de levedura. Sendo assim, os ensaios realizados nos meios de cultivo desprovidos de alguns nutrientes foram elaborados com hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono e extrato de farelo de arroz como fonte complexa de nitrogênio, substituindo o extrato de levedura. Os resultados obtidos nos meios de cultura avaliados estão apresentados na Tabela 16 e as diferenças entre eles, considerando-se o intervalo de confiança de 95%, estão apresentadas na Figura 29.

Tabela 16 - Concentração celular, produção e produção específica de carotenoides totais e conversão de açúcares por *P. kudriavzevii* cultivada sob condições de remoção de nutrientes em relação ao meio de cultivo proposto por Hou-Rui *et al.* (2009). Tempo de cultivo: 96h. Valores apresentados: média±desvio padrão.

Meio de cultura	Concentração celular (g/L)	Produção de carotenoides totais (mg/L)	Produção específica de carotenoides totais (mg/g de biomassa seca)	Conversão de açúcares em carotenoides totais (mg de carotenoides/g de açúcares)
Hou-Rui <i>et al.</i> (2009)	12,28±0,56	12,9±1,10	0,22±0,02	0,50±0,05
MM1	9,37±0,33	8,18±8,27	0,14±0,14	0,32±0,01
MM2	10,57±0,09	5,34±0,62	0,09±0,01	0,21±0,12
MM3	12,15±0,35	12,34±7,11	0,21±0,12	0,48±0,04
MM4	7,09±0,72	19,93±2,20	0,33±0,04	0,77±0,06
MM5	7,60±0,15	16,94±3,56	0,28±0,06	0,65±0,03
MM6	4,20±0,16	2,81±0,83	0,09±0,03	-

Fonte: própria autora. Nota: HMBCA: hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar; MM1 (meio modificado 1): ausência de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; MM2 (meio modificado 2): ausência de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e K_2HPO_4 ; MM3 (meio modificado 3): ausência de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 e KH_2PO_4 ; MM4 (meio modificado 4): ausência de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, fosfatos e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; MM5 (meio modificado 5): ausência de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, fosfatos e ureia; MM6 (meio modificado 6): apenas hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar e extrato de farelo de arroz.

Figura 29 - Resultados obtidos em diferentes meios de cultura após 96h de cultivo, apresentados como média±intervalo de confiança de 95%. a. Concentração celular (g/L); b. Produção de biopigmentos (mg/L)



Fonte: própria autora. Nota: Barras verticais: intervalo de confiança de 95%. Valores obtidos a partir do teste de Tukey da diferença mínima significativa.

No que tange ao crescimento celular, observou-se, a partir da Figura 29a, que o meio de cultivo MM6 apresentou um resultado distinto e inferior em relação aos demais

meios, enquanto que os resultados obtidos nos meios de cultivo se distribuíram em grupos homogêneos: MM3 e o meio de Hou-Rui e colaboradores (2009) formam um grupo homogêneo, MM1 e MM2 formam outro, assim como MM4 e MM5 são considerados similares no intervalo de confiança considerado.

Examinando-se o crescimento celular de *P. kudriavzevii* nos diferentes meios de cultivo, verificou-se que o meio utilizado por Hou-Rui *et al.* (2009) e nos estudos preliminares do presente trabalho propiciou um valor de crescimento celular (12,28 g/L) semelhante ao meio de cultivo MM3 (12,15 g/L), considerando-se o intervalo de confiança de 95%. O resultado é promissor para estudos que visem a obtenção de biomassa celular como bioproduto, pois o meio de cultivo MM3 possui dois componentes oriundos de subprodutos agroindustriais (hidrolisado misto de cana-de-açúcar e extrato de farelo de arroz) e três sais inorgânicos de origem comercial (fosfatos e sulfato de magnésio) a menos do que o meio de cultura proposto por Hou-Rui *et al.* (2009). O meio MM3, portanto, não só apresenta custo reduzido em relação ao meio de cultura complexo originalmente utilizado neste trabalho, como também é baseado no aproveitamento sustentável de fontes de carbono renováveis.

Em contrapartida, a remoção de todos os nutrientes inorgânicos e da ureia do meio de cultivo (MM6) resultou em uma condição desfavorável ao crescimento celular, pois, após 96 h de cultivo, a biomassa final no meio foi de 4,20 g/L, um valor duas vezes maior do que a concentração inicial de células. Esse resultado torna evidente que o extrato de farelo de arroz e o hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar nas concentrações utilizadas neste trabalho não fornecem a quantidade de nutrientes necessária para o desempenho das funções metabólicas essenciais de *P. kudriavzevii*.

Quanto à produção de carotenoides totais por volume de cultivo, observou-se a distribuição das amostras em três grupos homogêneos, no intervalo de confiança de 95%: 1) MM4, MM5, MM3, MM1 e meio de cultivo proposto por Hou-Rui *et al.* (2009); 2) MM5, MM3, MM2, MM1 e meio apresentado por Hou-Rui *et al.* (2009); 3) MM1, MM2, MM3, MM6 e meio proposto por Hou-Rui *et al.* (2009). Os meios de cultivo que não compartilham grupos homogêneos são: MM2 e MM4, MM5 e MM6, e MM4 e MM6. Conforme apresentado na Figura 29b, os resultados de produção de carotenoides totais mais distantes entre si são aqueles obtidos nos meios de cultivo MM4 (19,93 mg/L) e MM6 (2,81 mg/L). Os resultados de produção específica de carotenoides totais por unidade

de biomassa se distribuem nos mesmos grupos homogêneos que os resultados de produção de carotenoides totais por volume de meio de cultivo.

De maneira geral, observa-se, a partir da Tabela 16, que a remoção de KH_2PO_4 foi favorável à carotenogênese. Nos meios de cultivo MM1 e MM2, em que o componente estava presente, a produção de carotenoides totais foi de $8,18 \pm 8,27$ e $5,34 \pm 0,62$ mg/L, respectivamente. Nos cultivos MM3, MM4 e MM5 em que esse sal foi removido, os valores de produção foram de $12,34 \pm 7,11$, $19,93 \pm 2,20$ e $16,94 \pm 3,56$ mg/L, respectivamente. O efeito da suplementação com fosfatos é destacado pelas respostas obtidas nos meios de cultivo MM2 e MM3, os quais diferiram apenas pela presença de KH_2PO_4 . Comparando-se os resultados obtidos nestes, o meio MM3, desprovido deste nutriente, apresentou resultados superiores de concentração celular, produção e produção específica por unidade de biomassa de carotenoides totais.

Observações semelhantes em relação à influência desses sais de fosfato foram feitas por Maldonalde, Rodriguez-Amaya e Scamparini (2012). Os autores constataram um efeito negativo entre a adição de KH_2PO_4 e a produção de carotenoides e crescimento celular de *R. mucilaginosa*. No mesmo estudo, foi demonstrado que o sulfato de magnésio foi um nutriente que favoreceu a produção de biomassa, mas desfavoreceu a produção de biopigmentos por *R. mucilaginosa*. No presente trabalho, contudo, não foi possível estabelecer uma relação clara entre o papel desse nutriente no metabolismo celular de *P. kudriavzevii*, provavelmente porque a concentração desse sal no meio de cultura original era pequena (0,2 g/L).

De acordo com Sandmann (2001), a enzima fitoeno sintase, uma das principais da via carotenogênica, depende de Mn^{2+} e de Mg^{2+} para sua atividade, porém sofre inibição por íons fosfato. Essa observação fornece uma possível justificativa para o favorecimento da produção de carotenoides totais com a remoção de K_2HPO_4 e KH_2PO_4 e também permite inferir que a quantidade de magnésio fornecida pelo extrato de farelo de arroz foi suficiente para que o sal inorgânico contendo esse nutriente pudesse ser removido do meio de cultivo sem afetar negativamente o bioprocessamento.

A modificação dos componentes do meio de cultivo também permitiu que se observassem diferenças entre o crescimento celular e a produção de carotenoides totais em função do emprego das diferentes fontes de nitrogênio (Tabela 16). Enquanto que o meio de cultivo que possuía três fontes de nitrogênio (MM3), ureia, sulfato de amônio e extrato de farelo de arroz, foi mais favorável ao crescimento celular do que os meios MM4 e

MM5, estes foram mais propícios para a produção de biopigmentos. A produção de carotenoides totais foi de $12,34 \pm 7,11$ mg/L no MM3 e de $19,93 \pm 2,20$ mg/L e $16,94 \pm 3,56$ mg/L nos meios MM4 e MM5, respectivamente. Observa-se, também, diferença em relação à produção específica de carotenoides totais por unidade de biomassa: $0,21 \pm 0,12$ mg/g, $0,33 \pm 0,04$ mg/g e $0,28 \pm 0,06$ mg/g de biomassa seca nos cultivos MM3, MM4 e MM5, respectivamente.

Alguns estudos indicam que baixas concentrações de fontes de nitrogênio, em particular sulfato de amônio, são favoráveis à síntese de carotenoides e lipídeos por leveduras, pois esse fator pode ser um dos responsáveis para a transição entre o metabolismo primário e secundário (BRAUNWALD *et al.*, 2013; GARBAYO *et al.*, 2003). Por outro lado, valores de concentração de sulfato de amônio superiores a 2 g/L podem resultar em uma redução considerável na produção desses biopigmentos (AKSU; EREN, 2007).

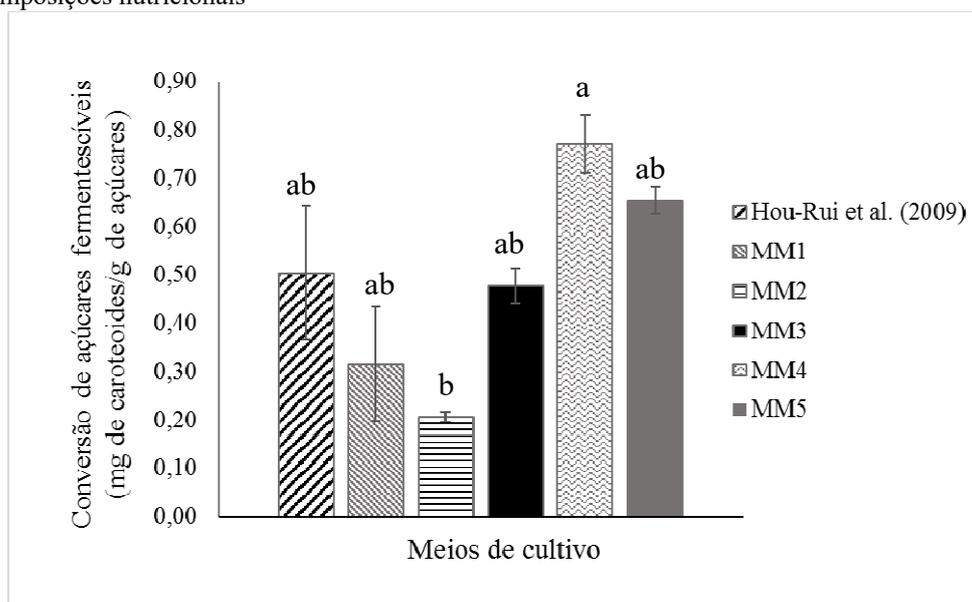
Considerando que o meio MM4 era desprovido deste componente e apresentou o maior resultado em termos absolutos de produção de carotenoides totais ($19,93 \pm 2,2$ mg/L), os resultados obtidos no presente trabalho são coerentes com as observações de Aksu e Eren (2007). Os resultados obtidos nesse meio de cultivo permitem inferir que o extrato de farelo de arroz possa ter deslocado o fluxo de carbono em direção à carotenogênese da mesma forma que teria ocorrido com o sulfato de amônio.

