UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS

CARLOS AUGUSTO DA SILVA SANTANA

PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES VIA CULTIVO SUBMERSO UTILIZANDO O FRUTO DO UMBUZEIRO (*Spondias tuberosa Arr. Cam.*)

Vitória da Conquista, BA
2017

CARLOS AUGUSTO DA SILVA SANTANA

PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDE VIA CULTIVO SUBMERSO UTILIZANDO O FRUTO DO UMBUZEIRO (S*pondias tuberosa Arr. Cam*.)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira
Instituto Federal da Bahia – IFBA

Co-orientador: Prof. Dr. Giovanilton Ferreira da Silva
Instituto Federal da Bahia – IFBA

Vitória da Conquista, BA
2017

CARLOS AUGUSTO DA SILVA SANTANA

PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES VIA CULTIVO SUBMERSO UTILIZANDO O FRUTO DO UMBUZEIRO (*Spondias tuberosa Arr. Cam.*)

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Biociências e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia.
Vitória da Conquista – BA, 24/03/2017.

_____

Profª. Drª. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira - Orientadora
Instituto Federal da Bahia – IFBA

_____

Prof. Dr. Giovanilton Ferreira da Silva - Co-orientador
Instituto Federal da Bahia – IFBA

_____

Profª. Drª. Cristiane Martins Veloso
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

_____

Profª. Drª. Natalia Velasquez de Oliveira
Universidade Estadual de Alagoas

Dedico à minha família, principalmente aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A minha mãe, Maria José por todo apoio, compreensão, amor e atenção nas horas em que mais precisei. Meu pai, Antonio, pela sua amizade, amor e cuidado.

Agradeço também aos meus orientadores, a professora Andrea e ao professor Giovanilton por terem confiado em mim e por terem me dado essa chance de trabalharmos juntos. Mesmo sem me conhecer direito, aceitaram me orientar e estiveram comigo esses dois anos sempre com muita atenção e cuidado. Não mediram esforços para me ajudar, me recebendo muitas vezes na sua própria casa... (sem palavras). Que Deus possa recompensá-los.

Guardo no peito a amizade de Robson, meu amigo, que esteve diretamente comigo nesse período sempre me ajudando e me dando a honra da sua companhia, sem ele teria sido bem mais difícil com certeza.

A professora Natália, peça fundamental nessa história, sou eternamente grato e profundamente feliz por tê-la como uma irmã. Obrigado por tudo.

A meu pastor Jamilson por ser tão meu amigo. Não poderia me esquecer nunca dele.

Aos meus amigos, principalmente os que estiveram mais de perto, que dividiram comigo esses dois anos em que estive aqui na UFBA.

A Ana que juntos formamos a dupla Pink e Cérebro, obrigado por tudo.

Aos meus amigos da turma de Biociências.

A todo o pessoal que trabalha na UFBA, os técnicos que com tanta boa vontade me abraçaram e me ajudaram sempre que precisei. Hoje são meus amigos, o grupo do café todas as tardes durante dois anos. Foi uma honra conhecê-los.

Aos coordenadores do programa, tanto o Anderson quanto o Lucas que sempre

foram muito gentis e prestativos, sem me esquecer da Lina e da sua simpatia.

A Fapesb, pelo apoio financeiro.

Que Deus nos abençoe!

Então entrou o rei Davi, se assentou perante O Senhor e disse: "quem sou eu, ó Senhor Deus, e quem é a minha casa para que me tenhas trazido até aqui?".

Bíblia Sagrada, 1 Crônicas 17:16

RESUMO

SANTANA, Carlos Augusto da Silva. Produção de carotenóides via cultivo submerso utilizando o fruto do umbuzeiro (*Spondias tuberosa Arr. Cam.*). 24, de março de 2017. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2017.

Os carotenóides são pigmentos naturais e possuem várias ações biológicas, sendo a atividade pró-vitamina A a função fisiológica mais conhecida, além de possuir também ação antioxidante. Uma das alternativas para a produção de carotenóides é o cultivo submerso usando o fruto do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.) como fonte de carbono. O fruto do umbuzeiro é abundante no Nordeste do Brasil. Ele foi utilizado por ter um baixo custo e possuir em sua composição todos os nutrientes necessários para o crescimento de microrganismos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade do fruto do umbuzeiro como substrato para produção de carotenóides. Para isso, foi utilizado o microrganismo selecionado como melhor produtor de carotenóides (alta produção de betacaroteno) *Rhodotorula glutinis*. Foi realizado um planejamento experimental fatorial 2^3 para avaliar a produção de carotenóides. O umbu (*Spondias tuberosa Arr Cam*) foi colhido na região do sudoeste da Bahia. Os carotenóides produzidos foram extraídos com solvente acoplados a técnica de ultrassom. Pode-se observar que a condição de 150 rpm, 25ºC e pH 7,0 foi a que mais produziu carotenóides (11,170mg/L) e biomassa (3,017 g/L) tanto em meio sintético quanto em umbu. Nestas condições, o microrganismo produziu biomassa e quase não apresentou fase de adaptação, indicando sua fácil adaptação ao substrato. Essa característica é interessante para uma produção industrial. O umbu se mostrou um meio bem propício ao crescimento do microrganismo quando comparado com o meio sintético. Isso se deve ao fato de o umbu ser um produto agroindustrial rico em nutrientes. A técnica de extração com solvente não foi capaz de extrair totalmente os carotenóides produzidos, sendo necessário ser acoplada a técnica de ultrassom, atingindo assim sua máxima extração. O umbu se mostrou um substrato viável para a produção de carotenóides usando *Roduthorula glutinis.*

Palavras-chave: Umbu, Cultivo Submerso, Betacaroteno, *Roduthorula glutinis*, Extração, Ultrassom, Vitamina A.

ABSTRACT

Carotenoids are natural pigments and have several biological actions. Pro-vitamin A

activity is the most well-known physiological function, besides having antioxidant action. One of the alternatives for the production of carotenoids is the submerse culture using fruit of umbu tree fruit (*Spondias tuberosa Arr. Cam.*) as carbon source. Umbu tree fruit exists in large amount in northeastern Brazil. It was used for having low cost and presenting nutrients for growth of microorganisms in its composition. The aim of this work was to evaluate the viability of the umbu tree fruit as a substrate for carotenoid production. For this, *Rhodotorula glutinis* was selected microorganism as the best producer of carotenoids (high betacarotene production). A factorial experimental design $2^3$was used to evaluate carotenoid production. The umbu (*Spondias tuberosa Arr Cam*) was harvested in southwest of Bahia, Brazil. The produced carotenoids were extracted with solvent coupled to the ultrasound technique. The operational condition of 150 rpm, 25ºC and pH 7.0 presented higher carotenoid production (11,170 mg/L) and biomass (3,017 g/L). Under these conditions, microorganism did not present adaptation phase, indicating its easy adaptation to the substrate. This characteristic is interesting for an industrial production. Assays were performed in both synthetic and umbu pulp medium. Umbu pulp providing the right conditions for growth of microorganism when compared to synthetic medium. This is due to umbu pulp is an agroindustrial product rich in nutrients. The solvent extraction technique was not able to fully extract carotenoid. It was necessary to couple ultrasound technique for reaching higher yield of extraction. Umbu shown to be a viable substrate for the production of carotenoids using *Roduthorula glutinis*

Keywords: Umbu, Submerse Culture, Betacarotene, *Rhodotorula glutinis*, Extraction, Ultrasound, Vitamin A.

