

## **Curso de Tecnologia em Biocombustíveis**

### **PRODUÇÃO DOS CAROTENÓIDES ATRAVÉS DO PROCESSO FERMENTATIVO UTILIZANDO LEVEDURA DO GÊNERO *RHODOTORULA.***

**BIANCA DE MELO SILVEIRA**

**Orientador: Rita de Cássia Vieira Macri  
Coorientador: Lidyane Aline de Freitas**

**Trabalho apresentado a Faculdade de Tecnologia  
de Jaboticabal - Fatec, para obtenção do título de  
Tecnólogo em Biocombustíveis.**

**Jaboticabal – SP  
2º Semestre/2012**

Silveira, Bianca de Melo

S587p Produção dos carotenóides através do processo fermentativo utilizando levedura do gênero *Rhodotorula*. / Bianca de Melo Silveira. — Jaboticabal: Fatec, 2012.  
40f.

Orientador: Rita de Cássia Vieira Macri  
Coorientador: Lidyane Aline de Freitas

Trabalho (Graduação) – Apresentado ao Curso de Tecnologia em Biocombustíveis, Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, 2012.

1. Corantes. 2. Fermentação. 3. Biotecnologia I. Macri, R. C. V.. II. Título.

CDU 57.088:667.2

## **Curso de Tecnologia em Biocombustíveis**

### **CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** PRODUÇÃO DOS CAROTENÓIDES ATRAVÉS DO PROCESSO FERMENTATIVO UTILIZANDO LEVEDURA DO GÊNERO *RHODOTORULA*

**AUTOR:** BIANCA DE MELO SILVEIRA

**ORIENTADOR(A):** PROF(a). RITA DE CÁSSIA VIEIRA MACRI

**COORIENTADOR(A):** LIDYANE ALINE DE FREITA

Trabalho de Graduação aprovado pela Banca Examinadora como parte das exigências para conclusão do Curso Superior de Tecnologia em Biocombustíveis, apresentado à FATEC-JB para a obtenção do título de Tecnólogo.

**RITA DE CÁSSIA VIEIRA MACRI**

**JOÃO ROBERTO DA SILVA**

**IGOR DOS SANTOS MASSON**

Data da apresentação: 19 de Dezembro de 2012.

---

Presidente da Comissão Examinadora

Dedico, aos meus pais Lenice e Airton, e minha irmã Gabriele por seu amor,  
apoio e incentivo nesta longa caminhada.  
Aos meus queridos amigos que me ajudaram com palavras de incentivo  
nos momentos de desespero e preocupação, sempre acreditando  
em meu potencial, compartilhando momentos de  
grandes alegrias e superações.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada, proporcionando força para a realização deste sonho que é o término de uma graduação.

A minha família, em especial aos meus pais Airton e Lenice e a minha irmã Gabriele que sempre estiveram ao meu lado a todos os momentos de felicidade e dificuldade, encorajando-me a vencer e conquistar os objetivos para um sucesso brilhante. Amo vocês!

Agradeço aos meus companheiros de classe que me concederam informações, e opiniões para a realização deste trabalho, em especial a Géssica, amiga, companheira e irmã que esteve presente em grandes momentos de minha vida, compartilhando tristezas e alegrias. À Aline, uma pessoa inacreditável... Sem dúvidas, a conquista de uma amizade sincera e muito especial! Kika, que esteve presente em muitos momentos ... Sentirei saudade! Augusto e Poliana, sempre com brincadeiras alegrando e divertindo cada vez mais os momentos que passamos juntos. Tititi-k, grande companheira de apartamento. Natália e Jessika: grandes amigas... Momentos inesquecíveis passamos juntas! Jenifer, Bruno e Giuliano, sempre sorridentes contagiando com sua alegria.

A professora Rita, minha orientadora, por sua paciência, companheirismo, amizade, incentivo, profissionalismo e principalmente por dividir seus conhecimentos para que esse trabalho fosse elaborado.

A Lidyane, coorientadora, que foi uma pessoa especial que conheci nesta etapa, sempre me ajudando com opiniões, incentivo e otimismo, demonstrando sua competência, paciência, profissionalismo e conhecimento!

A UNESP pela liberação da infraestrutura para que pudesse realizar estágios e atividades do curso.

Aos professores e funcionários da secretaria acadêmica que ao longo de três anos de curso dividiram conhecimentos, experiências tornando nossos dias alegres, repletos de conhecimentos, além da conquista de uma amizade sincera, que apesar de nos separarmos pelo término do curso, será uma eterna lembrança de bons momentos compartilhados!

E finalmente, agradeço a todos que me ajudaram direto ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho. MEU MUITO OBRIGADO a todos vocês!

## **Riscos**

Rir é correr risco de parecer tolo.

Chorar é correr o risco de parecer sentimental.

Estender a mão é correr o risco de se envolver.

Expor seus sentimentos é correr o risco de mostrar  
seu verdadeiro eu.

Defender seus sonhos e idéias diante da multidão é  
correr o risco de perder as pessoas.

Amar é correr o risco de não ser correspondido.

Viver é correr o risco de morrer.

Confiar é correr o risco de se decepcionar.

Tentar é correr o risco de fracassar.

Mas os riscos devem ser corridos,  
porque o maior perigo é arriscar nada.

Há pessoas que não correm nenhum risco,  
não fazem nada, não têm nada e não são nada.

Elas podem até evitar sofrimentos e decepções, mas  
elas não conseguem nada,

não sentem nada, não mudam, não crescem,  
não amam, não vivem.

Acorrentadas por suas atitudes, elas viram escravas,  
privam-se de sua liberdade.

Somente a pessoa que corre riscos é livre!

Autor desconhecido

## RESUMO

### PRODUÇÃO DOS CAROTENÓIDES ATRAVÉS DO PROCESSO FERMENTATIVO UTILIZANDO LEVEDURA DO GÊNERO *RHODOTORULA*

Os carotenóides, tetraterpenóides sintetizados são obtidos através de diversas fontes, como plantas, algas e microorganismos que biossintetizam compostos nutracêuticos levando ao homem a necessidade de mudar seus hábitos alimentares. Alguns compostos são considerados precursores da vitamina A que atuam no organismo com a finalidade de diminuir o desenvolvimento de doenças degenerativas e anulação de radicais livres. Embora alguns fatores como fonte de carbono e nitrogênio, pH, temperatura, luminosidade, agitação e aeração possam influenciar o processo de produção dos carotenóides, a bioprodução pode ser influenciada não somente pelo crescimento celular, como também a produção de pigmentos. A utilização em escala industrial de carotenóides tem aumentado, devido à substituição de corantes sintéticos por corantes naturais, gerando preocupação com a quantidade de aditivos químicos nos alimentos. Sendo assim, os métodos biotecnológicos para a produção de corantes através de microorganismos, têm sido estudados observando o potencial das leveduras, em especial o gênero *Rhodotorula* que tem a capacidade de sintetizar diferentes tipos de terpenóides que podem acumular carotenóides como o toruleno,  $\beta$  – caroteno e a torularrodina.

Palavras-chave: Corantes. Fermentação. Biotecnologia

## **ABSTRACT**

### **CAROTENOIDS PRODUCTION THROUGH USING YEAST FERMENTATION OF THE GENUS RHODOTORULA**

*The carotenoids are synthesized tetraterpenóides obtained from various sources, such as plants, algae and microorganisms that biosynthesize leading nutraceutical compounds to man the need to change their eating habits. Some compounds are considered as precursors of vitamin A, which act in the body in order to decrease the development of degenerative diseases and cancellation of free radicals. Although such factors as source of carbon and nitrogen, pH, temperature, light, agitation and aeration could influence the production of the carotenoids, bioproduction may be influenced not only by cellular growth, as well as production of pigments. The use of carotenoids on an industrial scale has increased due to the substitution of synthetic dyes by natural dyes, causing concern with the amount of chemical additives in foods. Thus, the biotechnological methods for the production of dyes by microorganisms, have been studied by observing the potential of yeasts, especially the genus Rhodotorula which is capable of synthesizing different types of terpenoids that may accumulate carotenoids as torulene,  $\beta$  - carotene and torularhodin.*

*Keywords: Dyes. Fermentation. Biotechnology*

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA - 1. Representação das Estruturas do isopreno, da $\beta$ -ionona e do licopeno.....	14
FIGURA 2 - Transformação de $\beta$ -caroteno em vitamina A. ....	20
FIGURA 3 - Biossíntese dos carotenóides ( $C_{40}$ ) de leveduras.....	23
FIGURA 4 - Fluxograma dos estágios da biossíntese de carotenóides.....	24
FIGURA 5 - Estágios intermediários da biossíntese de carotenóides. ....	25
FIGURA 6 - Últimas etapas da biossíntese de carotenóides. Os carotenóides principais em alimentos encontram-se destacados.....	26
FIGURA 7 - Multiplicação das leveduras com formação de broto.....	30
FIGURA 8 – Esquema da célula de levedura.....	31
FIGURA 9 - Esquema da formação dos principais carotenóides sintetizados pelas leveduras do gênero <i>Rhodotorula</i> .....	34
FIGURA 10 - Comparação da fórmula estrutural dos pigmentos formados pela levedura do gênero <i>Rhodotorula</i> .....	35
FIGURA 11 - <i>Rhodotorula glutinis</i> .....	35
FIGURA 12 - Colônia de <i>Rhodotorula glutinis</i> . Fotografia de colônia crescida em ágar Sabouraud após três semanas a 25°C.....	36

## **LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 - Microorganismo Produtores de Carotenóides .....	18
TABELA 2 - Solventes empregados na extração de carotenóides em diferentes amostras. ....	28

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	13
2	OBJETIVO.....	16
3	CAROTENÓIDES .....	17
3.1	Fonte de Carotenóides .....	17
3.2	Ação dos Carotenóides no Corpo Humano.....	19
3.3	Fatores que influenciam a produção de carotenóides .....	21
3.4	Biossíntese dos Carotenóides.....	22
3.5	Extração de Carotenóides .....	27
3.6	Utilização Industrial de Carotenóides.....	28
4	CAROTENÓIDES EM LEVEDURAS .....	30
4.1	Leveduras .....	30
4.2	Leveduras produtoras de carotenóides.....	32
4.3	Leveduras do gênero Rhodotorula .....	33
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	37
	REFERÊNCIAS .....	38

# 1 INTRODUÇÃO

Os carotenóides são pigmentos naturais responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelho, presentes na natureza (UENOJO *et al.*, 2007 apud FRASER; BRAMLEY, 2004), identificados em organismos fotossintetizantes e não fotossintetizantes, plantas superiores, algas, fungos, bactérias e em alguns animais. Esses possuem mais de 600 estruturas caracterizadas, com uma produção estimada em 100 milhões de toneladas por ano.

