

## PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES ISOLADOS DO SEMI-ÁRIDO NORDESTINO

1. **Edilene Andrade Oliveira**, Bolsista PROBIC/UEFS, Graduanda no curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [edylene\\_andrade@hotmail.com](mailto:edylene_andrade@hotmail.com)
2. Orientadora: **Sandra Aparecida Assis**, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [sandrinhaassis@yahoo.com.br](mailto:sandrinhaassis@yahoo.com.br)

**PALAVRAS-CHAVE:** corantes naturais; leveduras; biotecnologia.

### INTRODUÇÃO

Carotenóides são corantes naturais de grande importância, responsáveis pela coloração amarela, laranja, vermelha e roxa que são encontrados em vegetais e micro-organismos. Estes compostos são utilizados nas indústrias farmacêutica, alimentícia, de cosméticos e ração. Além da ampla utilização como corantes e no enriquecimento de alimentos, também são utilizados devido a sua atividade pró-vitamina A e as propriedades que resultam em possíveis funções biológicas benéficas à saúde, tais como o fortalecimento do sistema imunológico e a diminuição do risco de doenças degenerativas (NIIZU, 2003).

A produção de carotenóides através de micro-organismos apresenta inúmeras vantagens. Dentre estas, as principais são que os micro-organismos oferecem uma via de produção mais econômica, podendo ser obtidos em curto prazo e em qualquer época do ano, fornecendo uma alternativa à síntese química (BUZZINI & MARTINI 1999; FRENGOVA *et al.*, 1994). Em bactérias e leveduras os carotenóides são considerados metabólitos secundários, desempenhando certo papel na sobrevivência destes micro-organismos, ajudando a encontrar novas estratégias para o estudo de organismos multiresistentes (PELZ *et al.*, 2005; CLAUDITZ *et al.*, 2006). Além disso, os carotenóides fornecem uma ampla gama de efeitos benéficos, reduzindo riscos de certos cânceres e doenças cardiovasculares (STRINGHAM & HAMMOND, 2005).

A produção industrial de carotenóides naturais por fermentação já é estabelecida e vem se expandindo, pois é altamente eficiente e de fácil manipulação. Um aspecto importante no processo de fermentação é o desenvolvimento de um meio de cultura satisfatório para que a obtenção do produto desejado seja máxima utilizando um substrato barato, como por exemplo, resíduos agroindustriais. Neste contexto, o consumo de glicerol como fonte de carbono na produção de carotenóides em bioprocessos, pode se tornar uma solução para produção, pois este é um produto abundante derivado da produção de biodiesel (IMANDI *et al.*, 2006).

As leveduras utilizadas no referido projeto foram isoladas do semi-árido baiano, e para OLIVEIRA (2007), a região Semi-Árida brasileira consiste em um local potencial na obtenção de leveduras carotenogênicas, com possíveis micro-organismos endêmicos devido às características desta região geográfica, com o objetivo produzir e quantificar carotenóides e polissacarídeos dessa área.

### MATERIAL, MÉTODOS OU METODOLOGIA

As leveduras isoladas do semi-árido nordestino foram disponibilizadas pela Coleção de Culturas de Micro-organismos da Bahia (CCMB) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e foram identificadas por métodos moleculares (sequenciação rDNA). Logo abaixo, encontra-se a Tabela 1 com o código referente a cada levedura e o nome científico correspondente:

**Tabela 1: Identificação das leveduras pigmentadas do semi-árido baiano**

Leveduras Código CCMB	Nome científico
33c1	<i>Rhodotorula sp.</i>
33d1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>

O crescimento das leveduras foi em meio YM-ágar, em estufa a 28°C.

Condições de cultivo: Para padronização do inoculo, as colônias isoladas foram transferidas para placa de Petri contendo Agar YM e incubadas em estufa de incubação a 28°C, por 48 horas. Após esse período as colônias foram transferidas para solução salina a 0,45%, em seguida realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 600nm a fim de padronizar o inoculo em  $10^7$  número de micro-organismos. Na seqüência, foram inoculadas 10% do volume do meio a ser fermentado em os frascos erlemneyer 250mL contendo 100mL de meio ( $5,0 \text{ g.L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de extrato de levedura,  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4$  onde foi testada em uma concentração de glicerol  $20\text{g.L}^{-1}$ ) mais 10% de inoculo foram encubadas em agitador orbital (Tecnal, modelo 420) a 28°C por 120hs a 200 rpm .