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 01 Estrutura dos principais carotenóides presentes na alimentação 04

Figura 02 Biossíntese dos carotenóides 05

Figura 03 Ciclização dos carotenos acíclicos insaturados 05

Figura 04 Fotos do umbuzeiro (A), das suas flores (B) e das suas frutas (C) 09

Figura 05 Trajeto da vitamina A para alcançar as células-alvo de um órgão..... 12

Figura 06 Inóculo após 48 h de cultivo, a 180 rpm mantido a 25 °C..... 20

Figura 07 Ilustração esquemática do processo fermentativo para R. *glutinis*..... 21

Figura 08 Valores da biomassa produzida comparando a agitação e a temperatura..... 39

Figura 09 Valores da biomassa produzida comparando temperatura e pH..... 40

Figura 10 Valores da biomassa produzida comparando velocidade de agitação e pH..... 40

Figura 11 Gráfico de Pareto para produção de biomassa..... 42

Figura 12 Valores produção de carotenóides comparando o pH e a temperatura..... 45

Figura 13 Valores produção de carotenóides comparando a agitação e a temperatura..... 45

Figura 14 Valores produção de carotenóides comparando pH e agitação..... 46

Figura 15 Gráfico de Pareto com 75% de intervalo de confiança..... 47

Figura 16 Características macroscópicas das colônias de *Roduthorula glutinis* em meio YMA após 48 horas de crescimento..... 48

Figura 17 Crescimento celular da levedura *Roduthorula glutinis* em meio YM, pH 5,0 e pH 7,0 nas condições: velocidade 150 rpm e temperatura 37ºC. Durante 72 horas..... 49

Figura 18 Crescimento celular da levedura *Roduthorula glutinis* em meio YM, pH 5,0 (a) e pH 7,0 (b) nas condições: velocidade 100 rpm e temperatura 25ºC. Durante 72 horas..... 50

Figura 19 Crescimento celular da levedura *Roduthorula glutinis* em meio YM, pH 5,0 (a) e pH 7,0 (b) nas condições: velocidade 100 rpm e temperatura 37ºC. Durante 72 horas..... 51

Figura 20 Crescimento celular da levedura *Roduthorula glutinis* em meio YM, pH 5,0 (a) e pH 7,0 (b) nas condições: velocidade 150 rpm e temperatura 25ºC. Durante 72 horas..... 52

Figura 21 Crescimento celular da levedura *Roduthorula glutinis* em polpa de Umbu nas condições: pH 5,0 (a) e pH 7,0 (b, velocidade 150 rpm e temperatura 25ºC. Durante 72 horas..... 52

Figura 22 Comparação da produção de Biomassa por *Roduthorula glutinis* com o meio YM e com a polpa do Umbu nas condições: pH 7,0, velocidade 150 rpm e temperatura 25ºC. Durante 72 horas..... 53

Figura 23 Curva de decréscimo de açúcares por *Roduthorula glutinis* com polpa de Umbu nas condições: pH 7,0 (b), velocidade 150 rpm e temperatura 25ºC. Durante 72 horas..... 54

Figura 24 *Rhodotorula glutinis* após cultivo submerso em polpa de umbu, com aumento de 100×..... 57

Figura 25 *Rhodotorula glutinis* após cultivo submerso em polpa de umbu com aumento de 100 ×, após uso de ultrassom e solvente: Éter de Petróleo, por 15 minutos..... 57

Figura 26 Carotenóide produzido por *Rhodotorula glutinis* após cultivo submerso em polpa de umbu por 72 horas, extraído com Éter de Petróleo nas condições: 150 rpm, 25ºC e pH 7,0 (após centrifugação)..... 58

Figura 27 Análise do padrão do Betacaroteno por HPLC..... 59

Figura 28 Cromatograma da análise do betacaroteno obtido através do cultivo submerso de *Roduthorula glutinis* em polpa de umbu após extração com Éter de Petróleo acoplado ao ultrassom..... 59

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 01	Características físico-químicas do umbu (*Spondias tuberosa Arr. Cam.*).....	10
Tabela 02	Equivalências de pró vitamina A em comparadas com vitamina A.....	13
Tabela 03	Recomendações nutricionais de vitamina A em equivalentes de retinol.....	14
Tabela 04	Composição do meio fermentativo para cultivo de *Rhodotorula glutinis*.....	21
Tabela 05	Composição do meio fermentativo para cultivo de *Rhodotorula glutinis*.....	32
Tabela 06	Características físico-químicas da polpa do umbu (*Spondias tuberosa Arr. Cam.*).....	37
Tabela 07	Resultados do planejamento experimental para produção de biomassa.....	38
Tabela 08	ANOVA para produção de biomassa.....	41
Tabela 09	Resultados do planejamento experimental para bioprodução de carotenóides.....	43
Tabela 10	Análise de variância (ANOVA).....	48
Tabela 11	Concentração de Betacaroteno utilizando Hexano, Éter de Petróleo e Acetona, com e sem o auxílio do ultrassom.....	55
Tabela 12	Concentração de Betacaroteno utilizando, Éter de Petróleo com o auxílio do Ultrassom.....	56
Tabela 13	Produção de carotenóide via cultivo submerso utilizando o fruto do umbuzeiro após 72 horas de fermentação nas condições: 150 rpm, 25ºC e pH 7,0.....	58

LISTA DE QUADROS

		Página
Quadro 1	Interações dietéticas que alteram a biodisponibilidade de vitamina A	11

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	02
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES	02
2.1.1 Propriedades e funções dos carotenóides	02
2.1.2 Estrutura e biossíntese dos carotenóides	03
2.1.3 *Roduthorula glutinis* como microrganismo promissor na produção industrial de carotenóides	06
2.1.4 Influência das variáveis pH, agitação e temperatura	07