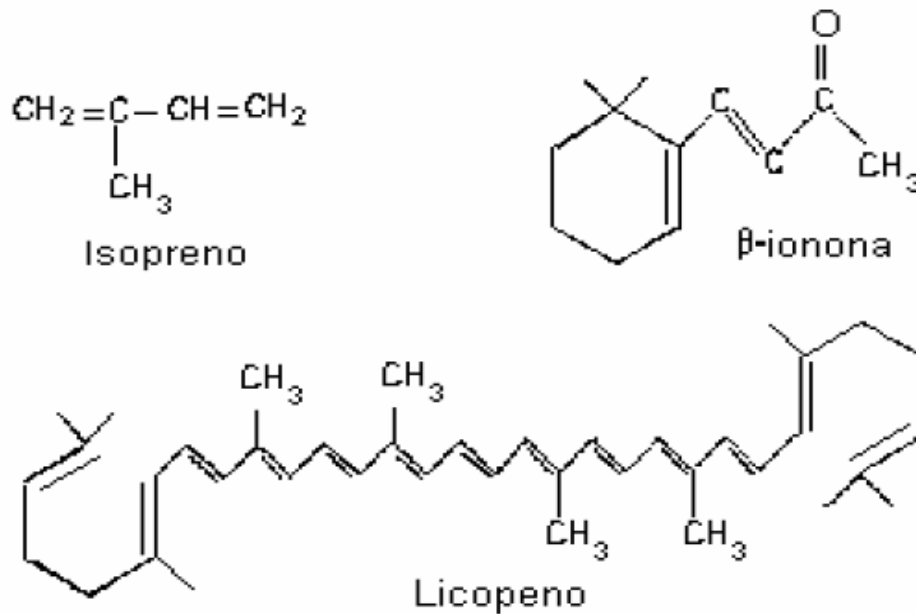
Responsáveis pela cor da maioria das frutas e vegetais podem atuar como corantes e enriquecimento de alimentos, sendo utilizados devido sua atividade pró – vitamínica, e suas propriedades que resultam em funções biológicas benéficas à saúde (BONADIO, 2009), assumindo grande importância em animais e humanos, incluindo o aumento da resposta imune, a conversão para a vitamina A e a eliminação de radicais de oxigênio (VOAIDES; DIMA, 2011 apud KIOKIAS; GORDON, 2004).

Segundo Guaratini (2008) apud Wrona *et al.*,(2003) os carotenóides constituem uma ampla classe de isoprenóides, caracterizados estruturalmente por uma longa cadeia de duplas ligações conjugadas, podendo ser subdividido em dois grandes grupos, os carotenos, e as xantofilas.

A partir de suas diferentes estruturas biossintetizadas por alguns microorganismos, plantas e algas, apresentam como características principais sua velocidade de desativação de oxigênio que pode acontecer pela transferência física de sua energia e/ou por sua reação química, sendo que nas condições normais no organismo 95% da desativação do oxigênio é física, sendo apenas 5% a reação quimicamente, tornando os carotenóides antioxidantes mais efetivos (GUARATINI, 2008 apud MORDI *et al.*, 1993; BURRI, 1997; PALACE *et al.*, 1999). Esses são susceptíveis às oxidações enzimáticas ou não enzimáticas, que dependem de sua estrutura, observando a disponibilidade de oxigênio, presença de enzimas, metais, pró-oxidantes, alta temperatura e exposição à luz (VALDUGA *et al.*, 2009).

De acordo com Morais (2006), os carotenóides são quimicamente definidos como tetraterpenóides  $C_{40}$  (hidrocarbonetos de ocorrência natural e seus derivados), ou seja, união de oito unidades isoprenóides ( $C_5$ ) de cinco átomos de carbono, exceto a crocetina e a bixina, que possuem menos de quarenta átomos de carbono na cadeia carbônica, conforme figura (Figura 1). A cadeia carbônica de alguns carotenóides apresenta um ou dois anéis  $\beta$  – ionone nas extremidades.

FIGURA - 1. Representação das Estruturas do isopreno, da  $\beta$ -ionona e do licopeno (MORAIS, 2006 apud RIBEIRO; SERAVALLI, 2004).



A produção biotecnológica de carotenóides vem se destacando devido a fatores tais como denominação de substâncias naturais; possibilidade de utilização de substratos de baixo custo para bioprodução; pequeno espaço para produção, não estando sujeitas às condições ambientais como clima, estação do ano ou composição do solo e controle das condições de cultivo (VALDUGA *et al.*, 2009).

Através de muitos microorganismos ocorrem a produção de carotenóides, porém nem todos são industrialmente interessantes. As leveduras destacam-se por sua capacidade de produção de pigmento em substratos de baixo custo, alto teor de açúcar e como fonte protéica. Os gêneros capazes de produzi-lós são *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces* e *Phaffia*. O gênero *Rhodotorula*, possui alto potencial para a produção e comercialização de carotenóides, sendo capaz de sintetizar terpenóides a partir de substratos naturais como xarope de glicose, melão de beterraba, mosto de uva e extrato de farinha de soja (BONADIO, 2009).

As leveduras são mais convenientes do que as algas para a produção em larga escala em fermentadores, devido à sua natureza unicelular e alta taxa de crescimento (VOAIDES; DIMA, 2011).

Contudo os tipos de carotenóides podem variar de acordo com as condições do meio de cultura, tais como fonte de carbono e nitrogênio, temperatura, pH, taxa de aeração e luminosidade (VALDUGA *et al.*, 2009).

## **2 OBJETIVO**

O presente trabalho objetivou descrever de um modo geral os carotenóides, tipos de fonte, ação no organismo, e a utilização de microorganismos destacando-se as leveduras, em especial do gênero *Rhodotorula* para bioprodução de pigmentos.

## 3 CAROTENÓIDES

### 3.1 Fonte de Carotenóides

Presentes em todos os organismos fotossintéticos, os carotenóides são responsáveis por diversas cores desde o amarelo ao vermelho de muitos legumes, frutas, flores, animais como peixes, crustáceos, pássaros e insetos, hortaliças, tubérculos e microorganismos – levedura (NASCIMENTO, 2006).

Em plantas superiores, estão localizados no cloroplasto e cromoplastos (organelas subcelulares). Nos cromoplastos, são depositados como gotículas de óleo (ex. páprica e manga) ou na forma cristalina (ex. cenouras e tomates). Nos cloroplastos atuam como pigmentos fotoprotetores na fotossíntese e como estabilizadores de membranas, sendo normalmente mascarado pela presença de outros pigmentos clorofílicos dominantes, associados principalmente a proteínas (SILVA *et al.*, 2010 apud KURZ, CARLE; SCHIEBER, 2008).

Em vegetais folhosos, a luteína,  $\beta$  – caroteno, violoaxantina e neoxantina são os principais carotenóides, e  $\alpha$  – caroteno,  $\beta$  – criptoxantina e  $\alpha$  – criptoxantina são encontradas em pequenas quantidades. A concentração de carotenóides das folhas é interferida de acordo com a maturidade. Nos seres vivos, a maior concentração está no fígado e no tecido adiposo, podendo também ser encontrado nos rins, coração, pulmão, cérebro, plasma e pele (MORAIS, 2006 apud RODRIGUEZ - AMAYA, 1999).

No processo biotecnológico a produção de carotenóides tem sido analisada, destacando-se a produção comercial de  $\beta$  – caroteno pelas microalgas marinhas *Dunaliella*, e pelo fungo *Blakeslea trispora*. Leveduras do gênero *Rhodotorula* são conhecidas como produtoras de carotenóides variando sua concentração de 10 a 100  $\mu\text{g/g}$  de biomassa seca. Os principais carotenóides identificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram  $\beta$  – caroteno, toruleno e torulahodina (VALDUGA, 2005).