Conforme apresentado na Figura 29, a produção de carotenoides totais no meio de cultivo MM6 se distribuiu no mesmo grupo homogêneo que os resultados dos meios MM1, MM2, MM3 e o meio de cultivo proposto por Hou-Rui *et al.* (2009). Contudo, a produção celular neste meio foi muito reduzida, assim como a produção de carotenoides totais. Sugere-se que a reduzida composição desse meio (apenas hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar e extrato de farelo de arroz) tenha resultado em uma deficiência nutricional que impediu a levedura de exercer as reações metabólicas necessárias para a manutenção das atividades celulares básicas. Considerando que as células de *P. kudriavzevii* possuem pigmentos quando crescidas em placas de Petri (Figura 11) e que inóculo dos cultivos submersos já é pigmentado, acredita-se que parte da produção específica de carotenoides totais identificada após 96h de cultivo nesse meio ($0,09$ mg/g de biomassa seca) tenha ocorrido durante a ativação das células, preliminarmente ao cultivo nesse meio.

Como parâmetro de comparação com os cultivos realizados em glicose de origem comercial e no HMBCA com a suplementação de nutrientes proposta por Hou-Rui *et al.*

(2009) (seções 5.5.1 e 5.5.2), a conversão de açúcares fermentescíveis também foi avaliada nos cultivos discutidos na presente seção, com exceção dos resultados obtidos no MM6, uma vez que se considerou esse meio de cultivo como inviável para o crescimento celular e a produção de biopigmentos pela levedura *P. kudriavzevii* nas condições estudadas. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 30.

Figura 30 - Valores médios e desvio padrão da conversão de açúcares fermentescíveis em carotenoides totais em meios de cultivos contendo HMBCA como fonte de carbono, EFA como fonte de nitrogênio complexa e diferentes composições nutricionais



Fonte: própria autora. Nota: HMBCA: hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar; EFA: extrato de farelo de arroz; MM1 (meio modificado 1): ausência de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; MM2 (meio modificado 2): ausência de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e K_2HPO_4 ; MM3 (meio modificado 3): ausência de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, K_2HPO_4 e KH_2PO_4 ; MM4 (meio modificado 4): ausência de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, fosfatos e $(NH_4)_2SO_4$; MM5 (meio modificado 5): ausência de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, fosfatos e ureia. Letras iguais representam valores que não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey da diferença mínima significativa ($p \leq 0,1$).

A partir da Figura 30, observa-se que o meio de cultivo MM4 proporcionou uma taxa de conversão de açúcares fermentescíveis em massa de produto superior ao MM2, enquanto os demais resultados não diferiram entre si ($p \leq 0,1$). Esses resultados indicam que o metabolismo celular e a carotenogênese sofrem modificações em função dos componentes orgânicos e inorgânicos do meio de cultivo. Acredita-se que a influência dos nutrientes esteja relacionada tanto à relação C/N quanto à presença de íons específicos que atuam como cofatores de enzimas ou, até mesmo, ao estabelecimento de condições de estresse ambiental em virtude da carência ou excesso de determinados elementos.

Correlacionando-se a produção e a produção específica de carotenoides totais com o crescimento celular nos diferentes ensaios apresentados na Tabela 16, nota-se que

maiores valores de biomassa celular ao fim do processo não correspondem a maior produção de biopigmentos, ou seja, há condições de cultivo que propiciam maior quantidade de biopigmentos intracelulares em vez da formação de um número maior de células com uma quantidade menor de biopigmentos por unidade de biomassa celular. Tal fenômeno é particularmente evidente nos resultados obtidos nos meios de cultura MM3 e MM4: o crescimento celular observado no primeiro (12,15 g/L) foi superior ao resultado obtido no segundo (7,09 g/L), porém a produção específica de carotenoides totais por unidade de biomassa foi superior no MM4 (0,33 mg/g) em comparação ao MM3 (0,21 mg/g).

Além do fato de que maiores valores de concentração celular não coincidiram com produções de biopigmentos mais elevadas, observa-se, conforme apresentado na Figura 29b, que cultivos contendo menos nutrientes do que o meio original (HOU-RUI *et al.*, 2009) favoreceram a produção de biopigmentos. Esses resultados são concordantes com a literatura, pois já foi observado o estímulo à carotenogênese e a inibição do crescimento celular e do metabolismo primário em condições de estresse (como a limitação de nutrientes) (CHANCHAY *et al.*, 2012). Braunwald *et al.* (2013), ao estudarem a produção de carotenoides por *R. glutinis*, verificaram que a condição que propiciou o maior crescimento celular foi a mais desfavorável para a produção de biopigmentos.

Complementando a hipótese da relação entre fatores nutricionais e a carotenogênese, sugere-se também que a presença de elementos-traço possa ter beneficiado a produção desses biopigmentos. Mata-Gómez *et al.* (2014) evidenciam que íons metálicos como ferro, zinco, cálcio e magnésio ativam enzimas específicas da rota biossintética de carotenoides, e não apenas impulsionam a produção desses biopigmentos como também apresentam um efeito seletivo em definir o perfil de carotenoides produzidos. Uma vez que o farelo de arroz possui uma variedade de íons metálicos em sua composição e, em particular, teores consideráveis de cálcio e magnésio (Tabela 11), essa pode ser uma das razões que faz com que seu extrato tenha se apresentado como uma fonte de nitrogênio viável para a produção de biopigmentos por *P. kudriavzevii*.

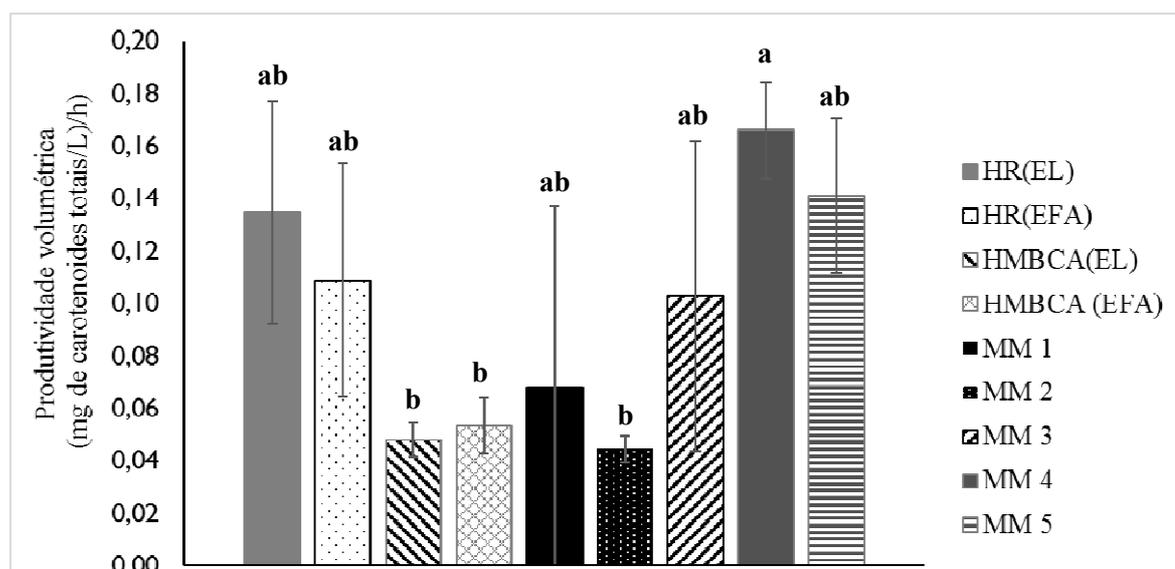
Dado que leveduras carotenogênicas frequentemente produzem mais de um tipo de carotenoide e cada um deles pode prevalecer em momentos distintos do cultivo (BHOSALE; GADRE, 2001b; FRENGOVA; BESHKOVA, 2009), sugere-se que a diferença de produção dessas moléculas entre os sete meios de cultivo avaliados esteja também relacionada à ausência ou à presença de alguns nutrientes, o que pode ter

impedido a síntese de determinados carotenoides. Cipolatti *et al.* (2019), por exemplo, avaliaram a produção de carotenoides por diferentes espécies de leveduras selvagens e observaram que a mudança da composição do meio de cultivo (fonte de carbono e de nitrogênio) inviabilizou a produção de astaxantina.

Apesar de observado que não há uma relação clara entre produção de biomassa e produção específica de biopigmentos, uma maior produção por volume de meio de cultivo pode ser interessante ao se considerar a possibilidade de ampliação de escala desse bioprocesso. As condições de cultivo desenvolvidas no MM4 (ausência de fosfatos e sulfatos) se destacaram quanto à produção de carotenoides totais por volume de meio de cultivo ($19,93 \pm 2,2$ mg/L).

Ao comparar os resultados obtidos nestes ensaios com aqueles alcançados nos experimentos discutidos nos itens 5.5.1 e 5.5.2, verifica-se que, dentre os seis meios de cultivo modificados, quatro deles apresentaram valores de produtividade volumétrica inferiores àquele obtido no meio de cultivo proposto por Hou-Rui e colaboradores (0,13 (mg/L)/h), porém o cultivo MM4 apresentou um valor superior de produtividade volumétrica: 0,17 (mg/L)/h. Os valores de produtividade volumétrica de todos os cultivos realizados para a quantificação de carotenoides estão apresentados na Figura 31.

Figura 31 – Produtividade volumétrica no ponto de maior produção de carotenoides totais dos diferentes cultivos da levedura *P. kudriavzevii* - cultivos em glicose com extrato de levedura ou EFA, cultivos em HMBCA e com extrato de levedura ou EFA e condições de limitação de nutrientes (MM1 a MM5)



Fonte: própria autora. Nota: HR: meio de cultivo de Hou-Rui et al. (2009). HMBCA: hidrolisado misto de bagaço de cana de açúcar; EFA: extrato de farelo de arroz MM: meio modificado. Letras iguais representam valores que não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey da diferença mínima significativa ($p \leq 0,1$).

O aumento da produtividade volumétrica no MM4 e sua diferença estatística dos meios contendo HMBCA e a suplementação nutricional completa são resultados promissores por indicarem que a simplificação da composição do meio de cultivo (e, portanto, de seu custo) é favorável à produção de carotenoides por *P. kudriavzevii*. Ademais, um aumento na produtividade volumétrica pode contribuir substancialmente para o sucesso do escalonamento deste bioprocessos.

A produção obtida no MM4 foi obtida em hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando extrato de farelo de arroz como fonte complexa de nitrogênio e com menos nutrientes de origem comercial do que o meio de cultivo originalmente utilizado neste trabalho. Isso representa não apenas uma redução de custos do processo como também a possibilidade de que esse bioprocessos seja inserido no contexto de uma biorrefinaria.