2.2 Umbuzeiro 08
2.3 Importância da vitamina A na nutrição humana 11
2.3.1 Função biológica 11
2.3.2 Teores de vitamina A 13
2.3.3 Recomendações nutricionais 13
2.3.4 Toxicidade 15
2.3.5 Deficiência 15
3 JUSTIFICATIVA 16
4 OBJETIVOS 17
4.1 Objetivo Geral 17
4.2 Objetivos Específicos 17
5 MATERIAL E MÉTODOS 18
5.1 Obtenção do fruto do umbuzeiro 18
5.2 Microrganismos e técnicas de manutenção 18
5.3 Reagentes e equipamentos 19
5.4 Condições de cultivo 19
5.4.1 Cultivo em meio com polpa de umbu 20
5.4.2 Cultivo em meio sintético 20
5.5 Extração de betacaroteno com solvente acoplado a ultrassom 21
5.6 Determinação dos carotenóides 22
5.7 Análise em Cromatógrafo Liquido 23
5.8 Determinação da massa de células 23
5.9 Determinação de pH 23
5.10 Determinação de glicose 24
5.11 Determinação de proteína 24
5.12 Determinação de cinzas 24
6 REFERÊNCIAS 24
7 ARTIGO 29
7.1 INTRODUÇÃO 30
7.2 MATERIAIS E MÉTODOS 32
7.2.1 Cultivo em meio sintético 32
7.2.2 Cultivo em meio com polpa de umbu 33
7.2.3 Extração de betacaroteno com solvente acoplado a ultrassom 33
7.2.4 Determinação dos carotenóides 34
7.2.5 Análise em cromatografia 34
7.2.6 Determinação da massa de células 34
7.2.7 Determinação de pH 35
7.2.8 Determinação de açúcares totais 35
7.2.9 Determinação de proteína 35
7.2.10 Determinação de cinzas 36
7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 36
7.3.1 Análise química do substrato 36
7.3.2 Análise das variáveis temperatura, pH e velocidade de agitação por planejamento fatorial experimental 37
7.3.2.1 Planejamento experimental para analisar o crescimento da biomassa em meio sintético 37
7.3.2.2 Planejamento experimental para analisar a produção de carotenóides em meio sintético 43
7.3.3 Crescimento celular 48

7.3.4 Crescimento celular em meio sintético 49
7.3.5 Produção de biomassa tendo com substrato a polpa do umbu 52
7.3.6 Comparação da produção de biomassa produzida *Roduthorula glutinis* com umbu e com meio sintético nas condições: pH 7,0, agitação 150 rpm e temperatura 25ºC. 53
7.3.7 Curva de decréscimo de açúcares 53
7.3.8 Extração do betacaroteno 54
7.3.8.1 Solvente acoplado ao ultrassom 54
7.3.8.2 Extração do betacaroteno produzido a partir de meio sintético 56
7.3.8.3 Extração do betacaroteno extraído a partir do cultivo em polpa de umbu 56
7.3.9 Análise em CLAE do carotenóide produzido 58
7.4 CONCLUSÕES 60
7.5 REFERÊNCIAS 60

1 INTRODUÇÃO

A vitamina A, descrita no século passado como fator dietético lipossolúvel A é um composto que participa de uma série de funções biológicas e, por não ser sintetizada no organismo, deve ser fornecida. A ingestão insuficiente de vitamina A ou de seus precursores, durante um período expressivo, origina diversas anormalidades, entre as quais, perda de apetite e de peso, alterações epiteliais, diminuição da resistência às infecções e alterações visuais. A vitamina A (retinol), nutriente essencial ao organismo, desempenha importante papel em diversos processos vitais, atuando na manutenção da visão, na integridade do sistema imunológico, na formação e manutenção do tecido epitelial e das estruturas ósseas e dentes; na diferenciação e proliferação celular, na reprodução e no crescimento (Layrisse *et al*., 1997; Carvalho *et al*., 1995).

O betacaroteno é o precursor da vitamina A. Três formas da vitamina A são ativas no organismo: uma das formas, o retinol, é armazenado no fígado. As células convertem, quando necessário, o retinol em suas duas outras formas ativas, retinal e ácido retinóico. O betacaroteno é um antioxidante. Ele se liga a radicais livres, ou seja, impede que haja danos aos lipídeos do organismo. O dano provocado por

radicais livres frequentemente rompe ácidos graxos insaturados, prejudicando a habilidade da membrana em transportar substâncias para dentro e para fora da célula. Os radicais livres também prejudicam as proteínas celulares, alterando suas funções, e o DNA, alterando todas as células que herdaram esse DNA danificado. Quando há excesso de radicais livres em comparação com o sistema protetor intrínseco de cada célula, acontece o conhecido estresse oxidativo. Há uma ligação íntima entre esse estresse e doenças como artrite, catarata, doenças renais, alguns tipos de câncer e doenças cardiovasculares (Campbell, 2005).

Uma das alternativas para a produção de carotenóides é o cultivo submerso usando o fruto do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.) como fonte de carbono. O fruto do umbuzeiro é abundante no Nordeste do Brasil. Ele foi utilizado por ter um baixo custo e possuir em sua composição todos os nutrientes necessários para o crescimento de microrganismos. Neste contexto, este trabalho estudou o uso do fruto do umbuzeiro como substrato para produção de carotenóides. Para isso, foi utilizado o microrganismo selecionado como melhor produtor de carotenóides (alta produção de betacaroteno) *Rhodotorula glutinis*. Foi realizado um planejamento experimental fatorial 2^3 para avaliar a produção de carotenóides.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Considerações gerais sobre a produção de carotenóides

Hoje os carotenóides que são utilizados industrialmente são obtidos por reações químicas ou ainda por extração de plantas e algas. Nesse sentido sabendo-se da necessidade dos carotenóides na indústria de alimentos e a crescente preocupação com a utilização de aditivos químicos em alimentos, houve um aumento no interesse por carotenóides produzidos naturalmente por meios biotecnológicos.

A chamada "química verde" que possui quase nenhum risco de insalubridade vem se destacando na produção de carotenóides devido a fatores como: não depende de condições ambientais como época do ano, composição do solo e preocupação com as condições do cultivo, não necessita de grande espaço para a produção e ainda possui a possibilidade de utilização de substratos de baixo custo para a sua bioprodução (Silva 2004), como por exemplo o fruto do umbuzeiro.

Os carotenóides são utilizados comercialmente como corantes alimentícios e também na suplementação humana devido a sua atividade pró vitamina A, estima-se que cerca de US$ 935 milhões sejam gastos anualmente com esse mercado (FRASER & BRAMLEY, 2004). O corante sintético representa 38% do mercado que é consumido pelas indústrias de alimentos, 32% é natural e apenas 18% é produzido biotecnologicamente, e estima-se ainda que as indústrias de *fast food,* confeitarias e de bebidas não-alcoólicas sejam os que mais consomem, totalizando cerca de 65% de todo o consumo. Segundo Maldonade *et al*., (2007) em se tratando do preço de mercado, cada grama do betacaroteno gira em torno de R$ 57,00, e a astaxantina cerca de R$ 63,00, já um miligrama de zeataxantina pode custar até R$ 1.690,00.

2.1.1 Propriedades e funções dos carotenóides

Os carotenóides são pigmentos naturais, encontrados em fungos, bactérias, em tecidos verdes de plantas e também órgãos não fotossintéticos como frutas, flores e sementes (Simpson e Chichester, 1981). Atribui-se também a esses compostos

algumas atividades biológicas, dentre elas a mais importante é a sua função como pró-vitamina A. Destacam-se também outras funções como facilitação da comunicação celular, participação na resposta imune e capacidade antioxidante e ainda atua na prevenção de alguns tipos de câncer (Maiani *et al*., 2008).