A tabela a seguir nos mostra as espécies produtoras de carotenóides:

TABELA 1 - Microorganismo Produtores de Carotenóides

<b>Espécies</b>	<b>Carotenóides Principais</b>
<b>1. Cianobactéria</b>	
<i>Anabaena variabilis</i>	Cantaxantina
<i>Aphanizomenon flos – aqua</i>	Cantaxantina
<i>Nostoc commune</i>	Cantaxantina
<b>2. Algas</b>	
<i>Chorela pyrenoidosa</i>	Luteína ((3R, 3'R, 6'R) – $\beta$ , $\epsilon$ - caroteno – 3,3'-diol)
<i>Spongiococcum excetricum</i>	Luteína
<i>Haemotococcus pluviialis</i>	Astaxantina
<i>Dictyococcus cinnabarinus</i>	Cantaxantina
<i>Haematococcus pluviialis</i>	Astaxantina
<b>3. Fungos e Leveduras</b>	
<i>Blakeslea trispora</i>	$\beta$ -caroteno e licopeno
<i>Rhodotorula sp</i>	Toruleno e $\beta$ -caroteno
<i>Rodosporidium sp</i>	Toruleno e $\beta$ -caroteno
<i>Dacrymyces deliquescens</i>	Luteína
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Toruleno e torulahodina (3', 4'dideidro – $\beta$ , $\Psi$ – caroten – 16'-oico)
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxantina
<i>Sporobolomyces</i>	$\beta$ -caroteno e toruleno
<i>Sporidiobolus sp</i>	Toruleno, torulahodina e $\beta$ -caroteno

(VALDUGA, 2005 apud WELSH, 1995)

### 3.2 Ação dos Carotenóides no Corpo Humano

Inúmeros fatores afetam a qualidade de vida moderna, de forma que a população deve conscientizar-se da importância de alimentos que auxiliam a promoção da saúde, trazendo com isso uma melhora do estado nutricional. Os alimentos nutracêuticos se encaixam nesse perfil, pois além de apresentarem benefícios à saúde incluem a prevenção e/ou tratamento de doenças.

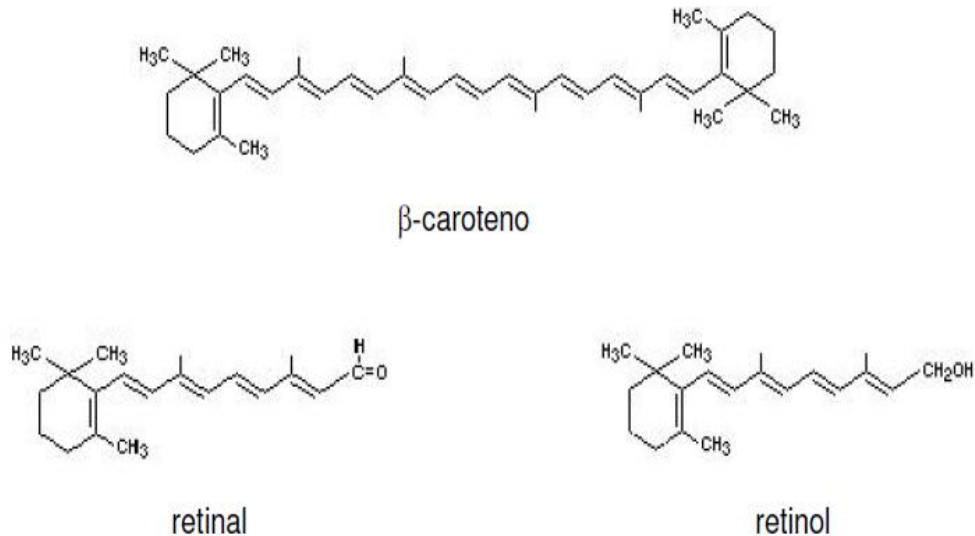
Diante dessa realidade, há um interesse crescente em substituir os corantes artificiais pelos biossintetizados. Dentre eles destacam-se os carotenóides.

Um nutriente que é encontrado apenas em alimentos de origem animal, a vitamina A está presente em diversas formas, sendo em retinol, ácido retinóico, retinal e retinil (CAMPOS; ROSADO, 2005).

Segundo Sancho (2006) apud Siqueira (1997), o papel mais importante e conhecido dos carotenóides é o do  $\beta$  – caroteno, com sua atividade pró – vitamina A, em que está presente em uma classe de antioxidante biológico, sendo eficiente sob baixas pressões parciais de oxigênio, condições encontradas na maioria dos tecidos.

A atividade pró – vitamínica A é a função biológica mais conhecida e atribuída aos carotenóides além do poder de corante, podendo ser convertidos àqueles que possuem pelo menos um anel  $\beta$  – ionona não substituído que está ligado a uma cadeia poliênica conjugada de no mínimo 11 carbonos. Através da clivagem central, um mecanismo principal, a transformação de carotenóide pró – vitamínicos A é dividido ao meio, formando duas moléculas de retinal sendo um  $\beta$  – caroteno, ou em carotenóides pró – vitamínicos A, sendo o mesmo transformado em retinol (NASCIMENTO, 2006).

FIGURA 2 - Transformação de  $\beta$ -caroteno em vitamina A (NASCIMENTO, 2006).



Ativa para a promoção de crescimento, função visual e desenvolvimento embrionário a vitamina A e os carotenóides, dependem das fontes disponíveis de alimento e hábitos dietéticos (SCHWARTZ, 2010). Ações que promovem a diminuição do risco ao câncer, bloqueio da degeneração macular, diminuição ao risco de catarata, eficiência do sistema imunológico e prevenção de doença cardiovascular também são conferidos aos carotenóides (HIANE *et al.*, 2003 apud RODRIGUEZ – AMAYA, 1997), que além disso, desempenham um importante papel na fotossíntese atuando como pigmento acessório, protegendo contra a foto – oxidação e coleta de energia (SANCHO, 2006).

De acordo com a disponibilidade de oxigênio, exposição à luz, altas temperaturas, presença de enzimas, metais, prooxidantes e antioxidantes, os carotenóides são ainda suscetíveis às oxidações enzimáticas, reação esta que depende de sua estrutura (VALDUGA, 2005 apud SCHROEDER; JOHNSON, 1995).

Segundo Silva *et al.*, (2010) apud Sikora *et al.*, (2008), a respiração e diversas reações oxidativas em células aeróbias, induzem ao desenvolvimento de radicais livres, que acarretam danos ao organismo contribuindo para o aparecimento de muitas doenças. Por este motivo, as células humanas necessitam de certa disposição de antioxidante para a proteção contra os efeitos prejudiciais de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, que são resultados inevitáveis da vida aeróbia. Através da absorção dos radicais livres, os compostos antioxidantes interrompem a cadeia de propagação das reações oxidativas geradas pelos

radicais ou bloqueiam a cadeia de iniciação.

O licopeno, caroteno presente em produtos de tomate, previne a oxidação do LDL (Low Density Lipoproteins - que significa proteínas de baixa densidade responsável por transportar o colesterol do fígado até as células de vários outros tecidos, estando diretamente relacionados a doenças cardíacas) e reduz o risco do desenvolvimento de arteriosclerose e doenças coronárias, além disso, outras pesquisas sugerem que este carotenóide pode reduzir o câncer de próstata, pulmão, pele e bexiga (VALDUGA, *et al.*, 2009).

### **3.3 Fatores que influenciam a produção de carotenóides**

Os carotenóides são utilizados em indústrias como corantes com o objetivo de repor a cor perdida durante o processamento e armazenamento de alimentos, além de conceder cor aos alimentos incolores e de uniformizar a coloração de alguns produtos. Estes atuam como precursores de vários compostos químicos responsáveis pelas fragrâncias de algumas flores, aroma de alguns alimentos e coloração específica, além de serem utilizados para colorir cápsulas de medicamentos e cosméticos (MEZZOMO, 2012 apud KLAUI; BAUERNFEIND, 1981; NIIZU, 2003).

Para a bioprodução dos carotenóides, as condições físicas e nutricionais da cultura são fatores que influenciam diretamente a produtividade, afetando não somente o crescimento celular como a produção de pigmento. Portanto, o estresse das condições ambientais induzem os microorganismos acumularem vários tipos de carotenóides (VALDUGA *et al.*, 2009; BHOSALE, 2004).

A biossíntese junto com as condições de cultivo, é transportada pelo nível, atividades de enzimas biossintética e o fluxo total de carbono do sistema sintetizante. Deste modo, uma ampla produção pode ser alcançada, alterando – se as atividades enzimáticas e o nível, pelo uso de uma abordagem molecular. Segundo Tatsch (2008) e Bhosale (2004), pode-se obter uma melhor produção de carotenóides com custo efetivo, empregando estimulantes no meio e ajustando as condições externas do cultivo.

Mudanças de pH na fermentação são naturalmente ocasionadas através da biossíntese de carotenóides (ZENI, 2009 apud FRENGOVA *et al.*, 1994), que decresce nas primeiras 72

horas de bioprodução, seguindo de uma elevação durante a fase intensa de carotenogênese. O pH exerce grande influência sob o crescimento celular e a formação de produto. Sendo assim, o pH inicial na produção de carotenóides é um objeto de estudo (VALDUGA *et al.*, 2009).

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes que influenciam o crescimento e desenvolvimento dos microorganismos, ocasionando alterações em diversas vias biossintéticas, inclusive na carotenogênese (SCHWARTZ, 2010). Através do controle na concentração de enzimas envolvidas na produção de carotenóides, a temperatura pode ocasionar mudanças na concentração enzimática, o que leva ao controle do nível de carotenoides nos microorganismos (TATSCH, 2008).