Dado que as alterações na composição dos meios de cultivos apresentados na Tabela 16 consistiram na remoção de nutrientes, a relação C/N desses meios diferiu entre si e esse fator pode ter sido contribuído para a variação na produção de biopigmentos (SAENGE *et al.*, 2011), assim como constatado nos ensaios discutidos nas seções 5.6.1 e 5.6.2. Dessa forma, consideram-se duas explicações possíveis pela maior produção de biopigmentos por *P. kudriavzevii* no meio de cultivo contendo HMBCA, EFA e ureia, ambas relacionadas ao consumo das fontes de nitrogênio: sugere-se que a composição desse meio tenha fornecido fontes de nitrogênio de difícil acesso para a levedura (e, portanto, não puderam contribuir para a manutenção da atividade das enzimas do ciclo do ácido cítrico) ou que os compostos nitrogenados presentes no meio tenham sido mais rapidamente consumidos do que nos demais meios de cultivo.

Em uma análise abrangente dos resultados obtidos nos experimentos de produção de biopigmentos por *P. kudriavzevii* desenvolvidos nesta pesquisa, considera-se que o hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar, suplementado com extrato de farelo de arroz e uma fonte orgânica de nitrogênio adicional, forneça condições adequadas para a produção de carotenoides totais por esta levedura, comparável a valores obtidos com leveduras notoriamente reconhecidas pela carotenogênese. As condições de cultivo propiciadas pelo MM4 não apenas foram favoráveis à produção de carotenoides totais como também propiciaram a melhor taxa de conversão de açúcares fermentescíveis a carotenoides.

Ressalta-se, igualmente, o caráter sustentável dos meios de cultivo avaliados nos ensaios apresentados na Tabela 16. Enquanto o meio de cultura elaborado por Hou-Rui *et al.* (2009) é constituído de insumos comerciais, o meio de cultivo desenvolvido no presente trabalho (MM4) utiliza como fonte de nitrogênio complexa e como fonte de carbono materiais provenientes do tratamento de subprodutos agroindustriais (bagaço de cana-de-açúcar e farelo de arroz), fazendo com que o processo biotecnológico de produção de biopigmentos pela levedura *P. kudriavzevii* tenha seu custo reduzido e seja embasado nos princípios da química verde.

5.6 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DE BIOPIGMENTOS DE *P. kudriavzevii*

Uma vez que o emprego das técnicas analíticas de espectrofotometria e de FTIR permitiram que se chegasse à conclusão de que a levedura *P. kudriavzevii* é produtora de carotenoides e muitos carotenoides microbianos são reconhecidos por sua capacidade antioxidante, decidiu-se avaliar se a atividade biológica era apresentada pelo extrato bruto de carotenoides totais em estudo. A elucidação dessa propriedade se inseriu no contexto de buscar aplicações industriais desses biopigmentos. O estudo foi realizado a partir da extração de células cultivadas no meio de cultura modificado no qual se obteve a maior produção específica dessas biomoléculas (MM4, seção 5.6.3) e o resultado obtido foi comparado à atividade antioxidante de moléculas que se destacam por essa propriedade e está apresentado na Tabela 17.

Tabela 17 - Atividade antioxidante (ABTS) do extrato de biopigmentos de *P. kudriavzevii* em meio de cultivo constituído por hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar, extrato de farelo de arroz e ureia em comparação com antioxidantes de referência

Amostra	Atividade antioxidante ($\mu\text{mol ET/mL}$)	Referência
Extrato de biopigmentos de <i>P. kudriavzevii</i>	1028,25	Presente trabalho
Extrato de carotenoides de <i>Thermus filiformis</i>	2870	Mandelli <i>et al.</i> , 2012
Extrato de <i>Haematococcus pluvialis</i>	334	Jaime <i>et al.</i> (2010)
Extrato de licopeno	3100	Bohm <i>et al.</i> , 2002
Hidroquinona	1330	Mandelli <i>et al.</i> , 2012
Zeaxantina	1400	Mandelli <i>et al.</i> , 2012
β -caroteno	1900	Mandelli <i>et al.</i> , 2012
α -tocoferol	1000	Mandelli <i>et al.</i> , 2012
Ácido ascórbico	1020	Mandelli <i>et al.</i> , 2012

Fonte: própria autora. Nota: $\mu\text{mol ET/mL}$ = $\mu\text{mol equivalentes de trolox/mL}$ de extrato.

A partir do ensaio de atividade antioxidante, observou-se que os biopigmentos produzidos por *P. kudriavzevii* possuem atividade antioxidante e o valor obtido foi de 1028,25 $\mu\text{mol ET/mL}$. Conforme destacado na Tabela 17, o valor pode ser considerado similar ao descrito na literatura para compostos antioxidantes habitualmente explorados por essa capacidade, como o ácido ascórbico e o α -tocoferol. O resultado obtido é considerado favorável para futuras investigações da atividade antioxidante desse extrato e indica sua possibilidade de uso como sequestrante de radicais livres, contudo considera-se que o valor obtido possa ser diferente para os demais ensaios apresentados na Tabela 16, uma vez que a modificação das condições de cultivo pode alterar não apenas os tipos de carotenoides produzidos, como também o poder antioxidante dessas moléculas (CHANCHAY *et al.*, 2012; MOREIRA *et al.*, 2018).

Dado que as modificações nos meios de cultivo apresentados na Tabela 16 propiciaram condições de maior ou menor disponibilidade de nutrientes, pode-se inferir que não apenas a composição do meio tenha relação com o valor de atividade antioxidante obtido, mas também o estabelecimento de uma condição de estresse nutricional. No estudo de Salar *et al.* (2013), os autores identificaram que a adição de NaCl e H₂O₂ ao meio de cultivo promoveu um incremento da atividade antioxidante do extrato de *R. glutinis* por consequência da maior produção de compostos fenólicos, enquanto que Rapta *et al.* (2005) observaram aumento da produção de carotenoides e da atividade antioxidante de leveduras carotenogênicas com a adição de íons zinco e níquel ao meio.

Conforme discutido nas seções anteriores, os tipos de carotenoides produzidos por uma levedura e suas proporções podem variar tanto de acordo com as condições de cultivo como em função do tempo de cultivo. O aumento da capacidade antioxidante entre os diferentes carotenoides se relaciona à sobreposição dos orbitais das duplas ligações conjugadas e também à extensão da molécula (MANDELLI *et al.*, 2012), sendo assim, investigações mais profundas sobre as estruturas moleculares dos biopigmentos em análise podem trazer conclusões mais assertivas sobre o poder antioxidante dessas moléculas.

É importante ressaltar que o ensaio de atividade antioxidante, assim como os demais estudos realizados com os extratos de biopigmentos de *P. kudriavzevii*, foram elaborados com extratos brutos, que poderiam conter outras moléculas, como ácidos graxos e fenóis. De acordo com Cipolatti *et al.* (2019), carboidratos com grupos carboxila, amina ou sulfonil podem se mostrar eficientes em capturar alguns radicais livres.

Uma vez que não foram encontrados estudos prévios que elucidassem aspectos da produção de biopigmentos pela levedura *P. kudriavzevii*, não foi possível prever se o extrato obtido apresentaria atividade antioxidante ou não e, por esse motivo, optou-se por avaliar essa propriedade no extrato de biopigmentos proveniente da condição experimental em que se registrou a maior produção específica de carotenoides totais (MM4, 0,33 mg/g). Apesar do resultado positivo de atividade antioxidante encontrado, vale ressaltar que tal propriedade não está vinculada à quantidade de carotenoides produzidos. O fenômeno é evidente no estudo de Cipolatti *et al.* (2019), no qual, entre as leveduras estudadas, *P. fermentans* produziu a menor quantidade de biopigmentos, porém a atividade antioxidante de seu extrato foi maior do que a dos demais devido à alta concentração de astaxantina, carotenoide reconhecido por sua distinta atividade antioxidante.

Do ponto de vista metodológico, considera-se que uma investigação robusta da capacidade sequestrante de radicais livres de um composto deve incluir mais de um tipo de ensaio, como os métodos do ABTS, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), FRAP (poder de redução do ferro) e ORAC (capacidade de absorção do radical oxigênio) (SALAR *et al.*, 2013; THAIPONG *et al.*, 2006). No presente trabalho, o extrato de biopigmentos também foi avaliado pelo método DPPH, porém acredita-se não ter ocorrido nenhuma reação entre os biopigmentos e o radical, pois a absorvância da solução do radical não foi alterada após o tempo de reação. De maneira similar, o estudo de Cipolatti *et al.* (2019) observou que o ensaio por ABTS foi mais propício para mensurar a capacidade antioxidante dos extratos em estudo do que o método do DPPH. Ademais, a literatura reporta que alguns carotenoides não são capazes de reduzir o radical DPPH (MÜLLER; FRÖHLICH; BÖHM, 2011).

A produção de compostos antioxidantes por *P. kudriavzevii* pode ser um dos motivos pelos quais essa levedura se adapte a condições ambientais adversas e tenha sido foco de estudos de biorremediação (CHI *et al.*, 2015). A síntese de enzimas ligadas ao estresse oxidativo (como superóxido desmutase e catalase) é reconhecida nessa espécie e foi relatado que a produção delas aumenta quando a levedura passa de sua morfologia leveduriforme para a formação de um biofilme (CHI *et al.*, 2015). Em outro estudo (CHEN *et al.*, 2010), constatou-se a atividade antioxidante do extrato celular de *P. kudriavzevii* (*Issatchenkia orientalis*), atribuída a polissacarídeos e proteínas intracelulares.

Os mecanismos de tolerância ao estresse ambiental e a produção de carotenoides com atividade antioxidante são fatores de grande relevância não só para a utilização da

levedura *P. kudriavzevii* em bioprocessos industriais, frequentemente conduzidos sob condições de alta salinidade, concentração de açúcares e/ou fatores de estresse térmico e mecânico, como também indicam um caminho promissor para o uso dessa levedura como produtora de alimentos fermentados enriquecidos (sobretudo para a alimentação animal) ou, até mesmo, compostos nutracêuticos que possam ser consumidos como suplementos alimentares.

O reconhecimento da atividade antioxidante do extrato de carotenoides totais produzidos pela levedura *P. kudriavzevii* cultivada em meio de cultivo baseado em subprodutos agroindustriais é um fator de grande relevância, não só para esse trabalho como também para pesquisas futuras e para fomentar o interesse na produção em larga escala e comercialização desses biopigmentos. A atividade antioxidante é, muitas vezes, correlacionada a outras atividades biológicas, como prevenção ao envelhecimento precoce, redução no risco de desenvolvimento de certos tipos de câncer e fortalecimento do sistema imune, sendo assim, há um caminho promissor para a exploração biotecnológica dos carotenoides produzidos por tal levedura.