Após a fermentação, foram retiradas de cada cultura amostras para o cálculo da biomassa, o cálculo de açúcares redutores e produção dos carotenóides.

Extração: Os pellets de cada levedura foram então ressuspensos em 1,0 mL dimetilsufóxido (DMSO) método utilizado na permeabilização das membranas descrito por Libkind e Van Broock (2004), e colocados no banho maria a 55°C durante 30 minutos, agitando a suspensão no vortex a cada 10 minutos, em seguida foi realizado uma nova centrifugação durante 10 minutos. Após esse procedimento foi retirado o pigmento que estava no sobrenadante colocados em tubos de ensaio de rosca cobertos com papel alumínio, pois são fotossensíveis. Esse procedimento usando o dimetilsufóxido foi repetido 2 vezes para a total retirada do pigmento.

Purificação: A purificação será realizada com éter de petróleo e solução saturada de NaCl (LIBKIND & VAN BROOCK, 2006). No processo de separação do pigmento do dimetilsufóxido, os pigmento foi retirado e colocados em outros tubos contendo 1mL de éter de petróleo, e 0,5 mL de solução saturada de cloreto de sódio, em seguida foram agitados no vortex por 1 minuto e levados a centrifugação a 3000rpm por 5 minutos. Logo após separação os pigmentos foram transferidos para tubos de ensaio limpos, sendo adicionado éter de petróleo para a realização da leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 485nm. Após leitura foi anotado a absorbância e o volume para os posteriores cálculos.

Determinação da biomassa: Na determinação da biomassa foi utilizado 1 mL do meio fermentado descongelado e centrifugado a 3000rpm durante 10 minutos, logo após foi descartado o sobrenadante e adicionado 1mL de água destilada para ressuspender os pellets, onde foram centrifugados novamente a 3000rpm durante 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e acrescentou-se 0,5mL de água destilada para ajudar a ressuspender os pellets para sua retirada dos tubos, onde foram transferidos para placas de petry já pesadas e colocadas na estufa durante quatro dias, com posterior pesagem e obtenção do peso seco.

Quantificação: A quantificação de carotenóides foi realizada por espectrofotometria e o conteúdo total de carotenóides foi mensurado de acordo Maxwell et al. (1999).

## RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

As Tabelas 2, 3 e 4 mostram os resultados obtidos na concentração de glicerol a 10%, 20% e 30%.

**Tabela 2: Quantidades de carotenóides totais por levedura na concentração de 10% de glicerol.**

Leveduras	Biomassa (g/L)	Carotenóides ( $\mu\text{g/g}$ )
( <i>Rhodotorula sp.</i> ) 33 c1	2,16	122,86 $\pm$ 14,25
( <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ) 33 d1	2,16	258,12 $\pm$ 33,80

**Tabela 3: Quantidades de carotenóides totais por levedura na concentração de 20% de glicerol.**

Leveduras	Biomassa (g/L)	Carotenóides ( $\mu\text{g/g}$ )
( <i>Rhodotorula sp.</i> ) 33 c1	1,3	284,2 $\pm$ 32,10
( <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ) 33 d1	2,48	908,7 $\pm$ 48,22

**Tabela 4: Quantidades de carotenóides totais por levedura na concentração de 30% de glicerol.**

Leveduras	Biomassa (g/L)	Carotenóides ( $\mu\text{g/g}$ )
( <i>Rhodotorula sp.</i> ) 33 c1	2,25	305,70 $\pm$ 48,68
( <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ) 33 d1	3	200,87 $\pm$ 38,58

Analisando os resultados da produção de carotenóides pelas leveduras *Rhodotorula sp.* 33 c1 e (*Rhodotorula mucilaginosa*) 33d1 nas tabelas 1, 2 e 3 percebe-se que ao variar a concentração de glicerol no meio o valor da produção também vai varia. A concentração de 20% de glicerol foi a que o propiciou um valor mais alto, de 908,7  $\pm$  48,22  $\mu\text{g/g}$  pela levedura 33d1(*Rhodotorula mucilaginosa*) (Tabela 3). Isto indica que a levedura 33d1 possui melhor adaptação às condições propostas pelo meio. Já a maior produção obtida pela levedura 33c1 (*Rhodotorula sp.*) foi de 305,70  $\pm$  48,68  $\mu\text{g/g}$  (Tabela 4), encontrada na concentração de 30% de glicerol.