A intensidade e forma de iluminação variam com o microorganismo. Descrita em dois aspectos, a teoria da foto indução, no primeiro aspecto o efeito da luz sobre o crescimento do microorganismo exerce papel fundamental, estimulando sua produção; no segundo aspecto considera que o acúmulo de carotenóides na célula está associado com o aumento da atividade das enzimas envolvidas na biossíntese de carotenóides (BHOSALE, 2004).

Microorganismos aeróbios precisam das melhores condições de aeração e agitação para maior rendimento (SCHWARTZ, 2010). Portanto estes são fatores que influenciam o metabolismo dos microorganismos para a produção de carotenóides.

Pesquisas para a produção de corantes naturais têm sido desenvolvidas com objetivo de selecionar linhagens produtoras de carotenóides, aperfeiçoar metodologias de cultivo para redução de custos com a bioprodução, e aumento na produção de corantes para sua aplicação em escala industrial, tornando a bioprodução competitiva com a síntese química (VALDUGA *et al.*, 2009).

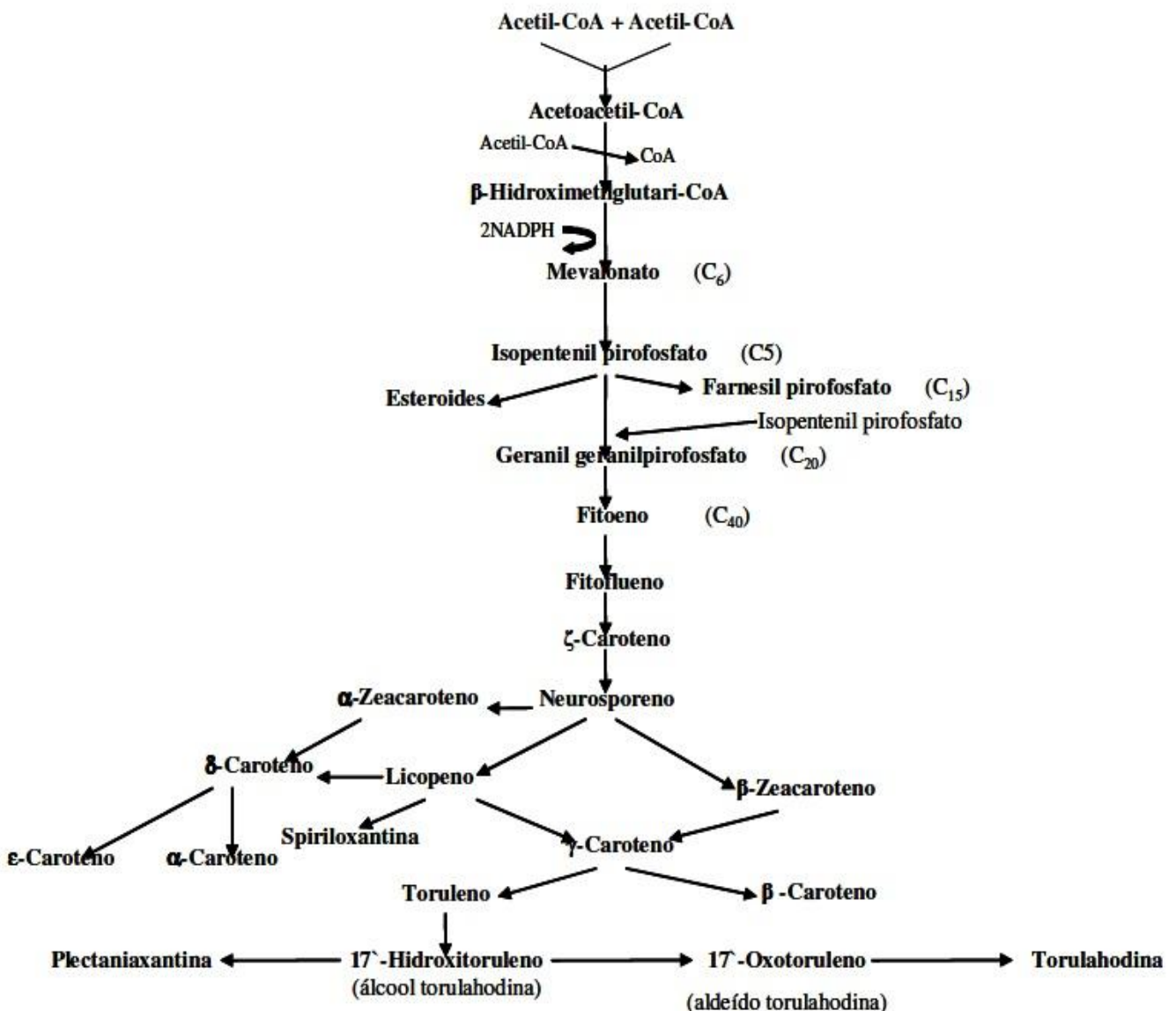
### **3.4 Biossíntese dos Carotenóides**

Os carotenóides são tetraterpenoides sintetizados em organismos fotossintéticos, algas, bactérias, plantas e leveduras, sendo sua maioria compostos de uma ligação central de carbono alternando ligações simples e duplas com distintos grupos cíclicos ou acíclicos em sua extremidade, na qual suas maiores funções bioquímicas são definidas por seu sistema prolongado de ligações duplas conjugadas, que também é responsável pela sua cor

(SCHWARTZ, 2010 apud BRITTON, 1995).

Um grupo de pigmentos contendo unidades repetidas e ramificadas de  $C_5$ , os carotenóides proporcionam a biossíntese em três estágios diferentes, demonstrados na Figura 3 sendo: síntese terpenóide básico  $C_5$ ; síntese de compostos  $C_{40}$ , a partir dos intermediários terpenícos; e a transformação do  $C_{40}$  para formação dos diversos carotenóides. A partir da síntese de carotenóides, os estágios iniciais seguem vias comuns da biossíntese de esteróides, sendo intermediários ao Acetoacetyl - CoA, mevalonato, isopentenil pirofosfato, geranylgeranylpirofosfato e farnesil pirofosfato que tem sido relacionados a formações de carotenóides (VALDUGA, 2005 apud RATLEDGE; EVANS, 1989).

FIGURA 3 - Biossíntese dos carotenóides ( $C_{40}$ ) de leveduras (VALDUGA, 2005 apud RATLEDGE; EVANS, 1989)



O primeiro precursor na biossíntese dos terpenoides é o ácido mevalônico – precursor específico da unidade isopreno de cinco carbonos (MORIEL, 2004) – que depois uma série de reações como a hidrogenação, desidrogenação, ciclização ou oxidação (Figura 4), forma geranyl difosfato (10 C), farnesil difosfato (15 C) e geranyl – geranyl difosfato (20 C), sendo que a dimerização desta última forma o fitoeno – primeiro composto de quarenta carbonos, apesar de ainda não possuir coloração – e uma série de desnaturação a partir do fitoeno, forma-se fitoflueno,  $\zeta$ -caroteno, neurospreno e por fim licopeno (Figura 5) (VALDUGA *et al.*, 2009)

FIGURA 4 - Fluxograma dos estágios da biossíntese de carotenóides (VALDUGA *et al.*, 2009 apud SILVA, 2004)