6 CONCLUSÃO

- Os resultados preliminares evidenciaram que tanto o fornecimento de glicose como de xilose permitem a produção de biopigmentos pela levedura *P. kudriavzevii*, porém o crescimento celular em xilose foi inferior e, qualitativamente, a produção de biopigmentos foi mais evidente em glicose do que em xilose. De forma geral, observou-se que o tempo de cultivo necessário para o esgotamento de concentrações iniciais de açúcares de 45 g/L ou 60 g/L é superior a 120h, o que poderia comprometer a viabilidade do processo. Sendo assim, optou-se por conduzir os demais experimentos com 30 g/L de fonte de carbono.
- Concluiu-se que o hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar é mais viável para o bioprocessamento em estudo do que o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. O cultivo em hidrolisado hemicelulósico permitiu o crescimento celular e o aproveitamento dos açúcares, porém a biomassa celular adquiriu uma coloração escura que inviabilizou a observação dos biopigmentos. Em hidrolisado misto, por outro lado, a biomassa se tornou alaranjada, assim como nos meios de cultura complexos, e o crescimento celular e o consumo de açúcares foram semelhantes aos resultados obtidos com glicose de origem comercial como fonte de carbono. Dessa forma, o hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar foi utilizado em etapas futuras dessa pesquisa.
- Avaliando-se diferentes metodologias de rompimento celular, concluiu-se que a abrasão com pérolas de vidro foi mais eficiente do que a maceração após congelamento com nitrogênio líquido para a liberação de conteúdo intracelular da levedura *P. kudriavzevii*. Apesar da demanda de tempo, o rompimento com pérolas de vidro é um método de baixo custo e reduzida geração de resíduos, o que é um aspecto favorável para sua utilização em um bioprocessamento. Verificou-se, igualmente, que os biopigmentos dessa levedura podem ser extraídos com uma mistura de etanol:acetato de etila 1:3 v/v, a qual apresenta menor toxicidade do que diversos solventes utilizados para a extração de biopigmentos, como hexano e metanol. A metodologia de extração de biopigmentos definida para a levedura em questão no presente trabalho se apresenta como uma alternativa econômica e de baixo impacto ambiental para a obtenção destes compostos.

- As análises espectrofotométricas, na região entre 400 e 550nm, em conjunto com a determinação da varredura do extrato de biopigmentos de *P. kudriavzevii* na região do infravermelho, evidenciam similaridade entre essas moléculas e os carotenoides, que são um dos tipos de biopigmentos mais frequentes em leveduras. Informações sobre a natureza dos biopigmentos desta levedura não foram encontradas na literatura, portanto os resultados da caracterização parcial dessas biomoléculas apresentados nesse trabalho são pioneiros representam uma contribuição significativa para futuras investigações sobre a carotenogênese desse microrganismo.
- De acordo com os resultados obtidos nos cultivos submersos, identificou-se que a produção de carotenoides de *P. kudriavzevii* tem início na fase de crescimento exponencial e prossegue ao longo da fase estacionária, sugerindo-se que mais de um tipo de carotenoide seja produzido e que as concentrações relativas desses varie ao longo do processo. Ademais, observou-se que a quantidade de carotenoides totais produzidos não sofre variação significativa quando o extrato de levedura é substituído pelo extrato de farelo de arroz. Dado que as fontes complexas de nitrogênio podem representar uma parcela considerável de um bioprocessos, a utilização eficiente do extrato de farelo de arroz nesse estudo é considerada como um avanço importante no sentido da viabilização econômica da obtenção de biopigmentos por leveduras.
- A produção de carotenoides totais em hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar foi inferior àquela obtida em meio de cultivo complexo baseado em glicose de origem comercial. Esse resultado foi atribuído ao metabolismo da xilose e de componentes adicionados ao hidrolisado como suplementação nutricional. Todavia, a remoção de alguns componentes da suplementação nutricional do hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar permitiu a obtenção de valores de produção de carotenoides totais semelhantes àqueles obtidos em glicose de origem comercial.
- A elaboração de um meio de cultivo baseado em hidrolisado misto de bagaço de cana-de-açúcar e suplementado apenas com extrato de farelo de arroz e ureia permitiu a obtenção de melhores resultados de produção, produção específica, produtividade volumétrica e taxa de conversão de açúcares fermentescíveis em massa de carotenoides totais. Foi possível remover os fosfatos e sulfatos do meio de cultivo original, bem como utilizar uma fonte de carbono e uma fonte complexa de

nitrogênio provenientes de subprodutos agroindustriais, possibilitando a redução de custos deste bioprocesso e seu embasamento em princípios da sustentabilidade e da química verde.

- Os resultados de produção de carotenoides totais evidenciaram que o crescimento celular e a carotenogênese não são, necessariamente, diretamente proporcionais. Algumas condições nutricionais fizeram com que houvesse uma maior concentração de carotenoides, por unidade celular, sem que representassem as melhores condições de crescimento microbiano. Fatores de estresse podem inibir o crescimento e favorecer a carotenogênese.
- A constatação de que o extrato de carotenoides da levedura *P. kudriavzevii* apresenta atividade antioxidante é um resultado pioneiro, dado que não foram encontrados estudos sobre a produção de biopigmentos por esta espécie. Essa propriedade é de grande interesse para o desenvolvimento de estudos que busquem a exploração futura dessas biomoléculas na indústria e reforça a importância das investigações que envolvam a obtenção de bioprodutos de alto valor agregado a partir de subprodutos agroindustriais.

REFERÊNCIAS

ABE, F. R. *et al.* Toxicity of dyes to zebrafish at the biochemical level: Cellular energy allocation and neurotoxicity. **Environmental Pollution**, v. 235, p. 255-262, 2018.

ABEL, A. The new colour index international of pigments and solvent dyes. **Surface Coatings International Part B: Coatings International**, v. 81, n. 2, p. 77-85, 1998.

ABIGAIL, E. A.; ABDUL SALAM, J.; DAS, N. Atrazine degradation in liquid culture and soil by a novel yeast *Pichia kudriavzevii* strain Atz-EN-01 and its potential application for bioremediation. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 6, p. 35-43, 2013.

ACOSTA MARTÍNEZ, E.; APARECIDA, J.; SANTOS, F. Influence of the use of rice bran extract as a source of nutrients on xylitol production Influência do uso de extrato de farelo de arroz como nutriente na produção de xilitol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 2, p. 308-313, 2012.

AGUIAR, T. Q.; SILVA, R.; DOMINGUES, L. *Ashbya gossypii* beyond industrial riboflavin production: a historical perspective and emerging biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1774-1786, 2015.

AGUILAR, R. *et al.* Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, 2002.

AKSU, Z.; EREN, A. T. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2985-2991, 2005.

AKSU, Z.; EREN, A. T. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, n. 2, p. 107-113, 2007.

ALBUQUERQUE, C. D. **Estudo da cinética de produção de carotenoides**. 2015. 177 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

ALONSO, S.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Microbial production of specialty organic acids from renewable and waste materials. **Critical reviews in biotechnology**, v. 8551, n. March, p. 1-17, 2014.

ALVES, L. A. *et al.* Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, n. 1, p. 89-98, 1998.

AMBATI, R. R. *et al.* Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: current trends and future prospects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 12, p. 1880-1902, 2019.

- AMCHOVA, P.; KOTOLOVA, H.; RUDA-KUCEROVA, J. Health safety issues of synthetic food colorants. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 3, p. 914-922, 2015.
- ANANTHI, V. *et al.* Enhanced microbial biodiesel production from lignocellulosic hydrolysates using yeast isolates. **Fuel**, v. 256, 2019.
- ANTUNES, F. A. F. *et al.* Overcoming challenges in lignocellulosic biomass pretreatment for second-generation (2G) sugar production: emerging role of nano, biotechnological and promising approaches. **3 Biotech**, v. 9, n. 6, 2019.
- ANTUNES, F. A. F. F. *et al.* Hemicellulosic ethanol production in fluidized bed reactor from sugar cane bagasse hydrolysate: interplay among carrier concentration and aeration rate. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 5, n. 9, p. 8250-8259, 2017.
- ANTUNES, F. A. F. Imobilização celular de *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2 em gel de alginato de cálcio visando a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado. 2015. 169 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.
- AZMAN, N. F. *et al.* Biohydrogen production from de-oiled rice bran as sustainable feedstock in fermentative process. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 1, p. 145-156, 2016.
- BARATELLA, B.F.; FONSECA, B. G. ; SILVA, S. S. . Remoção de Furanos por Leveduras do Gênero *Issatchenkia* em Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana-de-açúcar. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 18, 2010 - 18º SIICUSP, São Paulo, SP, 2010a.
- BARATELLA, B.F.; FONSECA, B. G.; SILVA, S. S. Remoção de ácido acético em hidrolisados hemicelulósicos por leveduras *Issatchenkia* sp.. In: SEMANA DE BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL, 2, 2010 - II Semana de Biotecnologia Industrial, Lorena, SP, 2010b.
- BELLIDO, C. *et al.* Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 23, p. 10868-10874, 2011.
- BENJAMIN, Y.; CHENG, H.; GÖRGENS, J. F. Evaluation of bagasse from different varieties of sugarcane by dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 7-18, 2013.
- BERMAN, J. *et al.* Nutritionally important carotenoids as consumer products. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 5, p. 727-743, 2015.
- BHOSALE, P. B.; GADRE, R. V. Production of b-carotene by a mutant of *Rhodotorula glutinis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, n. 4, p. 423-427, 2001a.

BHOSALE, P.; GADRE, R. V. beta-Carotene production in sugarcane molasses by a *Rhodotorula glutinis* mutant. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 26, n. September 2000, p. 327-332, 2001b.

BHOSALE, P.; GADRE, R. V. Optimization of carotenoid production from hyper-producing *Rhodotorula glutinis* mutant 32 by a factorial approach. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 12-16, 2001c.

BONTURI, N. *et al.* Microbial oil production in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate without nutrient supplementation by a *Rhodospiridium toruloides* adapted strain. **Process Biochemistry**, v. 57, p. 16-25, 2017.

BRAUNWALD, T. *et al.* Effect of different C/N ratios on carotenoid and lipid production by *Rhodotorula glutinis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 14, p. 6581-6588, 2013.

BUZZINI, P. *et al.* Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, and *Sporidiobolus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 8, p. 1024-31, 2007.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. **Bioresource Technology**, v. 71, n. 1, p. 41-44, 1999.

CACHUMBA, J. J. M. Produção de L-asparaginase extracelular por fermentação em estado sólido. 2017. 126 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) –Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

CANILHA, L. *et al.* Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, n. 7, 2012.

CARDOSO, L. A. C. *et al.* Improvement of *Sporobolomyces ruberrimus* carotenoids production by the use of raw glycerol. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 374-379, 2016.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 67, p. 849-864, 2008.

CARVALHO, W. T. *et al.* Características físico-químicas de extratos de arroz integral, quirera de arroz e soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, n. 3, p. 422-429, 2011.

CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 354-358, 2000.

CATALDO, V. F. *et al.* Heterologous production of the epoxycarotenoid violaxanthin in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 59, n. December 2019, p. 53-63, 2020.

CHAMNIPA, N. *et al.* The potential of the newly isolated thermotolerant yeast *Pichia kudriavzevii* RZ8-1 for high-temperature ethanol production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 378-391, 2018.

CHANCHAY, N. *et al.* Optimal conditions for carotenoid production and antioxidation characteristics by *Rhodotorula rubra*. **International Journal of Biotechnology and Bioengineering**, v. 6, n. 8, p. 621-625, 2012.