Segundo Oslon (1997), para que determinado carotenóide possa apresentar alguma atividade pró-vitamínica A, ele deve apresentar em sua estrutura pelo menos um anel β-ionona (trimetil ciclohexano conjugado) não substituído e uma cadeia lateral poliênica ligada. Na segunda extremidade da molécula pode haver variação na estrutura cíclica ou acíclica e ser alongada, porém não pode ser encurtada a um fragmento polênico com menos de onze carbonos e, sendo assim, nem todos os carotenóides possuem atividade Pró-vitamina A. Segundo o Instituto Linus Pauling (2009), os carotenóides que apresentam maior função pró-vitamina A são especialmente o α- e β-carotenos e a β-criptoxantina. O β-caroteno tem eficiência de 100% nessa conversão, tendo em vista que sua clivagem resulta no final em duas moléculas de vitamina A (Krinsky & Russell, 2001).

2.1.2 Estrutura e biossíntese dos carotenóides

Em sua estrutura básica, de uma forma geral, os carotenóides apresentam cadeia longa com duplas ligações carbono-carbono e simetria bilateral. Os compostos são formados essencialmente por rearranjos em sua estrutura primária, pela adição de anéis nas suas extremidades e pela adição de moléculas de oxigênio e assim, adquire as características principais como cor e atividade antioxidante (Rao & Rao, 2007).

A Figura 1 apresenta a estrutura dos carotenóides mais estudados. As duplas ligações conjugadas conferem ao carotenóide a possibilidade de isomerização da forma *cis* para a forma *trans*, sendo que a última é mais estável e mais comum em plantas. Ainda assim pouco se conhece a respeito da diferença da ação dessa isomerização no organismo humano (Rao & Rao, 2007).

A classificação dos carotenóides se dá em duas ordens: os carotenos que são bastante apolares e possuem na sua estrutura apenas carbonos e hidrogênio, a exemplo do betacaroteno e o licopeno, e os derivados oxigenados dos carotenos, as xantofilas, que possuem uma natureza polar como, por exemplo, a luteína e a zeaxantina que

possuem oxigênio em sua estrutura além de carbono e hidrogênio (Rodriguez-Amaya, 1999).

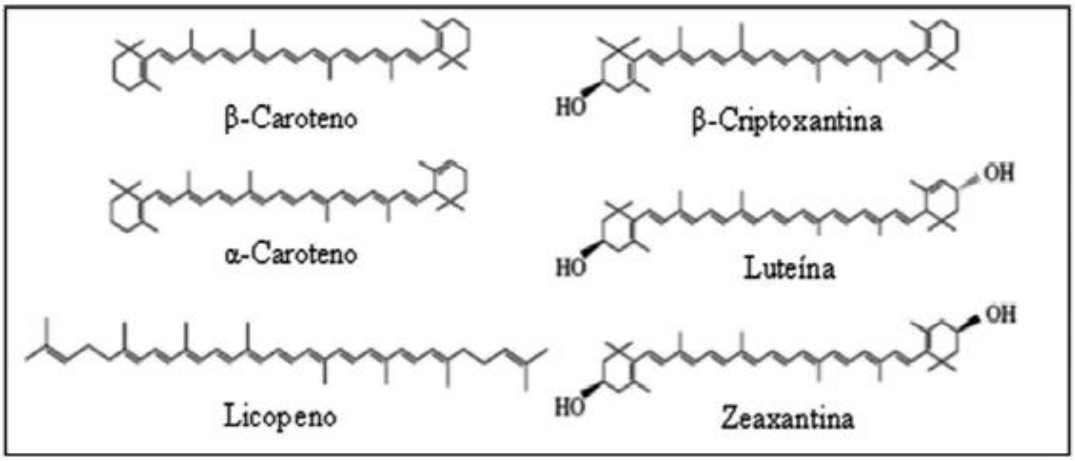


Figura 1 Estrutura dos principais carotenóides presentes na alimentação.
Fonte: Krinsky e Johnson, 2005 (adaptado).

A biossíntese dos carotenóides segue um padrão já elucidado, conforme demonstrado na Figura 2, o ácido mevalônico é o primeiro precursor especifico na biossíntese dos terpenóides (GOODWIN, 1981). Após várias reações da origem ao geranil difosfato (10C), fernesil difosfato (15C) e geranil-geranil difosfato (20C) (SILVA, 2004). Quando há a dimerização de duas moléculas de geranil-geranil difosfato há então a formação do fitoeno que é o primeiro com quarenta carbonos. A partir do fitoeno acontecem várias desaturações dando origem ao fitoflueno, posteriormente o betacaroteno, o neurosporeno e, por fim o licopeno.

Tanto o neurosporeno quanto o licopeno podem sofrer a ciclização para dar origem ao γ-caroteno e δ–caroteno, conforme pode ser observado na Figura 3. A ciclização ocorre sempre em apenas uma das extremidades da molécula de neurosporeno, pela introdução de uma dupla ligação, dando origem ao anel β de β-zeacaroteno que será posteriormente transformado em γ- caroteno ou o anel α de α-caroteno que será também transformado em δ–caroteno. Por sua vez o licopeno também pode dar origem ao γ-caroteno e δ–caroteno, sofrendo ciclização em uma de suas extremidades que, por sua vez, sofrem ciclização na outra extremidade dando origem ao β-caroteno e α-caroteno, respectivamente. Tanto o β-caroteno quanto α-caroteno pode dar origem as xantofilas através da adição de subunidades como a

hidroxila (Silva, 2004).

Figura 2 Biossíntese dos carotenóides (SILVA, 2004).

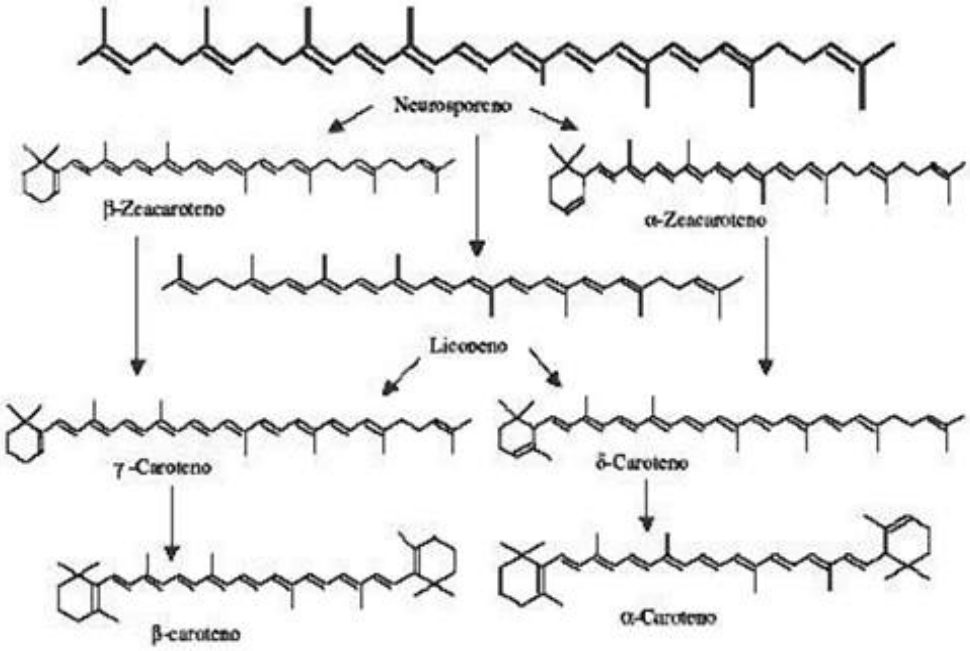


Figura 3 Ciclização dos carotenos acíclicos insaturados (SILVA, 2004).