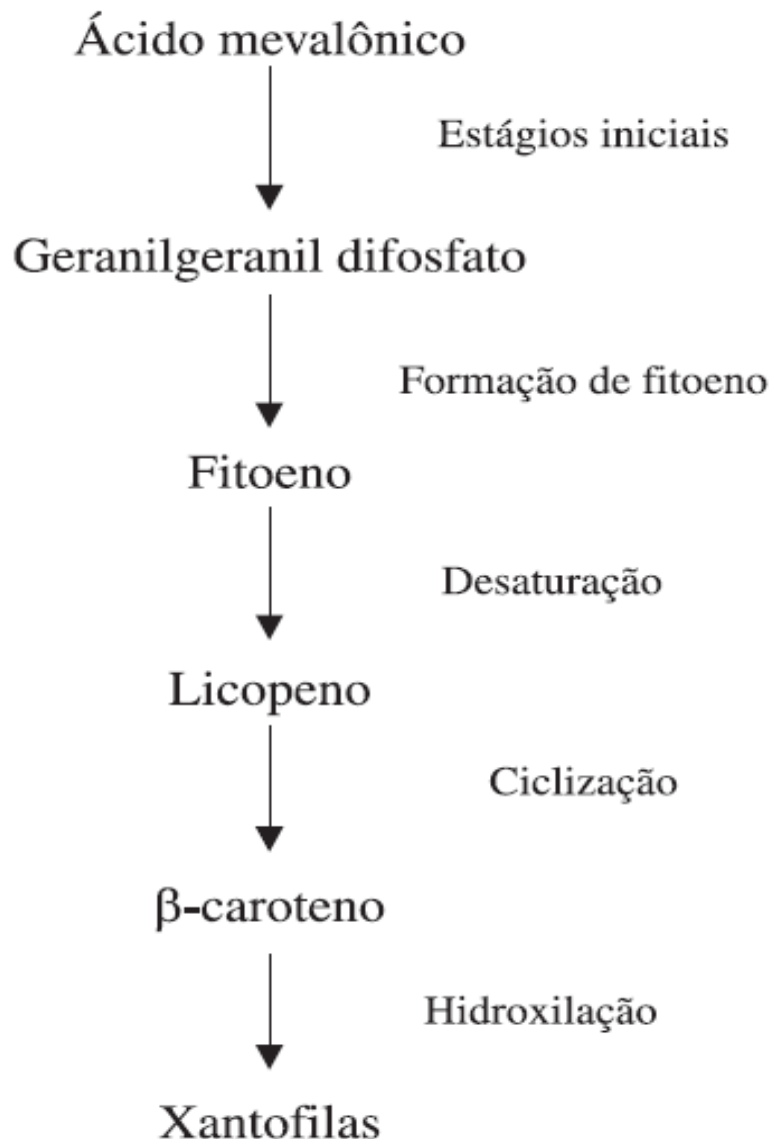
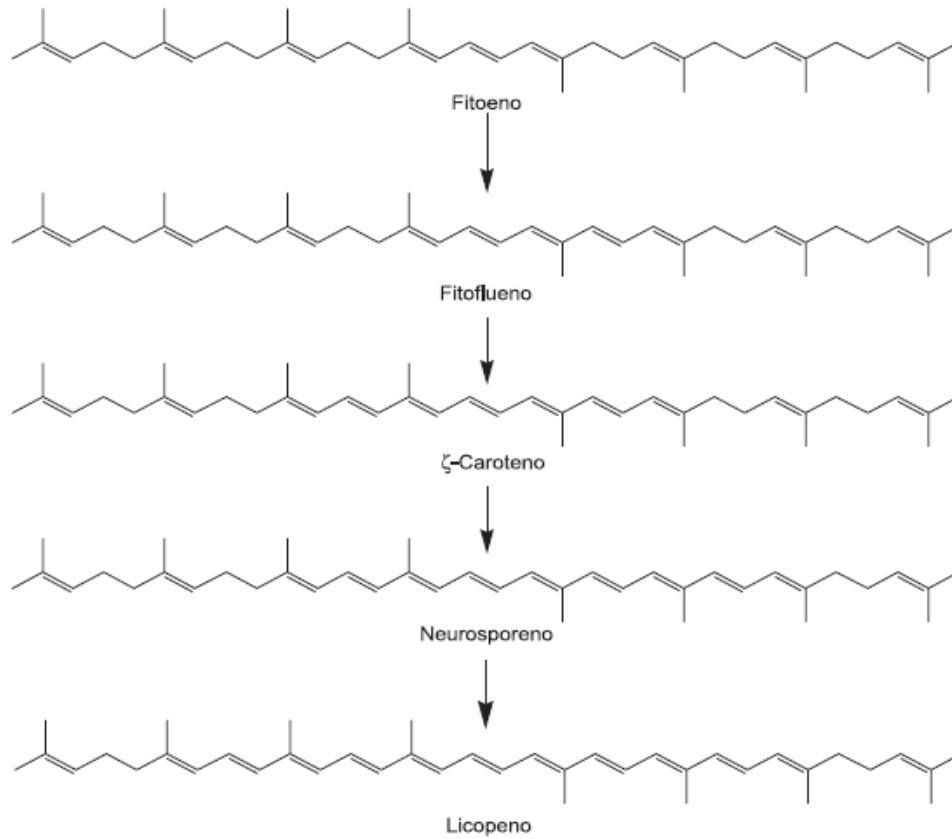
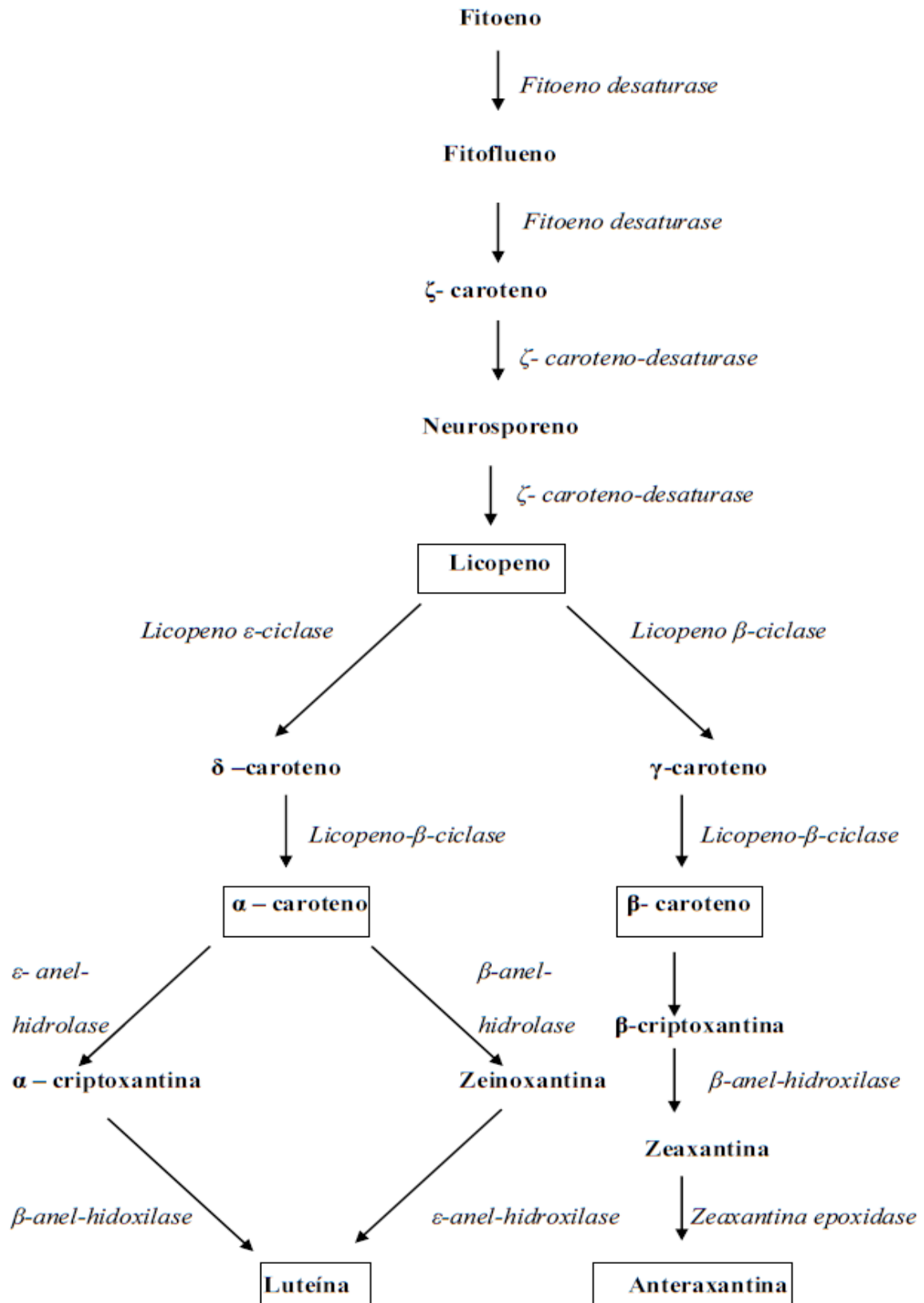


FIGURA 5 - Estágios intermediários da biossíntese de carotenóides (VALDUGA *et al.*, 2009 apud SILVA, 2004).



Segundo Barbosa (2010) através de uma série de desidrogenações, há formação de outros carotenos. As últimas etapas do caminho biossintético dos carotenóides, destacando o desenvolvimento dos principais carotenóides em alimentos são apresentados na figura 6.

FIGURA 6 - Últimas etapas da biossíntese de carotenóides. Os carotenóides principais em alimentos encontram-se destacados (BARBOSA, 2010 apud RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008).



### 3.5 Extração de Carotenóides

O rompimento das células microbianas para adquirir os produtos intracelulares é fundamentado em técnicas mecânicas tais como a alta pressão, homogeneização, e trituração de grânulo. Contudo, essas técnicas sofrem inconvenientes, incluindo o alto custo, longo tempo de processamento e a produção de restos de células. Sendo assim, a extração química é um substituto possível para o rompimento mecânico das células devido seu baixo custo, simplicidade, e velocidade relativa (SCHWARTZ, 2010 apud MIDDELBERG, 1995).

Segundo Quirós; Costa (2006) o método mais comumente utilizado para a extração de carotenóides é o solvente. Por possuir uma estrutura complexa e a variedade desses compostos encontrados em amostras vegetais, não há um protocolo único para sua extração, pois os carotenóides são pigmentos lipossolúveis não saponificáveis, é comum obter uma etapa de saponificação para retirar os lipídios que possam interferir nas etapas de extração com solventes apolares. Através da utilização de uma solução de base, como por exemplo o hidróxido de potássio em solvente polar, como metanol ou etanol, a saponificação pode ser realizada, na qual os carotenóides são posteriormente extraídos (MARINOVA; RIBAVORA, 2007). Enfim, diversos solventes ou misturas podem ser utilizados para extração dos carotenóides conforme a tabela 2.

TABELA 2 - Solventes empregados na extração de carotenóides em diferentes amostras.