CHANDEL, A. K. *et al.* Bioconversion of de-oiled rice bran (DORB) hemicellulosic hydrolysate into ethanol by *Pichia stipitis* NCM3499 under optimized conditions. **International Journal of Food Engineering**, v. 5, n. 1, 2009.

CHANDEL, A. K. *et al.* Multi-scale structural and chemical analysis of sugarcane bagasse in the process of sequential acid-base pretreatment and ethanol production by *Scheffersomyces shehatae* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1-17, 2014.

CHANDEL, A. K. *et al.* Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 11-20, 2012.

CHAUD, L. C. S.; ARRUDA, P. V.; FELIPE, M. G. A. Potencial do farelo de arroz para utilização em bioprocessos. **Nucleus**, v. 6, n. 2, p. 33-46, 2009.

CHEN, L. S. *et al.* Antioxidant activity of two yeasts and their attenuation effect on 4-nitroquinoline 1-oxide induced *in vitro* lipid peroxidation. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, n. 3, p. 555-561, 2010.

CHI, M. *et al.* Increase in antioxidant enzyme activity, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Pichia kudriavzevii* with the transition from a yeast-like to biofilm morphology. **Biological Control**, v. 90, p. 113-119, 2015.

CHOUDHARI, S.; SINGHAL, R. Media optimization for the production of β -carotene by *Blakeslea trispora*: a statistical approach. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 4, p. 722-730, 2008.

CIPOLATTI, Eliane Pereira *et al.* Use of agroindustrial byproducts as substrate for production of carotenoids with antioxidant potential by wild yeasts. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 20, 2019

COLET, R. *et al.* Use of low-cost agro products as substrate in semi-continuous process to obtain carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, n. 10, p. 268-254, 2017.

COLET, R.; DI LUCCIO, M.; VALDUGA, E. Fed-batch production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636): kinetic and stoichiometric parameters. **European Food Research and Technology**, v. 240, n. 1, p. 173-182, 2015.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, safra 2019/20, primeiro levantamento, maio/2019.** Brasília, 2019. Disponível em: https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar/item/download/26522_a59699997ccd7d2a58a5c9a29371b267. Acesso em: 18 ago. 2020.

CORDERO, R. J. B.; CASADEVALL, A. Functions of fungal melanin beyond virulence. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, n. 2, p. 99-112, 2017.

COSTAS, M.; DEIVE, F. J.; LONGO, M. A. Lipolytic activity in submerged cultures of *Issatchenkia orientalis*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 2109-2114, 2004.

DARSHAN, N.; MANONMANI, H. K. Prodigiosin and its potential applications. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 9, p. 5393-5407, 2015.

DAVOLI, P.; WEBER, R. W. S. Carotenoid pigments from the red mirror yeast, *Sporobolomyces roseus*. **Mycologist**, v. 16, n. 3, p.102-108, 2002.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPEZ, O. **Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains** - Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. [s.l.]: Taylor and Francis Inc., 2000. v. 40.

DEMAIN, A. L.; MARTENS, E. Production of valuable compounds by molds and yeasts. **The Journal of Antibiotics**, v. 70, n. 4, p. 347-360, 2017.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. DA. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 945-954, 2009.

DHALIWAL, S. S. *et al.* Enhanced ethanol production from sugarcane juice by galactose adaptation of a newly isolated thermotolerant strain of *Pichia kudriavzevii*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 5968-5975, 2011.

DIAS, M. **Aproveitamento de resíduos do processamento de café para produção de carotenoides por leveduras e bactérias.** 2016. 121 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

DÍAZ-NAVA, L. E. *et al.* Effect of carbon sources on the growth and ethanol production of native yeast *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 isolated from sweet sorghum juice. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 7, p. 1069-1077, 2017.

DOS REIS CELESTINO, J. *et al.* Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 569-575, 2014.

DOUGLASS, A. P. *et al.* Population genomics shows no distinction between pathogenic *Candida krusei* and environmental *Pichia kudriavzevii*: one species, four names. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 7, 2018.

DUFOSSE, L. *et al.* Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? **Trends in Food Science and Technology**, v.

16, n. 9, p. 389-406, 2005.

DUFOSSÉ, L. Microbial production of food grade pigments microbial production of food grade pigments. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 313-321, 2006.

DURSUN, D.; DALGIC, A. C. Optimization of astaxanthin pigment bioprocessing by four different yeast species using wheat wastes. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 1-6, 2016.

EFSA PANEL ON FOOD ADDITIVES AND NUTRIENT SOURCES ADDED TO FOOD. Scientific opinion on the re-evaluation of Azorubine/Carmoisine (E 122) as a food additive. **EFSA Journal**, v. 7, n. 11, 2009.

ELAHI, A.; REHMAN, A. Bioconversion of hemicellulosic materials into ethanol by yeast, *Pichia kudriavzevii* 2-KLP1, isolated from industrial waste. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 50, n. 4, p. 417-425, 2018.

EL-BANNA, A. A.; EL-RAZEK, A. M. A.; EL-MAHDY, A. R. Some factors affecting the production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*. **Food and Nutrition Sciences**, v. 3, n. 1, p. 64-71, 2012.

EL-BIALY, H. A.; ABOU EL-NOUR, S. A. Physical and chemical stress on *Serratia marcescens* and studies on prodigiosin pigment production. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 59-68, 2015.

EL-NAGGAR, N. E. A.; EL-EWASY, S. M. Bioproduction, characterization, anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **O trigo**. Passo Fundo, RS: [s.n.], 2006. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do74_2.htm. Acesso em: 20 ago. 2020.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **A Embrapa, o arroz e você, juntos por um Brasil melhor!** Utilização do farelo de arroz. Santo Antônio de Goiás, GO: [s.n.], 2009. Disponível em <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/82506/1/FL-5430-2009.pdf>. Acesso em: 25 ago. 2020.

FABIAN, C.; JU, Y.H. A Review on rice bran protein: its properties and extraction methods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 9, p. 816-827, 2011.

FARIA, S. A. DOS S. C.; BASSINELLO, P. Z.; PENTEADO, M. DE V. C. Nutritional composition of rice bran submitted to different stabilization procedures. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4, p. 651-657, 2012.

FERDES, Mariana *et al.* The influence of the carbon source on torularhodin pigment biosynthesis. **Rev. Chim**, v. 62, n. 3, p. 339-343, 2011.

FERNANDES, A. *et al.* Introductory Chapter: Carotenoids - A Brief Overview on Its Structure, Biosynthesis, Synthesis, and Applications. In: **Progress in Carotenoid Research**. IntechOpen, 2018. p. 1-16.

FONSECA, B. G. **Destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia orientalis***. 2009. 111 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

FONSECA, B. G.; BARATELLA, B.F.; RODRIGUES, R. C. B.; HOU-RUI, Z.; SILVA, S. S. Evaluation of biodegradability potential of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate toxic compounds by *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 and *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098 yeasts. In: CONGRESSO BIANUAL DA SOCIEDADE PORTUGUESA DE MICROBIOLOGIA 9, 2009 - 9º MICROBIOTEC Vilamoura, Portugal. Book of Abstracts of MicroBiotec09, 2009. v. 1. p. 163-163.

FONSECA, B. G. *et al.* Biological detoxification of different hemicellulosic hydrolysates using *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 yeast. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 199-207, 2011.

FONTANA, J. D. *et al.* Bioproduction of carotenoids: The comparative use of raw sugarcane juice and depolymerized bagasse by *Phaffia rhodozyma*. **Bioresource Technology**, v. 58, n. 2, p. 121-125, 1996.

FOOD AND AGRICULTURE OF THE UNITED NATIONS. **Sugar cane - production/yield quantities of sugar cane in world + (total) 1994-2018**. [s.l.: s.n.], 2018. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. Acesso em: 20 ago. 2020.

FREER, S. N. Fermentation and aerobic metabolism of cellodextrins by yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 655-659, 1991.

FREER, S. N.; GREENE, R. V. Transport of glucose and cellobiose by *Candida wickerhamii* and *Clavispora lusitaniae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 22, p. 12864-12868, 1990.

FREITAS, C. *et al.* Selecting low-cost carbon sources for carotenoid and lipid production by the pink yeast *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 using flow cytometry. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 355-359, 2014.

FRENGOVA, G. *et al.* Formation of carotenoids by *Rhodo torula glutinis* in whey ultrafiltrate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 888-894, 1994.

FRENGOVA, G. I.; BESHKOVA, D. M. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 163-180, 2009.

GALAUP, P. *et al.* First isolation of *Brevibacterium* sp. pigments in the rind of an industrial red-smear-ripened soft cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 68, n. 1, p. 144-147, 2015.

- GARBAYO, I. *et al.* Nitrogen, carbon and light-mediated regulation studies of carotenoid biosynthesis in immobilized mycelia of *Gibberella fujikuroi*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 5, p. 629-634, 2003.
- GECIOVA, J.; BURY, D.; JELEN, P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry - a review. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 6, p. 541-553, 2002.
- GMOSER, R. *et al.* Filamentous ascomycetes fungi as a source of natural pigments. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 1-25, 2017.
- GOGATE, P. R.; PANDIT, A. B. Hydrodynamic cavitation reactors: a state of the art review. **Reviews in Chemical Engineering**, v. 17, n. 1, p. 1-85, 2001.
- GOODWIN, T. W. Biosynthesis of carotenoids. In: GOODWIN, T. W. **The biochemistry of the carotenoids**. London: Chapman and Hall, 1980. p.33-76 v. 1.
- GOSWAMI, G.; CHAUDHURI, S.; DUTTA, D. Studies on the stability of a carotenoid produced by a novel isolate using low cost agro-industrial residue and its application in different model systems. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 780-790, 2015.
- GREPPI, A. *et al.* Phytase-producing capacity of yeasts isolated from traditional African fermented food products and PHYPk gene expression of *Pichia kudriavzevii* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 205, p. 81-89, 2015.
- GULZAR, T. *et al.* **Green chemistry in the wet processing of textiles**. In: **The Impact and Prospects of Green Chemistry for Textile Technology**. Woodhead Publishing, 2019. p. 1-20.
- HAMANO, P. S.; KILIKIAN, B. V. Production of red pigments by *Monascus ruber* in culture media containing corn steep liquor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 4, p. 443-449, 2006.
- HAN, S. W.; CHEE, K. M.; CHO, S. J. Nutritional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable protein. **Food Chemistry**, v. 172, p. 766-769, 2014.
- HARPER, M.; LEE, C. J. Genome-wide analysis of mutagenesis bias and context sensitivity of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG). **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 731, n. 1-2, p. 64-67, 2012.
- HASAN, M. *et al.* Influence of high-pressure homogenization, ultrasonication, and supercritical fluid on free astaxanthin extraction from β -glucanase treated *Phaffia rhodozyma* cells. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 46, n. 2, p. 116-122, 2016.
- HEER, K.; SHARMA, S. Microbial pigments as a natural color: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 8, n. 5, p. 1913-1922, 2017.

HERNÁNDEZ-ALMANZA, A. *et al.* Carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* YB-252 in solid-state fermentation. **Food Bioscience**, v. 7, p. 31-36, 2014.