2.1.3 *Roduthorula glutinis* como microrganismo promissor na produção industrial de carotenóides

As leveduras são microrganismos que pertencem ao reino *Fungi.* Possuem características como a presença de parede celular rígida, núcleo organizado com membrana nuclear, aclorofilados. Além disso, sua nutrição é heterotrófica através da absorção de nutrientes, sua reprodução é assexuada através de esporos e não possui motilidade própria (KURTZMAN & FELL, 1988).

Com relação aos testes utilizando um biorreator para bioprodução de carotenóides através do microrganismo *R. glutinis*, o estudo realizado por Buzzini & Martini (1999) utilizando mosto de uva concentrado como substrato obteve rendimento máximo de carotenóides específicos, 630 μg/g. Segundo Park *et al.* (2007), o cultivo em biorreator agitado mecanicamente de *R. glutinis* se mostrou muito interessante visto que obtiveram 61,7% de torularrodina como carotenóide majoritário, tolureno e β-caroteno.

Malisorn & Suntornsuk (2007), em frascos agitados utilizando salmoura de rabanete em diversas concentrações como fonte de carbono para *R. glutinis,* observaram que com a concentração de 50 g/L de sólidos solúveis totais a levedura apresentou crescimento até 72h. Observaram também que com 70 g/L de sólidos solúveis totais houve inibição do crescimento da levedura.

Fazendo uso do método simplex (método rápido e eficiente para otimização de sistemas multifatoriais), Tinoi *et al.* (2005) utilizaram farinha hidrolisada de resíduo de feijão e extrato de batata doce para cultivo de *R. glutinis* com o objetivo de produzir carotenóides e obtiveram 3,5 mg/L de carotenóides totais e 10,3g/L de biomassa.

Na tentativa de produzir carotenóides com a levedura *R. glutinis* partindo de substratos com baixo custo (glicose, sacarose de melaço e lactose do soro de queijo) Aksu & Eren (2007), com 20g/L de sacarose de melaço obtiveram 125mg/L de carotenóides totais; quando os autores utilizaram lactose do soro, puderam observar que o maior rendimento de produto baseado na máxima concentração celular (35,5

mg/g) foi obtido com a lactose do soro a 13,2g/L.

Com o propósito de aumentar a carotenogênese, Silva (2004) estudou os efeitos do ácido acético, β-ionona, ácido mevalônico, difenilamina e outros aminoácidos na produção de carotenóides pelo gênero *Rhodotorula*. O autor observou que o ácido acético (0,05 a 1%) não demonstrou nenhuma influência na produção; a β-ionona (10-3M) inibiu o crescimento da levedura *R. glutinis* (0,57 a 0,49 g/100 mL) e a carotenogênese (1980 a 1701 μg/L); já o ácido mevalônico (0,05; 0,1 e 0,2%) não interferiu na produção de células e aumentou a biossíntese de carotenóides em 35% para *R. glutinis*.

Outros autores demonstram que a *R. glutinis* é um microrganismo promissor para utilização industrial, (Aksu & Eren 2007). Entretanto, ainda não há um consenso acerca das condições operacionais ótimas para sua produção. Assim, é nesse contexto que este trabalho se insere, estabelecer condições operacionais de modo a aumentar a produção de carotenóides.

2.1.4 Influência das variáveis pH, agitação e temperatura

Foi observado que o aumento no crescimento de leveduras causa mudanças no pH do meio, sendo que há uma diminuição nas primeiras 72 h do início do cultivo. Após essa fase, há normalmente, uma maior produção de carotenóides e um aumento no pH. Na fase final de cultivo, o pH não se altera, indicando o fim do processo fermentativo (FRENGOVA *et al*., 1994).

De acordo com Aksu & Eren (2005), o aumento do pH de 3,0 até 7,0 além de influenciar a bioprodução de carotenóides pela levedura *R. muscilaginosa*, influenciou também na variação do crescimento da cultura, sendo que houve uma diminuição nos valores maiores de pH. A levedura *R. glutinis* alcançou sua maior produção tanto de carotenóide quanto de biomassa em pH 5,91, confirmando assim que essa levedura possui preferência por um pH ligeiramente ácido.

Outro fator ambiental muito importante que interfere diretamente no crescimento dos microrganismos é a temperatura provocando mudanças em diversas vias biossintéticas. Em 1974, Haiman *et al*. descreveram através de um estudo randomizado que a temperatura exerce influência na concentração de enzimas

diretamente responsáveis pela produção de carotenóides e que mudanças na concentração dessas enzimas controlavam o nível dos carotenóides produzidos pelos microrganismos.

Segundo Tinoi *et al*. (2005), a *R. glutinis* demonstrou sensibilidade à variação da temperatura com relação ao crescimento celular. No experimento, pode-se observar que a concentração de carotenóides totais foi de 3,5 mg/L e 10,3 mg/L de células. Testaram-se nove temperaturas, as temperaturas que apresentou maior crescimento celular foram 28ºC e 30ºC.

Também foi observado que a concentração relativa de diversos carotenóides é modificada, dependendo da temperatura em que ocorre a fermentação, pois quando *R. glutinis* foi cultivada na temperatura de 5ºC, ocorreu alta produção de betacaroteno, enquanto que quando a fermentação aconteceu a 25ºC houve a síntese de toruleno e torularodina e o ótimo crescimento celular foi obtido a 30ºC onde também ocorreu a máxima produção de carotenóides 8,38 mg/L e 31,9 mg/L de biomassa (FRENGOVA *et al*., 1995).

Tinoi *et al*. (2005), demonstraram através de experimentos utilizando *erlenmeyers* que com velocidades de agitação entre 100 e 150 rpm, o crescimento celular é prejudicado, isso se ocorre devido a diminuição da disponibilidade dos nutrientes presentes no meio na superfície das células. Além disso, quando aumentada a taxa de agitação para mais de 250 rpm, os autores observaram a presença de uma fina camada oleosa fruto da ruptura celular.

2.2 Umbuzeiro

Uma alternativa para o cultivo de carotenóides de modo a se alcançar uma melhor produção dessa biomolécula é usar materiais da própria região. Assim, além de encontrar condições operacionais favoráveis para o cultivo de carotenóides com um custo efetivo, e ainda ajustar as condições externas do cultivo, pretendeu-se utilizar meios fermentativos que possuíssem um grande potencial como fonte de carbono e ainda agregar valor a uma cultura regional, como é o caso do fruto do umbuzeiro.