Amostra	Solvente de Extração	Referências
Cenoura, grãos verdes e brócolis	Tetrahidrofurano	McINERNEY <i>et al.</i> , 2007
Suco de tomate	Tetrahidrofurano	SANCHEZ-MORENO <i>et al.</i> , 2006
Frutas vermelhas bulgarianas	Metanol tetrahidrofurano (1:1, v/v)	MARINOVA; RIBAVORA, 2007
Calêndulas	Hexano	WANG <i>et al.</i> , 2006
Plantas comestíveis da Tailândia	Hexano	CHANWITHEESUK <i>et al.</i> , 2005
Dunaliella salina	Hexano, acetona etanol (2:1:1, v/v/v)	HU <i>et al.</i> , 2008
Rhodotorula	Éter etílico, acetato de etila e éter etílico/ acetato de etila (1:1)	SQUINA; MERCADANTE, 2003

(Silva *et al.*, 2010 - adaptado)

### 3.6 Utilização Industrial de Carotenóides

Em 1954 iniciou-se a produção industrial de  $\beta,\beta$  – caroteno, e desde então vem sendo desenvolvido a síntese comercial de carotenóides. Atualmente, por ano são vendidos cerca de US\$ 300 milhões em carotenóides sintéticos (BRITTON *et al.*, 1995). Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de provar que a suplementação diária de carotenóides previne várias doenças crônicas e degenerativas, inflamações, carcinogênese entre outras induzidas por radiação ultravioleta (GIORI, 2010 apud ZANATTA, 2004), despertando assim, a intensa produção e comercialização de carotenóides para utilização em alimentos.

Conforme Britton, (1995), os dois principais produtores industriais são Hoffmann –La Roche e BASF, produzindo seis tipos de carotenóides diferentes, sendo o  $\beta,\beta$  – caroteno, a

astaxantina, os apocarotenoides, a cantaxantina, e a citranaxantina.

A produção industrial de carotenóides é obtido por extração de plantas, algas ou por via química. No entanto, devido à preocupação com o uso de aditivos químicos nos alimentos, existe um interesse crescente nos carotenóides obtidos naturalmente por processos biotecnológicos, que comercialmente são usados como corantes alimentícios e em suplementos nutricionais, sendo também considerados precursores de fragrâncias de algumas flores, assim como sua coloração específica e fotoproteção (VALDUGA, 2005).

De acordo com Ribeiro (2008), os carotenóides sintéticos são purificados por cristalização, com a finalidade de formar cristais, que através da filtração podem ser facilmente separados e lavados dos isômeros *cis* e dos subprodutos remanescentes na solução. Para serem empregados na indústria e comercializados, os carotenóides precisam ser formulados para aplicação em matrizes lipofílicas (manteigas, margarinas e queijos) ou hidrofílicas (sucos e bebidas), sendo necessária a diminuição dos cristais.

Por meio dos métodos biológicos a produção de pigmentos tem surgido como um crescente segmento do mercado industrial. Estes são aplicados em indústrias cosméticas, farmacêutica e alimentos como suplemento nutricional. Várias companhias biotecnológicas desde o início dos anos 80 têm desenvolvido métodos para produzir pigmento em culturas bacterianas, fungos e algas (PASSOS, 2007, VALGUGA *et al.*, 2009).

Normalmente, os carotenóides entram em mercados existentes para substituição daqueles obtidos através da síntese química. Porém, para sobreviver, os materiais produzidos biologicamente devem oferecer vantagens em seu emprego custo e/ ou conformidade com as normas. As três principais categorias emergentes de biopigmentos deste mercado são xantofilas, melanina e os carotenóides (PASSOS, 2007, VALGUGA *et al.*, 2009).

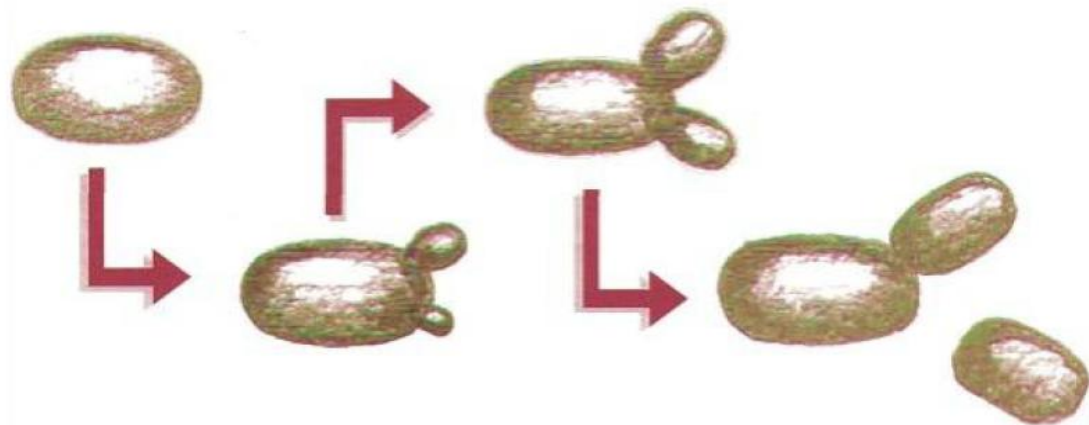
## 4 CAROTENÓIDES EM LEVEDURAS

### 4.1 Leveduras

As leveduras são importantes membros de um ecossistema, contribuindo significativamente para a biodiversidade na natureza, realizando em suas atividades metabólicas transformações bioquímicas inteiramente relacionadas com os ciclos biogeoquímicos e também na síntese de vários compostos, atuando em diversos níveis da cadeia trófica (CABRAL, 2009 apud ATLAS; BARTHA, 1997).

Constituinte do grupo de microorganismos eucariotos unicelulares, as leveduras se reproduzem sexuadamente obtendo zigoto, ou assexuadamente, formando brotos ou gemas (Figura 7) (SANTOS, 2008).

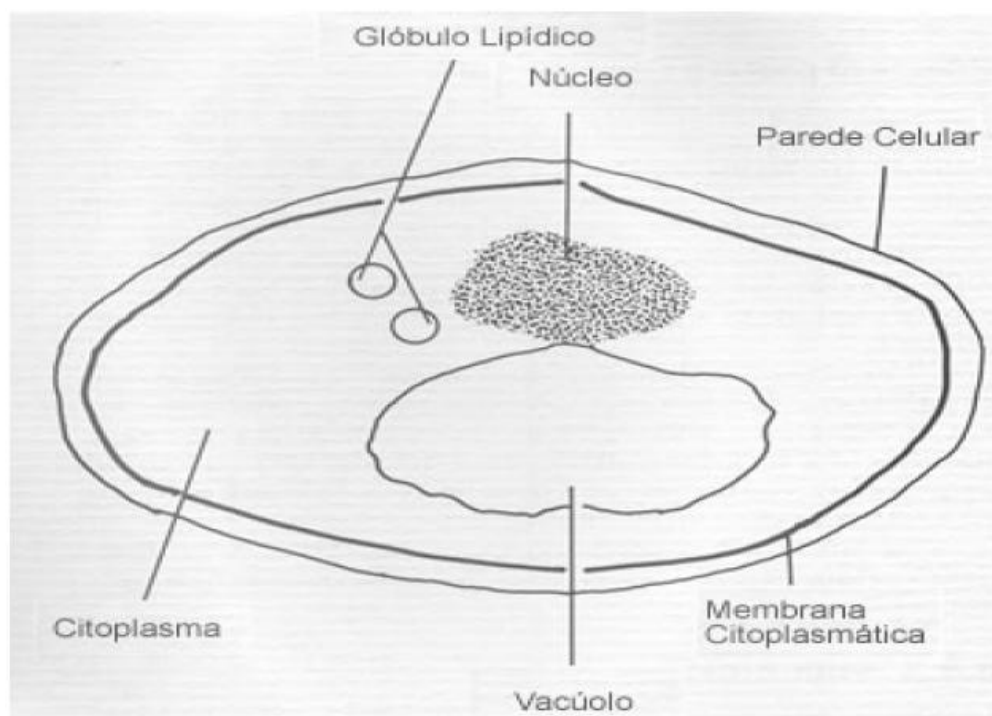
FIGURA 7 - Multiplicação das leveduras com formação de broto (SANTOS, 2008)



Amplamente encontrada na natureza, sendo comum em líquidos açucarados, superfície de órgãos vegetais, principalmente em flores e frutos, trato intestinal de animais, no solo, entre outros. Suas células são ovais, esféricas ou elípticas podendo ser alargadas (Figura 8), e suas dimensões variam em função da espécie e nutrição (VIEIRA, 2011), já que são capazes de utilizar diversos substratos para sua nutrição absorptiva. Características como essa, permitem que as leveduras secretem enzimas extracelulares, sendo liberadas ao meio

apresentando a capacidade de degradar macromoléculas a moléculas menores que podem ser agrupadas e utilizadas nutricionalmente (OLIVEIRA *et al.*, 2009), além de exercer um importante papel na utilização das fontes de nitrogênio e carbono disponíveis promovendo assim sua manutenção e propagação (SANTOS, 2010).

FIGURA 8 – Esquema da célula de levedura (VIEIRA, 2011 apud TORTORA *et al.*,2002)



Sob vários aspectos biotecnológicos, as leveduras podem ser utilizadas, na panificação, agentes de fermentação alcoólica, consideradas importantes fontes de proteínas e de fatores de crescimento, suplementos protéico na alimentação humana e animal, (MELO, 2006 apud TUSE, 1984) devido seu alto teor de proteínas, composição balanceada de aminoácidos, e várias vitaminas do complexo B. Tais microorganismos são de grande interesse no campo dos alimentos por apresentarem valor nos aspectos nutritivos e aromáticos (ROEPCKE, 2007).

Segundo Roepcke (2007) as leveduras do ponto de vista tecnológico apresentam vantagens em relação a outros microorganismos, por apresentar alta taxa de crescimento e facilidade de separação de sua biomassa, assimilando grande variedade de substratos.