HOU-RUI, Z. *et al.* Novel isolates for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 152, n. 2, p. 199-212, 2009.

HSU, T. C. *et al.* Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4907-4913, 2010.

IRAZUSTA, V. *et al.* Relationship among carotenoid production, copper bioremediation and oxidative stress in *Rhodotorula mucilaginosa* RCL-11. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 803-809, 2013.

ISLAM, M. S.; ARYASOMAYAJULA, A.; SELVAGANAPATHY, P. R. A review on macroscale and microscale cell lysis methods. **Micromachines**, v. 8, n. 3, 2017.

ISSARA, U.; RAWDKUEN, S. Rice bran: a potential of main ingredient in healthy beverage. **International Food Research Journal**, v. 23, n. 6, p. 2306-2318, 2016.

JIN, J. *et al.* Astaxanthin overproduction in yeast by strain engineering and new gene target uncovering. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2018.

JING, K. *et al.* Enhancing beta-carotene biosynthesis and gene transcriptional regulation in *Blakeslea trispora* with sodium acetate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 114, p. 10-17, 2016.

JOHNSON, E. A.; LEWIS, M. I. C. H. A. E. L. J. Astaxanthin formation by the yeast *Phafia rhodozyma*. **Journal of General Microbiology**, v. 115, n. 1979, p. 173-183, 1979.

JUNG, Y. H.; KIM, K. H. Evaluation of the main inhibitors from lignocellulose pretreatment for enzymatic hydrolysis and yeast fermentation. **BioResources**, v. 12, n. 4, p. 9348-9356, 2017.

JURADO, Miguel *et al.* Application of white-rot fungi in transformation, detoxification, or revalorization of agriculture wastes. **Comprehensive Biotechnology**, v. 6, p. 595-603, 2011.

KAID, N. *et al.* Continuous butanol fermentation of dilute acid-pretreated de-oiled rice bran by *Clostridium acetobutylicum* YM1. **Science**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019.

KARP, S. G. *et al.* Pretreatment strategies for delignification of sugarcane bagasse: a review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 4, p. 679-689, 2013.

KATEMAI, W. *et al.* Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Issatchenkia orientalis* SR4. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 79-82, 2008.

KAWARSKA, A. *et al.* Evaluation of the efficiency of different disruption methods on yeast cell wall preparation for β -glucan isolation. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20941-20961,

2014.

KIM, I. *et al.* Hydrodynamic cavitation as a novel pretreatment approach for bioethanol production from reed. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 335-339, 1 Sept. 2015.

KITAGAWA, T. *et al.* Construction of a β -glucosidase expression system using the multistress-tolerant yeast *Issatchenkia orientalis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 5, p. 1841-1853, 2010.

KLOTZ, S.; KUENZ, A.; PRÜSSE, U. Nutritional requirements and the impact of yeast extract on the d-lactic acid production by *Sporolactobacillus inulinus*. **Green Chemistry**, v. 19, n. 19, p. 4633-4641, 2017.

KODAMA, S. *et al.* A wild and tolerant yeast suitable for ethanol fermentation from lignocellulose. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, n. 5, p. 557-561, 2013.

KOT, A. M. *et al.* *Rhodotorula glutinis* - potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 14, p. 6103-6117, 2016.

KOT, A. M. *et al.* Torulene and torularhodin: "new" fungal carotenoids for industry?. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, p. 49, 2018.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J.; BASEHOAR-POWERS, E. Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma gen. nov.*, *Lindnera gen. nov.* and *Wickerhamomyces gen. nov.* **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 6, p. 939-954, 2008.

KUSHWAHA, K. *et al.* Detection of carotenoids in psychrotrophic bacteria by spectroscopic approach. **Journal of BioScience and Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 253-260, 2014.

KWON, Y. J. *et al.* Effect of lignocellulosic inhibitory compounds on growth and ethanol fermentation of newly-isolated thermotolerant *Issatchenkia orientalis*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 17, p. 8099-8104, 2011.

LACERDA, D. B. C. L. *et al.* Qualidade de farelos de arroz cru, extrusado e parboilizado. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, n. 4, p. 521-530, 2010.

LAPENDA, J. C. *et al.* Antimicrobial activity of prodigiosin isolated from *Serratia marcescens* UFPEDA 398. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 399-406, 2015.

LAVARACK, B. P.; GRIFFIN, G. J.; RODMAN, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, n. 5, p. 367-380, 2002.

LI, J. *et al.* An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 568-574, 2011.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350-382, 1987.

LIM, C. G. *et al.* Development of a recombinant *Escherichia coli* strain for overproduction of the plant pigment anthocyanin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 18, p. 6276-6284, 2015.

LIM, S. H.; CHOI, J. S.; PARK, E. Y. Microbial production of riboflavin using riboflavin overproducers, *Ashbya gossypii*, *Bacillus subtilis*, and *Candida famate*: an overview. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 6, n. 2, p. 75-88, 2001.

LIN, T. F.; DEMAIN, A. L. Resting cell studies on formation of water-soluble red pigments by *Monascus* sp. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 12, n. 6, p. 361-367, 1993.

LIU, D. *et al.* Disruption and protein release by ultrasonication of yeast cells. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 18, p. 132-137, 2013a.

LIU, D. *et al.* Yeast cell disruption strategies for recovery of intracellular bio-active compounds - a review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 36, p. 181-192, 2016.

LIU, X. *et al.* Mutant breeding of *Serratia marcescens* strain for enhancing prodigiosin production and application to textiles. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 43, n. 3, p. 271-284, 2013b.

LONG, T. M. *et al.* Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 16, p. 5492-5500, 2012.

LOPES, N. A. *et al.* Different cell disruption methods for obtaining carotenoids by *Sporodibolus pararoseus* and *Rhodotorula mucilaginosa*. **Food Science and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 759-766, 2017.

LV, D. *et al.* A novel preparation method of two polymer dyes with low cytotoxicity. **Materials**, v. 10, n. 3, p. 1-11, 2017.

MACHADO, W. R. M. *et al.* Production of carotenoids by *Rhodotorula toruloides* isolated from Brazilian tropical savannah. **International Food Research Journal**, v. 26, n. 4, p. 1259-1267, 2019.

MADISON, M. J. *et al.* Mechanical pretreatment of biomass - part I: acoustic and hydrodynamic cavitation. **Biomass and Bioenergy**, v. 98, p. 135-141, 2017.

MAGALHÃES JUNIOR, A. I. *et al.* Lignocellulosic biomass from agro-industrial residues in South America: current developments and perspectives. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 13, n. 6, p. 1505-1519, 2019.

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

- MALDONADE, I. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SCAMPARINI, A. R. P. Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 145-150, 2008.
- MALDONADE, I. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SCAMPARINI, A. R. P. Statistical optimisation of cell growth and carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 109-115, 2012.
- MALIK, K.; TOKKAS, J.; GOYAL, S. Microbial pigments: a review. **International Journal of Microbial Resource Technology Accepted**, v. 41, n. 4, p. 361-365, 2012.
- MANDELLI, F. *et al.* Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced by extremophile microorganisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1781-1790, 2012.
- MANI, S.; CHOWDHARY, P.; BHARAGAVA, R. N. Textile wastewater dyes: toxicity profile and treatment approaches. *In*: BHARAGAVA, R. N.; CHOWDHARY, P. (eds.). **Emerging and eco-friendly approaches for waste management**. Singapura: Springer Singapore, 2018. p. 219–244.
- MANIMALA, M. R. A.; MURUGESAN, R. Characterization of carotenoid pigment production from yeast *Sporobolomyces* sp. and their application in food products. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, p. 2818-2821, 2018.
- MAPARI, S. A. S. *et al.* Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 231-238, 2005.
- MARCELINO, P. R. F. *et al.* Biosurfactants produced by *Scheffersomyces stipitis* cultured in sugarcane bagasse hydrolysate as new green larvicides for the control of *Aedes aegypti*, a vector of neglected tropical diseases. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, p. 1-16, 2017.
- MARCELINO, P. R. F. *et al.* Biosurfactants production by yeasts using sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate as new sustainable alternative for lignocellulosic biorefineries. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 212-223, 2019.
- MARCELINO, P. R. F. Produção de biossurfactantes de segunda geração por leveduras em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. 2016. 157 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.
- MARCOLETA, A. *et al.* Glucose and ethanol-dependent transcriptional regulation of the astaxanthin biosynthesis pathway in *Xanthophyllomyces dendrorhous* BMC Microbiology. **BMC Microbiology**, v. 11, p. 1-11, 2011.
- MARSHELL, J. Fourier Transform Infrared Spectra of Freshly Isolated β -carotene. **Asian Journal of Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 29-34, 1998.
- MARTINIANO, S. E. *et al.* Evaluation of rice bran extract as a nitrogen source for improved hemicellulosic ethanol production from sugarcane bagasse by new xylose-

fermenting yeast strains isolated from Brazilian forests. **Sugar Tech**, v. 16, n. 1, p. 1-8, 2014.

MATA-GÓMEZ, L. *et al.* Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, 2014.

MAYERHOFF, Z. D. V. L.; ROBERTO, I. C.; SILVA, S. S. Production of xylitol by *Candida mogii* from rice straw hydrolysate: study of environmental effects using statistical design. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 70-72, p. 149-159, 1998.

McWILLIAMS, A. **The Global Market for Carotenoids**. [s.l: s.n.], 2018.

MENSOR, L. L. *et al.* Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**. v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.

MICHELON, M. *et al.* Extraction of carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: a comparison between different techniques of cell disruption. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 1-8, 2012.

MIHALCEA, A. *et al.* Extraction of torularhodin from *Rhodotorula rubra* yeast using sunflower oil. **Revista de Chimie**, v. 66, n. 10, p. 1692-1695, 2015.

MIHALCEA, A. *et al.* The influence of operating conditions on the growth of the yeast *Rhodotorula Rubra* ICCF 209 and on Torularhodin Formation. **Revista de Chimie**, v. 62, n. 6, p.659-665, 2011.

MILESSI, T. S. S. *et al.* Rice bran extract: an inexpensive nitrogen source for the production of 2G ethanol from sugarcane bagasse hydrolysate. **3 Biotech**, v. 3, n. 5, p. 373-379, 2013.

MILLER, R. B. Structure of wood. In Forest Products Laboratory. (ed)**Wood handbook: wood as an engineering material**. Madison: USDA Forest Service, Forest Products Laboratory, 1999. p. 2.1-2.4, v. 113.

MISHRA, S.; CHOWDHARY, P.; BHARAGAVA, R. N. Conventional methods for the removal of industrial pollutants, their merits and demerits. In: BHARAGAVA, R. N.; CHOWDHARY, P. (eds.). **Emerging and Eco-Friendly Approaches for Waste Management**. Singapura: Springer Singapore, 2018. p. 1-31.

MONKS, L. *et al.* Assessment of carotenoids recovery through cell rupture of *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 using compressed fluids. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 6, p. 2353-2359, 2012.

MOORE, D.; ROBSON, G.; TRINCI, A. P. J. Fungi in ecosystems. In: MOORE, D.; ROBSON, G.; TRINCI, A. P. J (orgs.). **21st Century Guidebook to Fungi**. New York: Cambridge University Press, 2011. p. 238-245.