Fazer uso do fruto do umbuzeiro como substrato de cultivo submerso foi

pensado de modo a ser mais uma alternativa ao processamento do umbu possibilitando uma maior agregação de valor à fruta e consequentemente um aumento na renda das famílias produtoras do semi-árido nordestino.

A fruta do umbuzeiro possui uma casca lisa de cor amarelo-esverdeada, a polpa por sua vez apresenta-se de cor branco-esverdeada, mole, suculenta, adquire característica quase aquosa quando madura e sabor agridoce. O umbu é uma drupa que mede de 2 a 4 cm de diâmetro, massa entre 10 a 20 g, possui forma de arredondada a ovalada e sua constituição é de casca (22%), polpa (68%) e caroço (10%) (LIMA *et al*., 2000). A Figura 4 mostra a planta, suas flores e fruto.

Figura 4 Fotos do umbuzeiro (A), das suas flores (B) e das suas frutas (C).
Fonte: Lorenzi, 2000.

O umbu é uma fruta com sabor bastante exótico muito comum no semi-árido do nordeste do Brasil. Ela pode ser encontrada em todo o sertão dos estados de Pernambuco, Sergipe, Bahia, ao sul do Piauí e ao norte de Minas Gerais (CAVALCANTI *et al*., 1996). A polpa do umbu é composta por 89,9% de umidade, 7,95% de açúcares totais, 0,52% de proteínas, 0,35% de lipídeos, 0,37% de fibras, 0,35% de cinzas e acidez total titulável de 1,23% (em ácido cítrico), pH de 2,45, 9,61mg de ácido ascórbico/100g, 0,82% de pectina e 126,27mg de taninos/100g (BISPO, 1989). Na Tabela 1 estão apresentadas as características físico-químicas do umbu determinadas por diferentes autores.

O gênero S*pondias* é nativo do semi-árido do nordeste do Brasil. Este gênero é pertencente à família das anacardiáceas, possui um porte pequeno, sua copa é arredondada, tronco curto, galhos retorcidos e bastante ramificados. É xerófila e caducifólia, sendo assim possui fácil adaptação ao calor, a baixa densidade pluvial e aos solos pobres (MENDES, 1990).

Segundo Santos *et al.* (2004), o umbu é também popularmente chamado de imbu (tupi-guarani). Ele possui um curto período sazonal e uma alta perecibilidade, ainda que sua safra ocorra nos meses de dezembro a março. A forma mais comum de exploração desta fruta é o extrativismo e os principais produtores são a Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte Piauí e Paraíba.

Fraga (2011) observou que as principais formas de comercialização do umbu

são como polpa congelada, preparados na forma de sorvetes, sucos, umbuzada ou a fruta *in natura* e desta forma acarretando muitas perdas no transporte e armazenamento por conta da sua alta perecibilidade. O saco do umbu pesando 50 kg é comercializado por cerca de R$ 17,00, valor bastante baixo quando comparado com outras frutas comercializadas. Segundo o IBGE (2008), em 2007 a produção brasileira foi de 8.619 toneladas, gerando uma renda de R$ 3.489.000,00 com destaque para o interior da Bahia.

Tabela 1 Características químicas do umbu (*Spondias tuberosa Arr. Cam.*).

Determinações	Souza e Catão, 1970	Bispo 1989	Narain *et al*. 1991	Ferreira 2000	Mattietto 2005	Ushikubo 2006
pH	*	2,45	3,07	2,21	2,75	1,7
Sólidos solúveis	*	10	9,47	10,03	9,59	9,4
Acidez em ác. cítrico (g/100g)	1,34	1,23	1,14	1,45	1,39	1,95
Razão (° Brix/acidez)	*	8,13	8,56	6,92	6,92	4,82
Umidade (%)	87,8	89,89	87,25	91,33	89,4	*
Proteínas (%)	*	0,52	0,31	*	0,75	0,58
Lipídeos (%)	*	0,35	0,85	*	0,3	0,16
Fibras (%)	*	0,37	1,04	*	0,3	0,3
Açúcares redutores (%)	*	6,07	4,09	3,61	3,63	3,22
Açúcares não redutores (%)	*	1,88	1,29	2,5	1,3	1,89
Açúcares totais (%)	8,34	7,95	5,38	6,25	4,93	5,11
Pectina (%)	*	0,82	1,39	*	*	1,8
Taninos (mg/100g)	*	126,27	120	*	183,76	62,1
Ácido ascórbico (mg/100g)	31,2	9,61	15,8	13,31	23,83	5,4
Cinzas (%)	*	0,35	0,3	0,53	0,4	0,4

2.3 Importância da vitamina A na nutrição humana

2.3.1 Função biológica

Dois grupos de pesquisadores, Mc Collum & Davis na Universidade de Wisconsin e Osborne & Mendel na Universidade de Yale, descobriram quase que simultaneamente em 1913 a vitamina A, primeira vitamina lipossolúvel a ser reconhecida (Mahan & Arlin, 1995).

O termo vitamina A faz referência tanto ao retinol (vitamina pré-formada) e seus análogos sintéticos e naturais, denominados retinóides, como alguns carotenóides que possuem atividade pró-vitamina A, que é o caso do *β-caroteno* (Fausto, 1991). Segundo Rodriguez-Amaya & Amaya-Farfán (1992), os precursores de vitamina A proporcionam a maior porção da vitamina ingerida a preço mais baixo que as fontes de origem animal.

A necessidade que um ser humano possui de vitamina A é inferior a 1mg/dia, sendo que existem fatores dietéticos que afetam a absorção de carotenóides e a sua bioconversão em retinol, sendo eles: a quantidade de carotenóide ingerida, fatores genéticos do indivíduo, o estado nutricional, a preparação culinária, a presença e a quantidade de lipídios e de fibras na refeição, a ingestão de fármacos e as interações variadas (Garr*etet al*., 1999; Hof *et al*., 2000; Pérez, 1999). No quadro 1, estão apresentadas, de forma sucinta, as interações dietéticas que alteram a biodisponibilidade de vitamina A.

NUTRIENTE QUE INTERAGE	EFEITOS
Proteínas	Sua deficiência diminui a absorção de vitamina A e a capacidade de liberar retinol das reservas hepáticas.
Lipídeos	Aumentos no conteúdo estimulam a absorção de carotenos. Já os poliinsaturados inibem a absorção e metabolismo de carotenos.
Vitamina E	Sua suplementação aumenta o armazenamento hepático de vitamina A e melhora os níveis plasmáticos em crianças.

Zinco	Sua suplementação melhora problemas de adaptação ao escuro.

Quadro 1 - Interações dietéticas que alteram a biodisponibilidade de vitamina A.
Fonte: Caballero, 1988.

A absorção dos carotenóides acontece no intestino, com a ajuda dos lipídios presentes na dieta. Por possuir caráter hidrofóbico, os carotenóides são armazenados no tecido adiposo, com pequena quantidade encontrada no fígado, músculos, glândulas adrenais e órgãos reprodutivos (Mahan & Arlin, 1985).