De acordo com Oliveira *et al.*, (2009), através de técnicas convencionais as leveduras

são tradicionalmente identificadas baseadas em características fisiológicas e morfológicas – macro e micro – dentre elas: crescimento em diferentes temperaturas, crescimento em diferentes concentrações de glicose e cloreto de sódio, fermentações de diferentes fontes de carbono, assimilação de diferentes fontes de nitrogênio e carbono, tolerância ao ácido acético, e produção extracelular de compostos amiloides.

Entre diversos microorganismos, as leveduras apresentam grandes vantagens para a produção de carotenóides, constituindo em: ser de natureza unicelular e eucarionte; possuir a capacidade de utilizar substratos de baixo custo para seu crescimento; conseguir elevada taxa de crescimento; e admitir a possibilidade de controlar as condições de cultivo para garantir a produção de carotenóides de maior importância e interesse (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

## 4.2 Leveduras produtoras de carotenóides

Excelentes produtoras de carotenóides, algumas leveduras destacam-se apresentando uma alternativa em relação à produção de corantes sintéticos (BONADIO, 2009). Leveduras produtoras de carotenóides são seres de nutrição quimio-heterotrófica absorvitiva podendo ser identificadas através de técnicas convencionais e técnicas moleculares como pertencentes aos grupos de ascomicetos, basidiomicetos. Os carotenóides em leveduras têm sido considerados como um metabólito secundário, atuando principalmente contra os danos oxidativos causados pela luz, que podem afetar o crescimento e sobrevivência no ambiente (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

De acordo com Valduga *et al.*, (2009), estudos realizados mostram que os microorganismos que tem demonstrado potencial para a produção de carotenóides são: *Rhodotorula*, *Phaffia rhodozyma*, *Sporobolomyces*, *Blakeslea trispora*, *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis*, sendo que os carotenóides naturais mais pesquisados são a astaxantina,  $\beta$ -caroteno, cantaxantina, toruleno e licopeno.

Dentre as basidiomicéticas, leveduras identificadas pertencentes aos gêneros *Sporobolomyces* e *Rhodotorula*, são conhecidas pela produção de carotenóides como o toruleno,  $\beta$  – caroteno,  $\alpha$  – caroteno e torularrodina. A especificidade entre elas destaca-se que o gênero *Rhodotorula* produzem os carotenóides acima em diferentes proporções; já o gênero *Sporobolomyces* é produtora de carotenóides do tipo  $\beta$  – caroteno, torularrodina e toruleno. No entanto, a levedura *Phaffia rhodozyma* tem se destacado pela síntese do carotenóide

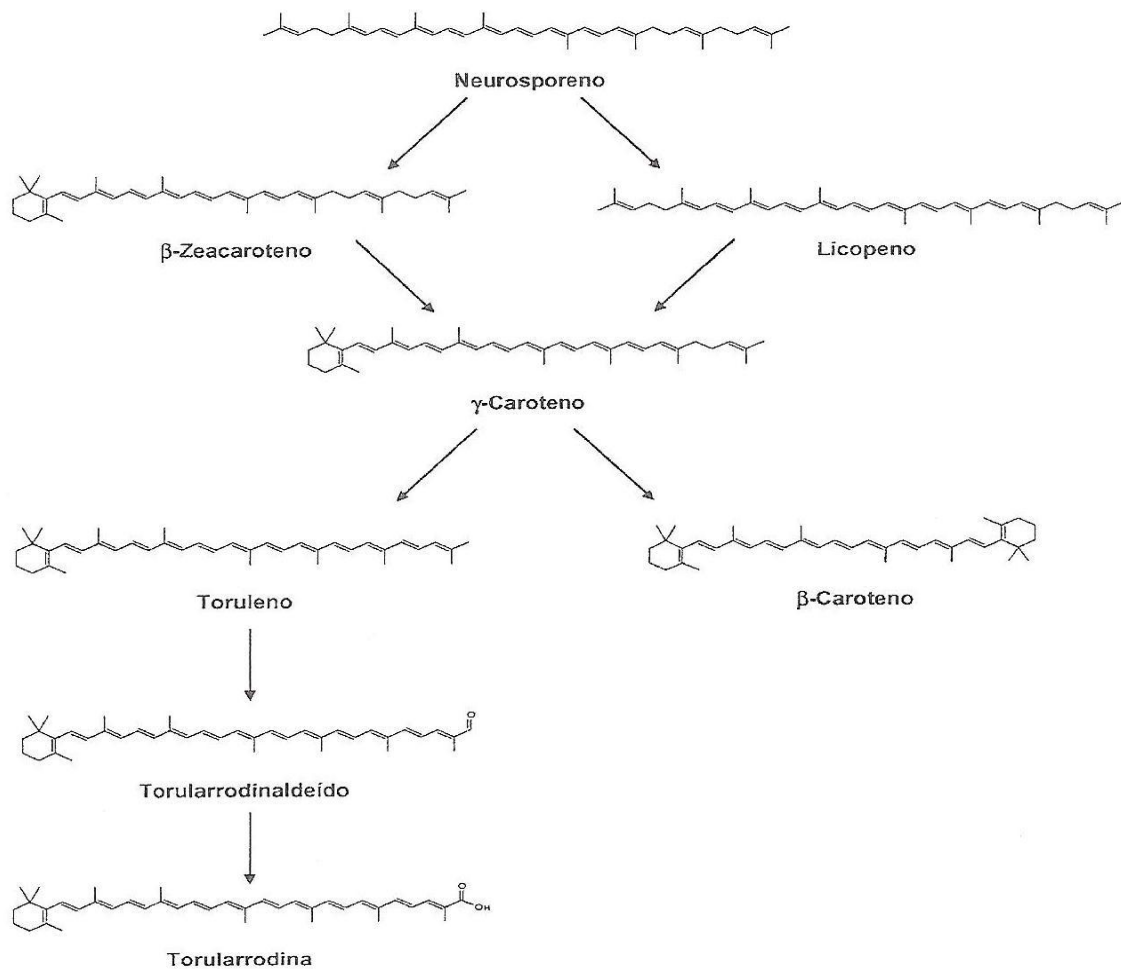
astaxantina, dependendo das condições do processo fermentativo e de sua linhagem, na qual varia de 40% a 95% do total de carotenóides acumulado (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Várias pesquisas têm sido desenvolvidas para a produção de carotenóides através das leveduras, porém para se aperfeiçoar o processo é necessário observar fatores que interferem no desenvolvimento destes microorganismos como temperatura, pH, agitação, aeração, iluminação, tipos de aplicação das fontes de carbono e nitrogênio a composição do cultivo, agentes químicos, além da utilização de engenharia genética através de clonagens de genes carotenogênicos.

### **4.3 Leveduras do gênero *Rhodotorula***

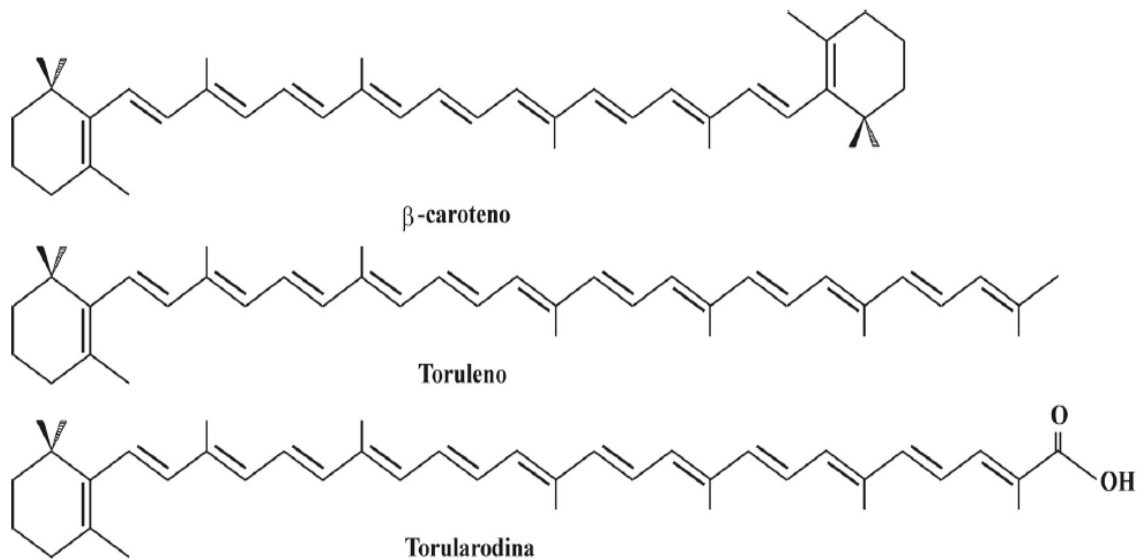
Apresentando alto potencial para produção comercial de carotenóides, as linhagens de leveduras do gênero *Rhodotorula* são capazes de sintetizar terpenóides a partir de substratos naturais, tais como xarope de glicose, extrato de farinha de soja e melão de beterraba (BONADIO, 2009).

FIGURA 9 - Esquema da formação dos principais carotenóides sintetizados pelas leveduras do gênero *Rhodotorula* (BONADIO, 2009 apud SILVA, 2004)



Segundo Branco (2010) o gênero *Rhodotorula* caracteriza-se pela presença de pigmentos carotenóides, reproduzindo-se exclusivamente por gemulação sem produção de esporos. Os pigmentos presentes neste gênero são β – caroteno, α – caroteno, toruleno e torularrodina (Figura 10), sendo rosados e vermelhos e em sua maioria possuem cor laranja ou salmão (VIEIRA, 2011), podendo alcançar até 330 mg/g carotenóides por célula seca em 6 – 7 dias de fermentação (RIBEIRO, 2008).