Observa-se que a concentração de glicerol no meio influencia na produção de carotenoides, sendo que ao aumentar a concentração obteve-se um aumento na produção de carotenóides nas duas leveduras estudadas.

Se compararmos os resultados obtidos com um meio sem o glicerol (dados da literatura) na sua composição observa-se que o valor obtido de 908,7  $\pm$  48,22  $\mu\text{g/g}$  utilizando o meio com glicerol pela levedura 33d1(*Rhodotorula mucilaginosa*) (Tabela 3) está bem próximo ao valor da literatura descrito por Buzzini e Martini (1999) com um máximo de produção de 915,4  $\mu\text{g/g}$ , e relativamente alto se comparados com os valores obtidos por Libkind e Van Broock (2006) que apresentaram resultados em torno de 301  $\mu\text{g/g}$  de produção de carotenoides em um meio sem o glicerol.

Os resultados obtidos pela levedura 33 c1 (*Rhodotorula sp.*) (Tabela 4) também mostraram uma produção significativa de 305,70  $\pm$  48,68  $\mu\text{g/g}$  em relação aos de Libkind e Van Broock (2006), na concentração de 30% de glicerol, já na concentração de 10% foi onde observou-se um resultado menor na sua produção (122,86  $\pm$  14,25  $\mu\text{g/g}$ ) (Tabela 2).

Razavi e colaboradores (2006) em seus estudos utilizando o glicerol como fonte de carbono obteve o máximo de produção 3800  $\mu\text{g/g}$  de carotenoides, o qual está bem acima se comparados com os obtidos, o que a indica a necessidade de otimizar os experimentos através de planejamentos experimentais para obtenção de uma produção mais elevada. De acordo com Valduga e colaboradores (2009) para aumentar a carotenogênese é importante analisar os fatores que interferem na produção dos mesmos como efeito da composição do meio de cultivo, do pH, da temperatura, da luminosidade e da taxa de aeração.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS (ou Conclusão)

A produção de carotenóides por via de micro-organismos viabiliza a obtenção dos mesmos em curto prazo e em qualquer época do ano. Os processos biotecnológicos vêm se destacando e minimizando os riscos de aditivos químicos em alimentos e conseqüentemente os riscos a saúde, além de terem funções biológicas importantes na prevenção de doenças degenerativas e no mecanismo de combate aos radicais livres que ocasionam tais doenças.

Desse modo no referido trabalho foi possível produzir carotenóides a partir de leveduras isoladas do semi-árido baiano, com resultados satisfatórios em relação aos resultados da literatura. Destacamos a importância de tais resultados, tendo em vista que o glicerol é um produto abundante derivado da produção de biodiesel e as agências de fomento têm buscado possíveis aplicações para o mesmo.

## REFERÊNCIAS

- BUZZINI, P.; MARTINI, A.: **Bioresour Technol.** 1999
- IMANDI, S. B.; BANDARU V. V. R.; SOMALANKA S. R.; GARAPATI H. R., (2006), **Optimization of medium constituents for the production of citric acid from byproduct glycerol using Doehlert experimental design.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 1367-1372.
- LOPES, L.; ANDRADE, C. T.; MANO, E. B. O valor das gomas para as indústrias. *Ciência Hoje*, São Paulo, v.12, n. 71, p.65-67, mar. 1991.
- LIBKIND, D., BROOCK, M.van. Biomass and carotenoid production by patagoniam native yeasts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 22: 687-692, 2006.
- NIIZU, P. Y.; **Dissertação do Mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2003.
- OLIVEIRA, R. Q., **Bioprospecção de microrganismos leveduriformes de pectinases extracelulares isolados do semi-árido baiano.** 2007. 123 f. Dissertação (Mestrado em biotecnologia) Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.
- PELZ, A.; WIELAND, K.; PUTZBACH, K; HENTSCHEL, P.; ALBERT, A; GÖTZ, F. (2005), **Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, p. 32493-32498.
- RAZAVI, S. H.; MARCH, I.; *IRANIAN J. Chem. Eng.* **2006**, 23, 59.
- STRINGHAM, J. M.; HAMMOND, B. R. (2005), **Dietary lutein and zeaxanthin: possible effects on visual function.** *Nutrition Reviews*, v. 63, p. 59-64.
- VALDUGA, E.; TATSCH, P. H.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M. (2009), **Produção de carotenóides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais.** *Química Nova*, v. 32, nº 9, p. 2429-2436.