MOREIRA, M. D. *et al.* Solid coffee waste as alternative to produce carotenoids with antioxidant and antimicrobial activities. **Waste Management**, v. 82, p. 93-99, 2018.

MU, J. *et al.* Enhanced biomass and oil production from sugarcane bagasse hydrolysate (SBH) by heterotrophic oleaginous microalga *Chlorella protothecoides*. **Bioresource Technology**, v. 185, p. 99-105, 2015.

MÜLLER, L.; FRÖHLICH, K.; BÖHM, V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. **Food Chemistry**, v. 129, n. 1, p. 139-148, 2011.

MUSO-CACHUMBA, J. J. *et al.* Influence of agitation on the periplasmic l-asparaginase production by *Rhodotorula glutinis* and *Issatchenkia orientalis* yeast. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 21., 2017, Aracaju. **Anais eletrônicos...** [s.l.: s.n.], 2017. Disponível em: <https://proceedings.science/sinaferm/sinaferm-2017/papers/influence-of-agitation-on-the-periplasmic-l-asparaginase-production-by-rhodotorula-glutinis-and-issatchenkia-orientalis-?lang=pt-br#>. Acesso em: 15 ago. 2020.

MUSSAGY, C. U. *et al.* Production and extraction of carotenoids produced by microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 3, p. 1095-1114, 2019.

NAJAFI, N. *et al.* Gamma irradiation as a useful tool for the isolation of astaxanthin-overproducing mutant strains of *Phaffia rhodozyma*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 57, n. 9, p. 730-734, 2011.

NAKASAKI, K.; ARAYA, S.; MIMOTO, H. Inoculation of *Pichia kudriavzevii* RB1 degrades the organic acids present in raw compost material and accelerates composting. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 521-528, set. 2013.

NAKASHIMA, K. *et al.* Hydrodynamic cavitation reactor for efficient pretreatment of lignocellulosic biomass. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 55, n. 7, p. 1866-1871, 2016.

NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 171-177, 2001.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. **Technical Report NREL/TP-510-42618**. Colorado, USA: [s.n.], 2012. 17 p.

NCBI:txid4909. National Center for Biotechnology Information Taxonomy ID: 4909. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=4909&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=s&log_op=lineage_toggle. Acesso em: 29 ago. 2020.

NIGAM, J. N. Development of xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis* for ethanol production through adaptation on hardwood hemicellulose acid prehydrolysate. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 2, p. 208-215, 2001.

NIGAM, P. S.; LUKE, J. S. Food additives: production of microbial pigments and their antioxidant properties. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 93-100, 2016.

NOSANCHUK, J. D.; STARK, R. E.; CASADEVALL, A. Fungal melanin: what do we know about structure? **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-7, 2015.

OBEROI, H. S. *et al.* Ethanol production from alkali-treated rice straw via simultaneous saccharification and fermentation using newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 557-566, 2012.

OJIMA, K. *et al.* Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a b-carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 275, p. 148-158, 2006.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25-33, 2000.

PANESAR, R.; KAUR, S.; PANESAR, P. S. Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, n. 1, p. 70-76, 2015.

PARK, P. K. *et al.* Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using statistical experimental design. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 4, p. 429-434, 2005.

PARK, P. K.; KIM, E. Y.; CHU, K. H. Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments. **Separation and Purification Technology**, v. 53, n. 2, p. 148-152, 2007.

PÂRLOG, R. M. **Metabolomic studies applied on different seabuckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.) varieties**. Ph.D. thesis, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Cluj-Napoca, Romania, 2011.

PARMAR, M.; GUPTA PHUTELA, U. Biocolors: the new generation additives. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 7, p. 688-694, 2015.

PARRADO, J. *et al.* Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. **Food Chemistry**, v. 98, n. 4, p. 742-748, 2006.

PATAKOVA, P. Monascus secondary metabolites: production and biological activity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 2, p. 169-181, 2013.

PATIL, P. N. *et al.* Intensification of biogas production using pretreatment based on hydrodynamic cavitation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 30, p. 79-86, 2016.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. D. O. Utilização de resíduos agro-

industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**, v. 2, n. 1, p. 118-127, 2007.

PEREIRA, G. V. M. *et al.* Great intraspecies diversity of *Pichia kudriavzevii* in cocoa fermentation highlights the importance of yeast strain selection for flavor modulation of cocoa beans. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 290-297, 2017.

PHAN, D. T.; TAN, C. S. Innovative pretreatment of sugarcane bagasse using supercritical CO₂ followed by alkaline hydrogen peroxide. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 192-197, 2014.

PHILIPPINI, R. R. *et al.* Agroindustrial byproducts for the generation of biobased products: alternatives for sustainable biorefineries. **Frontiers in Energy Research**, v. 8, 2020.

PHILIPPINI, R. R. *et al.* Pretreatment of sugarcane bagasse from cane hybrids: effects on chemical composition and 2G sugars recovery. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 6, p. 1561-1570, 2019.

PHILIPPINI, R. R. **Produção do exopolissacarídeo lasiodiplodana a partir de hidrolisados de subprodutos agrícolas**. 2017. 133 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

PHILIPPINI, R. R.; PINHEIRO, J. N. A.; MARTINIANO, S. E.; MARCELINO, P. R. F.; CACHUMBA, J. J. M.; BRUMANO, L. P.; SILVA, G. M.; ANTUNES, F. A. F.; GAIKWAD, S.; SANTOS, J. C.; SILVA, S. S. From biomass to bioproducts: biopolymers from Brazilian starchy brans. In: WORKSHOP IPBEN ON BIOENERGY, RENEWABLE ENERGY AND GREEN BUILDING, 2, 2016 - II Workshop on Bioenergy, Renewable Energy and Green Building, Guaratinguetá, SP.

PHONG, H. X. *et al.* Isolation and characterization of thermotolerant yeasts for the production of second-generation bioethanol. **Annals of Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 765-776, 2019.

POURALI, O.; ASGHARI, F. S.; YOSHIDA, H. Sub-critical water treatment of rice bran to produce valuable materials. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1-7, 2009.

QIANG, W. *et al.* Mutation breeding of lycopene-producing strain *Blakeslea trispora* by a novel atmospheric and room temperature plasma (ARTP). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 1, p. 452-460, 2014.

RADECKA, D. *et al.* Looking beyond *Saccharomyces*: the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. **FEMS Yeast Research**, v. 15, n. 6, p. 1-13, 2015.

RAMANAN, R. N.; CHUAN LING, T.; ARIFF, A. B. The performance of a glass bead shaking technique for the disruption of *Escherichia coli* cells. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 13, p. 613-623, 2008.

RAO, M. P. N.; XIAO, M.; LI, W. J. Fungal and bacterial pigments: secondary metabolites with wide applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-13, 2017.

RAPTA, P. *et al.* Scavenging and antioxidant properties of compounds synthesized by carotenogenic yeasts stressed by heavy metals - EPR spin trapping study. **Biophysical Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 1-9, 2005.

RASTOGI, R. P. *et al.* Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. **Journal of Nucleic Acids**, v. 2010, 2010.

REBECCA, L. J. *et al.* Extraction and purification of carotenoids from vegetables. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 4, p. 594-598, 2014.

RIAZ, Rabia *et al.* Designing of Cell Coverage in Light Fidelity. **International Journal of Advanced Computer Science and Applications**, v. 9, n. 3, p. 44-53, 2018.

RIBEIRO, B. D.; BARRETO, D. W.; COELHO, M. A. Z. Technological Aspects of β -Carotene production. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 5, p. 693-701, 2011.

RODRIGUES, L. R.; TEIXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, R. Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, n. 3, p. 135-142, 2006.

RODRIGUES, T. V. D. *et al.* Carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa* in batch and fed-batch fermentation using agroindustrial byproducts. **Food Technology and Biotechnology**, v. 57, n. 3, p. 388-398, 2019.

RODRIGUEZ-CONCEPCION, M. *et al.* A global perspective on carotenoids: metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. **Progress in Lipid Research**, v. 70, n. February, p. 62-93, 2018.

ROHMAN, A. *et al.* Application of FTIR spectroscopy for the determination of virgin coconut oil in binary mixtures with olive oil and palm oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, n. 6, p. 601-606, 2010.

ROSAS, Á. L. *et al.* Isolation and serological analyses of fungal melanins. **Journal of Immunological Methods**, v. 244, n. 1-2, p. 69-80, 2000.

ROŞU, C. M. *et al.* Performances of *Pichia kudriavzevii* in decolorization, biodegradation, and detoxification of C.I. Basic Blue 41 under optimized cultural conditions. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 431-445, 2019.

ROUTRAY, W. *et al.* Biorefinery approach and environment-friendly extraction for sustainable production of astaxanthin from marine wastes. **Critical Reviews on Biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 469-488, 2019.

RUFINO, M. D. S. M. *et al.* Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2007a.

RUFINO, M. D. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2007b.

RUYTERS, S. *et al.* Assessing the potential of wild yeasts for bioethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p. 39-48, 2015.

SAENGE, C. *et al.* Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 210-218, 2011.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 279-291, 2003.

SAHA, N. *et al.* Characterization and antioxidant potential of a carotenoid from a newly isolated yeast. **Food Science and Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 117-124, 2015.

SAINI, R. K.; KEUM, Y. S. Microbial platforms to produce commercially vital carotenoids at industrial scale: an updated review of critical issues. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 46, n. 3, p. 657-674, 2019.

SALAR, R. K. *et al.* Stress influenced increase in phenolic content and radical scavenging capacity of *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-26. **3 Biotech**, v. 3, n. 1, p. 53-60, 2013.

SANDMANN, G. Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 385, n. 1, p. 4-12, 2001.

SANTOS, J. W. *et al.* Farelo de arroz em dietas para ovinos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 11, n. 1, p. 193-201, 2010.

SANTOS, M. F. R. F.; BORSCHIVER, S.; COUTO, M. A. P. G. Iniciativas para o uso da biomassa lignocelulósica em biorrefinarias: a plataforma sucroquímica no mundo e no Brasil. **Economia e Energia**, n. 82, p. 14-32, 2011.

SARKER, T. C.; AZAM, S. M. G. G.; BONANOMI, G. Recent advances in sugarcane industry solid by-products valorization. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, n. 2, p. 241-266, 2017.

SARON, C.; FELISBERTI, M. I. Ação de colorantes na degradação e estabilização de polímeros. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 124-128, 2006.

SARROUH, B.; SILVA, S. S. Repeated batch cell-immobilized system for the biotechnological production of xylitol as a renewable green sweetener. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 7, p. 2101-2110, 2013.

SCHNEIDER, T. *et al.* Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents. **Energy**, v. 61, p. 34-43, 2013.

SEDMAK, J. J.; WEERASINGHE, D. K.; JOLLY, S. O. Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnology Techniques**, v. 4, n. 2, p. 107-112,

1990.

SEMALTI, P.; SHARMA, S. N. Dye sensitized solar cells (DSSCs) electrolytes and natural photo-sensitizers: a review. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 20, n. 6, p. 3647-3658, 2019.

SEN, B. *et al.* Pretreatment conditions of rice straw for simultaneous hydrogen and ethanol fermentation by mixed culture. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 7, p. 4421-4428, 2016.