FIGURA 10 - Comparação da fórmula estrutural dos pigmentos formados pela levedura do gênero *Rhodotorula* (BRANCO, 2010 apud PARK *et al.*, 2007)



Dentre o gênero *Rhodotorula*, há algumas espécies produtoras de carotenóides, tais como a *R. glutinis*, *R. minuta*, *R. mucilaginoso*, *R. graminis* (RIBEIRO, 2008), sendo que as duas espécies mais abundantes são a *Rhodotorula glutinis* e *Rhodotorula mucilaginoso* (Figura 11) (VIEIRA, 2011).

FIGURA 11 - *Rhodotorula glutinis* (RIBEIRO, 2008)



Nas espécies produtoras de pigmentos do gênero *Rhodotorula*, a *Rhodotorula glutinis* apresenta colônias vermelhas alaranjadas (Figura 12), que além de acumular carotenóides como torularrodina, toruleno e  $\beta$  – caroteno através da biossíntese como um produto final, também é rico em vitaminas, lipídios e proteínas (MALDONADE *et al.*, 2008). Tais carotenóides obtidos mostram-se em frações milésimas do peso seco e suas concentrações podem alterar dependendo das condições de cultivo (ANDRADE, 2010), como fontes de carbono e nitrogênio, gerando um perfil de carotenóides variado na qual o  $\beta$  – caroteno pode corresponder ao principal produto (43%), e o toruleno um produto secundário (30%), ou o inverso com 25% de o  $\beta$  – caroteno, e 28% de toruleno.

FIGURA 12 - Colônia de *Rhodotorula glutinis*. Fotografia de colônia crescida em ágar Sabouraud após três semanas a 25°C (ANDRADE, 2010).



## **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os carotenóides são corantes naturais de grande importância para a indústria alimentícia, além de serem precursores de vitaminas necessárias para o metabolismo do corpo humano. Capazes de realizar a biossíntese para obtenção de diversos compostos como o  $\beta$  – caroteno, os carotenóides ajudam na prevenção de várias doenças degenerativas que podem ser desenvolvidas no organismo, melhorando assim o estado nutricional do indivíduo.

A fim de melhorar o padrão alimentício da sociedade, há uma necessidade de utilizar produtos naturais em vez de produtos sintéticos, o que desperta às pesquisas e investimentos para comercialização e aplicação no mercado industrial. Sendo assim, a produção de carotenóides por microorganismos, destacando – se as leveduras mostra – se biotecnologicamente viável devido sua disponibilidade anual, permitindo manter as condições favoráveis do meio de cultivo, além de obter facilmente sua extração e aplicação em escala industrial.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, R. C. R. **Estudo do desenvolvimento e da produtividade lipídica da levedura *Rhodotorula glutinis* NCYC 921 em culturas descontínuas monitorizadas por citometria de fluxo.** 2010. 61 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Monte de Caparica, 2010.

BARBOSA, M.M.; **Obtenção de carotenóides e flavonoides a parti do bagaço do pedúnculo do caju por maceração enzimática.** 2010. 100 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

BHOSALE, P; Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, p. 351 – 361, 2004.

BONADIO, M. P. **Produção de carotenóides por *Rhodotorula rubra*, em caldo de cana e em meios sintéticos, suplementados com nutrientes.** 2009. 45 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal, 2009.

BRANCO, L. S. C.; **Estudo da ampliação de escala na produção de biomassa de *Rhodotorula sp.* CNPAT02 em processo batelada para obtenção de carotenóides.** 2010. 76 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

BRITTON, G; LIAAEN – JENSEN, S.; PFANDER, H. Carotenoids today and challenges for the future. **In carotenoids.** Berlin: Birkhauser Verlag, p 13 – 26, 1995

CABRAL, A. S.; **Ecologia de leveduras micocinogênicas e potencial de aplicação como agente de controle biológico.** 2009. 138 f. Dissertação (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

CAMPOS, F.M.; ROSADO, G.P. Novos fatores de conversão de carotenóides provitamínicos A. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** V. 25 n. 3, p. 571 – 578, 2005.

GIORI, F. P.; **Adaptacao de metodologia de digestão *in vitro* e determinação da bioacessibilidade *in vitro* de  $\beta$  – caroteno em três variedades de batata doce de polpa alaranjada.** 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica – Rio de Janeiro, 2010.

GUARATINI, T. **Antioxidantes de Macroalgas Marinhas: Caracterização Química e Atividade *in vitro*.** 2008. 19 f. Dissertação (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Departamento de Ciências Biológicas, São Paulo, 2008.

HIANE, P.A; BOGO, D.; RAMOS, M.I.L.; RAMOS FILHO, M.M.; Carotenóides pró – vitamínicos A e composição em ácidos graxos do fruto e da farinha do bacuri (*Scheelea phalerata* Mart.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.** V. 23 n. 2, p. 206 – 209, 2003.

- MALDONADE, I. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; SCAMPARINI, A. R. P.; Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. **Food Chemistry**. n. 107, p. 145 – 150, 2008
- MARINOVA, D.; RIBAROVA, F. HELP determination of carotenoids in Bulgarian berries. **Journal of Food Composition and Analysis**, Davis. V.20, n.5, p.370 – 374, 2007.
- MELO, J. F. **Análise da viabilidade de transformação de diferentes leveduras de interesse biotecnológico utilizando o sistema *cani* (CGC)**. 2006. 64 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- MEZZOMO, N. **Extração e encapsulamento de compostos com importância tecnológica e biológica proveniente do resíduo de processamento de camarão**. 2012. 216 f. Dissertação (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2012.
- MORAIS, L. F. **Carotenoides: Características Biológicas e Químicas**. 2006. 70 f. Dissertação (Especialização em Qualidade de Alimentos) – Universidade de Brasília CET – Centro de Excelência em Turismo, Brasília, 2006.
- MORIEL, D. G.; **Otimização da produção de biomassa e astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma* utilizando processo descontínuo alimentado**. 2004. 126 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.
- NASCIMENTO, P. **Avaliação da retenção de carotenóides de abóbora, mandioca e batata doce**. 2006. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, IBILCE, São José do Rio Preto, 2006.
- OLIVEIRA, Q. R.; NETO, A.G.; UETABANABARO, A. P. T.; ROSA, C. A.; ASSIS, S. A. Produção de pectinases por leveduras: uma revisão. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**. V. 9, p. 41 – 47, 2009.
- OLIVEIRA, Q. R.; NETO, A.G.; UETABANABARO, A. P. T.; ROSA, C. A.; ASSIS, S. A. Potencial biotecnológico de leveduras carotenogênicas: uma breve revisão. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**. V. 9, p. 48 – 51, 2009.
- PASSOS, R.; **Extração e caracterização química de carotenoides provenientes de biomassas de interesse para a aquicultura**. 2007. 88 f. Dissertação (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.
- QUIRÓS, A. R.; COSTA, H. S. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: a review. **Journal of Food Composition and Analysis**, V. 19, p. 97-111, 2006.
- RIBEIRO, B.D.; **Aplicação de tecnologia enzimática na obtenção de  $\beta$ -caroteno a partir de óleo de buriti (*Mauritia vinifera*)**. 2008. 119 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
- ROEPCKE, C. B. S.; **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de biomassa de levedura rica em zinco orgânico**. 2007. 148 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

- SANCHO, S. O.; **Efeito do processamento sobre as características de qualidade do suco de caju (*Anacardium occidentale* L.)**. 2006. 138 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- SANTOS, A.M.; **Fermentação alcoólica com leveduras imobilizada em colmos de bambu e em fibra de coco**. 2008. 82 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008.
- SANTOS, D. S.; **Inoculação de leveduras *starters* na fermentação do cacau para melhoria do flavor**. 2010. 82 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2010.
- SCHWARTZ, C.R.M.; **Otimização da produção de carotenóides em meio sintético por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em biorreator**. 2010. 100 f. Dissertação (Mestrado) – URI – Campus de Erechim, Erechim, 2010.
- SILVA, M. L. C.; COSTA, S. R.; SANTANA, S. A.; KOBLITZ, B. G. M. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**. V. 31, n. 3, p. 669 – 682, 2010.
- TATSCH, P.O.; **Produção de carotenóides em meio sintético por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em biorreator**. 2008. 94 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, 2008.
- UENOJO, M.; MARÓSTICA, M. R. Jr.; PASTORE, G. M. Carotenoides: Propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**. V.30, n.3, p. 616 – 622, 2007.
- VALDUGA, E. **Bioprodução de compostos voláteis e carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636**. 2005. 200 f. Dissertação (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - Santa Catarina, 2005.
- VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; LUCCIO, M. Produção de Carotenoides: Microorganismos como Fonte de Pigmento Naturais. **Química Nova**. V.32, n.9, p. 2429 – 2436, 2009.
- VIEIRA, E. N. R.; **Influência do tipo de mosto e do gênero de levedura na formação de amins bioativas e carbamato de etila em destilados alcoólicos**. 2011. 167 f. Dissertação (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.
- VOAIDES, C.; DILMA, R. Effect of carbon source on carotenoid production by *Rhodotorula sp.* **Archiva Zootechnica**. V. 14 n.3, p. 75-83, 2011.
- ZENI, J. **Screening de microorganismos produtores de carotenóides e poligalacturonases**. 2009. 128 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, 2009.