A vitamina A é armazenada em sua maior parte (90%) no fígado, principalmente na forma de ésteres de retinila, os outros tecidos do corpo contêm cerca de 9%, enquanto o plasma contém cerca de 1% da reserva total, sendo que desse 1% de reserva total, 90% está na forma de retinol, 8% como ésteres de retinila e 2% na forma de ácido retinóico e outros metabólitos (Velásquez-Meléndez & Roncada, 1994).

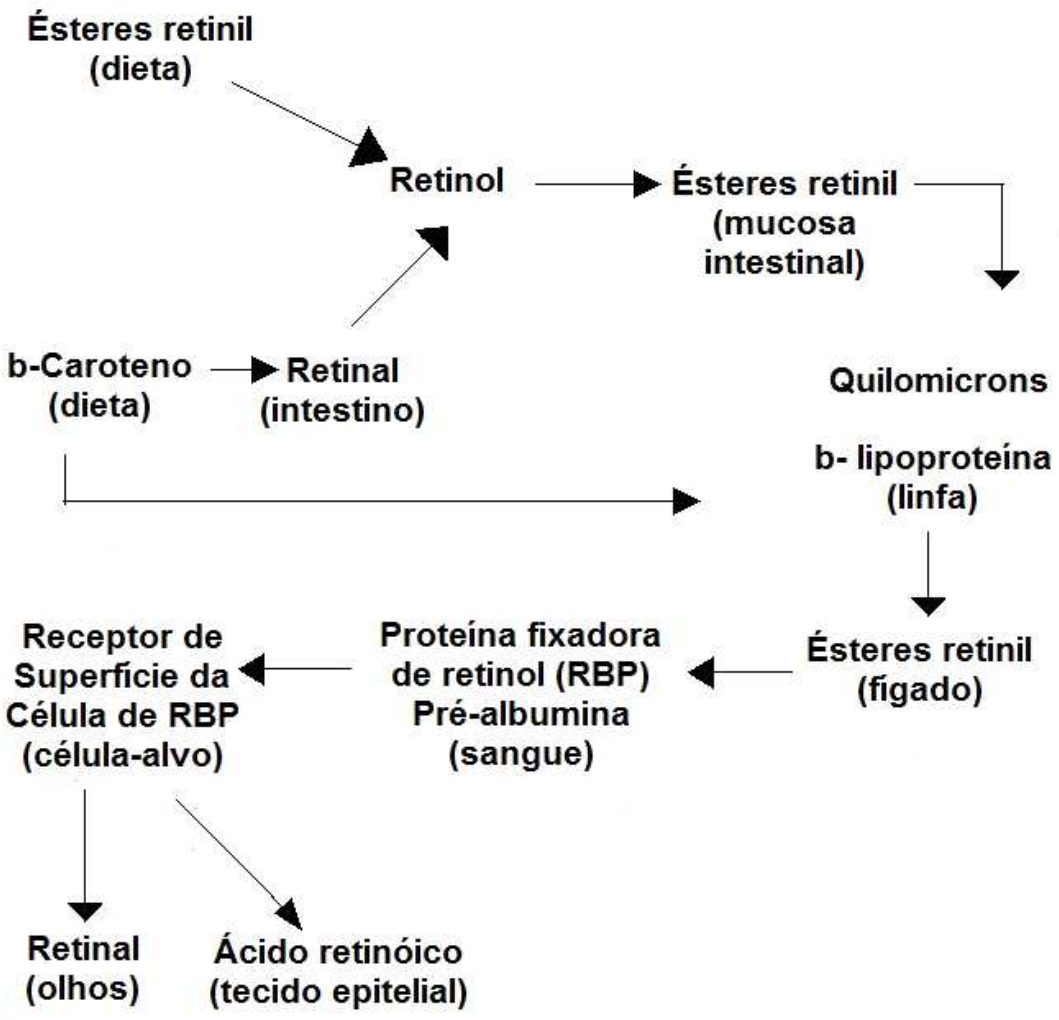


Figura 5 Trajeto da vitamina A para alcançar as células-alvo de um órgão.
(Fonte: Mahan & Arlin, 1995).

O betacaroteno é fracionado no citoplasma das células do intestino em duas moléculas de retinoldeído, que são reduzidas e esterificadas para formar os ésteres de retinila. Os ésteres de retinila são transportados para o sangue através da linfa e então, para o fígado. No momento da mobilização no fígado, o retinol é acoplado à Proteína Fixadora de Retinol (RPB) e assim adquire a possibilidade de ir a outros tecidos num complexo formado pelo retinol e as pré-albuinas séricas. As RPBs transportam vitamina A na circulação até chegar aos rins, onde são removidas deixando o retinol livre (Velásquez-Meléndez & Roncada, 1994). Na Figura 5, pode-se observar a trajetória da vitamina A para alcançar as células alvo de um órgão.

2.3.2 Teores de vitamina A

A vitamina A continua sendo usada como originalmente foi definida em unidade internacional. Equivalentes Retinol (RE) são de fundamental importância no cálculo dos valores da vitamina A na dieta, pois possibilitam que sejam somados a quantidade de vitamina A pré-formada e os carotenóides que possuem diferentes proporções nos alimentos e tem diferentes níveis de atividade biológica (Mahan & Arlin, 1995).

A Academia Nacional de Ciências - Conselho Nacional de Pesquisa dos Estados Unidos (NAS-NRC, 1980) recomenda as seguintes equivalências (Tabela 2) para transformar teores de pró-vitamina A em valores de vitamina A.

Tabela 2 Equivalências de pró vitamina A em comparadas com vitamina A

Retinol	Equivalente
1 equivalente de retinol	**= 1 mg de retinol**
	= 6 mg de betacaroteno
	=12 mg de outros carotenóides pró-vitamina A
	=3,33 UI de atividade de vitamina A a partir do retinol
	=10 UI de atividade de vitamina A a partir de betacaroteno

2.3.3 Recomendações nutricionais

Considerada como constituinte essencial na alimentação humana e animal, a vitamina A não é armazenada em grandes quantidades e nem biossintetizada pelo organismo e assim sendo, torna-se necessária sua suplementação contínua com o propósito de satisfazer as exigências diárias.

Na Tabela 3 estão expressas as recomendações nutricionais para a vitamina A em *mg* de retinol ou equivalentes retinol (RE). A recomendação de lactantes e crianças de até dois anos é baseada na quantidade de retinol presente no leite materno (Mahan &Arlin, 1995).

Tabela 3 Recomendações nutricionais de vitamina A em equivalentes de retinol.

Idade (anos)		RDA* (em mg RE**)
	Lactentes	
0,0 – 0,5		375
0,5 – 1,0		375
	Crianças	
1 – 3		400
4 – 6		500
7 – 10		700t
	Homens	
11 – 14		1.000
15 – 18		1.000
19 – 24		1.000
25 – 50		1.000
51 +		1.000
	Mulheres	
11 – 14		800
15 – 18		800
19 – 24		800
25 – 50		800
51 +		800
Gravidez		800
Lactação Primeiros 6 meses		1.300
Lactação Segundos 6 meses		1.200

- RDA = Recomendações Nutricionais
- RE = Equivalentes Retinol

Fonte: FNB-NRC, 1989.