SERIVE, B. *et al.* Selection and optimisation of a method for efficient metabolites extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 311-320, 2012.

SETYONINGRUM, T. M.; NUR, M. M. A. Optimization of C-phycoerythrin production from *S. platensis* cultivated on mixotrophic condition by using response surface methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 603-607, 2015.

SHAH, M. M. R. *et al.* Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. April, 2016.

SHAKOOR, S.; NASAR, A. Adsorptive decontamination of synthetic wastewater containing crystal violet dye by employing *Terminalia arjuna* sawdust waste. **Groundwater for Sustainable Development**, v. 7, p. 30-38, 2018.

SHANKER, U.; RANI, M.; JASSAL, V. Degradation of hazardous organic dyes in water by nanomaterials. **Environmental Chemistry Letters**, v. 15, n. 4, p. 623-642, 2017.

SILVA, D. D. V. DA *et al.* Evaluation of fermentative potential of *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 in cellulosic and hemicellulosic sugarcane bagasse hydrolysates on xylitol and ethanol production. **Annals Microbiology**, v. 65, p. 687-694, 2015.

SILVA, S. S. Producao de Xilitol Por *Candida guilliermondii* Utilizando Hidrolisado Hemicelulosico Suplementado Com Farelo de Arroz. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 15, 1989 - XV CBM, Ribeirao Preto, SP, p. 0-0, 1989.

SIM, C. S. F.; CHEN, S. H.; TING, A. S. Y. Endophytes: emerging tools for the bioremediation of pollutants carrier. In: BHARAGAVA, R. N.; CHOWDHARY, P. (eds.). **Emerging and Eco-Friendly Approaches for Waste Management**. Singapura: Springer Singapore, 2018. p. 189-217.

SINDHU, R. *et al.* Bioconversion of sugarcane crop residue for value added products - an overview. **Renewable Energy**, v. 98, p. 203-215, 2016.

SMITH, J. M. Adverse reactions to food and drug additives. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 45, p. 17-21, 1991. suppl. 1.

SOLER, M. F.; CACHUMBA, J. J. M.; BRUMANO, L. P.; PEDREIRA, V. A.; LONGO, F. F. F.; SILVA, S. S. Production kinetics of periplasmatic L-Asparaginase by

Issatchenchia orientalis and *Rhodotorula glutinis* yeasts. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 21, 2016 - XXI COBEQ, Fortaleza, CE, v. 1. p. 1-7, 2016.

SOLOVCHENKO, A. Photoprotection in plants. **Photoprotection in Plants: Optical Screening-Based Mechanisms**, v. 14, n. May, p. 67-88, 2010.

Souza, A. C. S. D., *et al.* Riboflavina: uma vitamina multifuncional. **Química Nova**, v.28, n.5, p. 887-891, 2005.

SUN, S. *et al.* Production of natural edible melanin by *Auricularia auricula* and its physicochemical properties. **Food Chemistry**, v. 196, p. 486-492, 2016.

SZCZERBOWSKI, D. *et al.* Sugarcane biomass for biorefineries: comparative composition of carbohydrate and non-carbohydrate components of bagasse and straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, p. 95-101, 2014.

TASKIN, M. *et al.* Use of waste chicken feathers as peptone for production of carotenoids in submerged culture of *Rhodotorula glutinis* MT-5. **European Food Research and Technology**, v. 233, n. 4, p. 657-665, 2011.

TAYEH, H. A. *et al.* Potential of bioethanol production from olive mill solid wastes. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 24-30, 2014.

TERÁN HILARES, R. *et al.* Hydrodynamic cavitation as an efficient pretreatment method for lignocellulosic biomass: a parametric study. **Bioresource Technology**, v. 235, p. 301-308, 2017.

TERÁN HILARES, R. *et al.* Hydrodynamic cavitation-assisted alkaline pretreatment as a new approach for sugarcane bagasse biorefineries. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 609-614, 2016.

TERÁN HILARES, R. *et al.* Hydrodynamic cavitation-assisted continuous pre-treatment of sugarcane bagasse for ethanol production: effects of geometric parameters of the cavitation device. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 63, 2020.

TERÁN HILARES, R. *et al.* Sugarcane bagasse hydrolysate as a potential feedstock for red pigment production by *Monascus ruber*. **Food Chemistry**, v. 245, p. 786-791, 2018.

THAIPONG, K. *et al.* Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6-7, p. 669-675, 2006.

THANGAVELU, K. *et al.* Delignification of corncob via combined hydrodynamic cavitation and enzymatic pretreatment: process optimization by response surface methodology. **Biotechnol Biofuels**, v. 11, 2018.

TKÁČOVÁ, J. *et al.* Correlation between lipid and carotenoid synthesis in torularhodin-producing *Rhodotorula glutinis*. **Annals of Microbiology**, v. 67, n. 8, p. 541-551, 2017.

TSIGIE, Y. A. *et al.* Oil production from *Yarrowia lipolytica* Po1g using rice bran

hydrolysate. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.

TURSI, A. A review on biomass: importance, chemistry, classification, and conversion. **Biofuel Research Journal**, v. 6, n. 2, p. 962-979, 2019.

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

UNGUREANU, C. *et al.* Enhancing antimicrobial activity of TiO₂/Ti by torularhodin bioinspired surface modification. **Bioelectrochemistry**, v. 107, p. 14-24, 2016.

VALDUGA, E. *et al.* Assessment of cell disruption and carotenoids extraction from *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636). **Food and Bioprocess Technology**, v. 2, n. 2, p. 234-238, 2009a.

VALDUGA, E. *et al.* Evaluation of aeration and substrate concentration on the production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) in bioreactor. **European Food Research and Technology**, v. 232, n. 3, p. 453-462, 2011.

VALDUGA, E. *et al.* Optimization of the production of total carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) using response surface technique. **Food and Bioprocess Technology**, v. 2, n. 4, p. 415-421, 2009b.

VARMIRA, K. *et al.* Experimental evaluation of airlift photobioreactor for carotenoid pigments production by *Rhodotorula rubra*. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 23, n. 4, 2018.

VAZ DE ARRUDA, P. *et al.* Scale up of xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 47, p. 297-302, 2017.

VENIL, C. K. *et al.* Current perspective on bacterial pigments: emerging sustainable compounds with coloring and biological properties for the industry-an incisive evaluation. **RSC Advances**, v. 4, n. 74, p. 39523-39529, 2014.

VENIL, C. K. *et al.* Fungal pigments: potential coloring compounds for wide ranging applications in textile dyeing. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 2, 2020.

VENIL, C. K.; ZAKARIA, Z. A.; AHMAD, W. A. Bacterial pigments and their applications. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 7, p. 1065-1079, 2013.

VOAIDES, Catalina; DIMA, R. The effect of nitrogen source on carotenoids production by *Rhodotorula* sp. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 17, n. 5, p. 7570-7576, 2012.

VODA, A. *et al.* The impact of freeze-drying on microstructure and rehydration properties of carrot. **Food Research International**, v. 49, n. 2, p. 687-693, 2012.

VOJDANI, A.; VOJDANI, C. Immune reactivity to food coloring. **Alternative Therapies, Health and Medicine**, v. 21, n. 1, p. 52-62, 2015.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 1, p. 157-166, 2009.

WANG, M. *et al.* Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 411-416, 1999.

WANG, Qiang *et al.* Enhancing carotenoid production in *Rhodotorula mucilaginosa* KC8 by combining mutation and metabolic engineering. **Annals of Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 425-431, 2017.

WATANABE, M. *et al.* Simultaneous recovery and purification of rice protein and phosphorus compounds from full-fat and defatted rice bran with organic solvent-free process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 2, p. 206-211, 2015.

WEEDON, B. C. L.; Chemistry of carotenoids. *In*: GOODWIN, T. W. (org.). **Chemistry and biochemistry of plant pigments**. New York: Academic Press Inc., 1965. p. 75-125.

XIAO, H. *et al.* Exploiting *Issatchenkia orientalis* SD108 for succinic acid production. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, 2014.

XU, X. *et al.* Analysis and expression of the carotenoid biosynthesis genes from *Deinococcus wulumuqiensis* R12 in engineered *Escherichia coli*. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2018.

YANG, J.; TAN, H.; YANG, R. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* fermentation of cassava residues substrate. **Agricultural Engineering International**, v. 13, n. 2, p. 1-9, 2011.

YEHIA, H. M. *et al.* Improvement of carotenoid pigments produced by *Rhodotorula glutinis*. **Life Science Journal**, v. 10, n. 4, p. 386-400, 2013.

YEN, H. W.; CHANG, J. T.; CHANG, J. S. The growth of oleaginous *Rhodotorula glutinis* in an internal-loop airlift bioreactor by using mixture substrates of rice straw hydrolysate and crude glycerol. **Biomass and Bioenergy**, v. 80, p. 38-43, 2015.

YEN, H-W.; ZHANG, Z. Enhancement of cell growth rate by light irradiation in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9279-9281, 2011.

YOLMEH, M. *et al.* High efficiency pigment production from *Micrococcus roseus* (PTCC 1411) under ultraviolet irradiation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, n. September 2016, p. 156-161, 2017.

YOUNG, E.; LEE, S. M.; ALPER, H. Optimizing pentose utilization in yeast: the need for novel tools and approaches. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 1-12, 2010.

YUAN, S. F.; GUO, G. L.; HWANG, W. S. Ethanol production from dilute-acid steam exploded lignocellulosic feedstocks using an isolated multistress-tolerant *Pichia kudriavzevii* strain. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1581-1590, 2017.

YUANGSAARD, N. *et al.* Selection and characterization of a newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* strain for ethanol production at high temperature from cassava starch hydrolysate. **International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 103, n. 3, p. 577-588, 2013.

ZANONI, M. V. B.; YANAMAKA, H. **Corantes: Caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2016.

ZHANG, C. *et al.* Combined mutagenesis of *Rhodospiridium toruloides* for improved production of carotenoids and lipids. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 10, p. 1733-1738, 2016a.

ZHANG, X. *et al.* Catalytic co-pyrolysis of lignocellulosic biomass with polymers: a critical review. **Green Chemistry**, v. 18, n. 15, p. 4145-4169, 2016b.

ZHANG, X-K *et al.* Multicopy integrants of crt genes and co-expression of AMP deaminase improve lycopene production in *Yarrowia lipolytica*. **Journal of biotechnology**, v. 289, p. 46-54, 2019.

ZHU, Z. *et al.* A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*. **Nature Communications**, v. 3, 2012.

ZHUANG, Y.; JIANG, G.-L.; ZHU, M.-J. Atmospheric and room temperature plasma mutagenesis and astaxanthin production from sugarcane bagasse hydrolysate by *Phaffia rhodozyma* mutant Y1. **Process Biochemistry**, v. 91, p. 330-338, 2020.

ZIARANI, G. M. *et al.* Chapter 1 - Introduction and Importance of Synthetic Organic Dyes. In: ZIARANI, G. M. *et al.* (eds.). **Metal-Free Synthetic Organic Dyes**. [s.l.]: Elsevier, 2018. p. 1-7.

ZOZ, L. *et al.* Torularhodin and torulene: bioproduction, properties and prospective applications in food and cosmetics - a review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 2, p. 278-288, 2015.