2.3.4 Toxicidade

Quando a quantidade de retinol ingerida excede a capacidade de ligação da RPB, pode haver alterações nas membranas biológicas. A hipervitaminose A aguda ocorre em adultos quando ingerido 200 mg (660.000 UI) ou em crianças 100 mg (330.000 UI) (Mahan & Arlin, 1995). A hipervitaminose A crônica normalmente é resultado do uso inadequado de suplemento vitamínico que chega a quantidades de dez vezes a da RDA (recomendada), 4,2 mg de retinol (14.000 UI) para um lactente ou 10 mg de retinol (33.000 UI) para um adulto. Os sintomas incluem náuseas, vômitos, fadiga, fraqueza, cefaléia e em alguns casos anorexia. Os sintomas desaparecem em semanas ou até meses após a suspensão do suplemento vitamínico. O consumo de β-caroteno deve ser incentivado, visto que estudos toxicológicos com animais demonstraram que o mesmo não possui efeito carcinogênico, mutagênico ou teratogênico.

2.3.5 Deficiência

Segundo o Ministério da Saúde – Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição (2002), hipovitaminose A é a deficiência de vitamina A, seja no nível dietético, bioquímico ou clinico com repercussões sistêmicas que afetam a fisiologia de diferentes órgãos e tecidos.

A hipovitaminose A gera modificações nas células epiteliais, deprimindo as membranas mucosas que revestem o nariz, a garganta, a traqueia e o trato gastrintestinal. Essa depressão compromete o mecanismo natural que esses tecidos possuem contra infecções bacterianas, facilitando a infecção. Quando essa deficiência se prolonga os sintomas podem chegar a alterações na pele tornando-a áspera, seca e escamosa. A deficiência extrema de vitamina A pode afetar as membranas das mucosas dos tratos respiratório, gastrintestinal e geniturinário. Outras anormalidades provocadas pela hipovitaminose A são a perda de apetite, interferência no crescimento em crianças, anormalidades ósseas e perda do paladar (Mahan & Arlim, 1995).

3 JUSTIFICATIVA

Uma carência nutricional de grande importância em nível de saúde pública é a hipovitaminose A (deficiência de vitamina A). Ela afeta as estruturas epiteliais de diferentes órgãos, sendo os olhos o mais evidente. Uma carência prolongada pode causar alterações na pele, tornando-a áspera, seca e escamosa, decorrente do aumento de queratinização. A deficiência de vitamina A representa a principal causa de cegueira evitável no mundo, além de contribuir para esterilidade masculina e a baixa resistência às infecções, devido ao seu papel na manutenção da integridade das membranas mucosas (Germano, 2002). Calcula-se que a hipovitaminose A atinja cerca de 254 milhões de crianças em todo o mundo. Quanto à magnitude do problema, as consequências patológicas atingem níveis alarmantes no semi-árido nordestino.

A produção de derivados de vitamina A via rota microbiológica é um processo menos agressivo ao meio ambiente, uma vez que não utiliza reagentes com alto grau de insalubridade e solventes, provocando assim, uma redução no impacto ambiental. Além da possibilidade de redução de custos e aumento da produtividade, uma vez que a produção biológica de derivados de vitamina A apresenta facilidade de operação, manutenção e controle por utilizar temperaturas ambientes, pH próximo à neutralidade e meio aquoso, livre de solventes tóxicos. Quanto aos riscos de rejeição da produção microbiológica de derivados de vitamina A, estima-se que sejam mínimos, já que este trabalho propôs uma rota verde (reduzindo o uso e a geração de substâncias nocivas à saúde e ao ambiente) para produção de uma molécula tão importante tanto como um suplemento alimentar quanto para a indústria farmacêutica e ainda utilizar o fruto do umbuzeiro agregando valor ao mesmo. O desenvolvimento de tecnologia que permita agregar valor a cultura do umbuzeiro, faz-se necessário, uma vez que 80% desse rico material é utilizado de forma inadequada, economicamente sem viabilidade, ou quando não é perdido totalmente. O aproveitamento do fruto do umbuzeiro (*Spondias tuberosa Arr. Cam.*), observando critérios técnicos e sendo economicamente viável, representa oportunidades de novos negócios gerando trabalho e renda. Este trabalho trata de um novo ramo da umbucultura, que é usar o fruto de umbu (*Spondias tuberosa Arr. Cam.*) como matéria prima, via fermentação do suco de umbu, para produção de derivados de vitamina A e

usá-los para fins alimentícios.

4 Objetivos

4.1 Objetivo Geral

Produção de carotenóides via cultivo submerso usando o fruto do umbuzeiro (*Spondias tuberosa Arr. Cam.*) como matéria prima.

4.2 Objetivos Específicos

- Caracterização da matéria prima;
- Produção de carotenóides a partir do fruto do umbuzeiro (*Spondias tuberosa Arr. Cam.*) em bancada usando microrganismo (*Rhodotorula glutinis*) e testando condições operacionais, como temperatura, velocidade de agitação e pH;
- Estudo de separação e/ou purificação do carotenóide produzido. Para isso foram analisadas quantidade e qualidade do carotenóide produzido.
- Quantificação e otimização do processo fermentativo.
-

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Obtenção do fruto do umbuzeiro

O umbu (*Sapondias tuberosa Arr. Cam.*) colhido na região do sudoeste da Bahia foi adquirido para esta pesquisa na feira livre da cidade de Vitória da Conquista na Bahia no mês de janeiro de 2016 com alto grau de maturação. O fruto foi descascado e a polpa foi retirada manualmente com auxílio de uma faca. Em seguida, esta polpa foi congelada e estocada para as análises e os ensaios futuros.

5.2 Microrganismos e técnicas de manutenção

O carotenóide foi produzido em bancada utilizando o microrganismo *Roduthorula Glutinis.* Esta cepa liofilizada foi adquirida da coleção de microrganismos da Fundação André Tosello – Campinas, SP.

Utilizou-se o meio YM para o preparo do inóculo e o meio YMA para a manutenção da cultura. O meio YMA (*Yeast Malt Extract Agar*), meio de manutenção, era composto de:

3g/L de extrato de levedura (Vetec);

3 g/L de extrato de malte (Acumedia);

5 g/L peptona (Himedia);

10 g/L de glicose (Nuclear) e

20 g/L de agar (Vetec).

O meio de YM (*Yeast Malt Extract*), meio de inóculo, era composto por:

3 g/L de extrato de levedura (Vetec);

3 g/L de extrato de malte (Acumedia);

5 g/L peptona (Himedia) e;

10 g/L de glicose (Nuclear).

Após preparo, os meios foram colocados em tubos com rosca e autoclavados (PHoenix, modelo AV75) na temperatura de 121°C durante 15 min. Após esterilização, o meio YMA foi deixado inclinado até o seu completo resfriamento.

5.3 Reagentes e equipamentos

Tomou-se o cuidado no preparo de todas as soluções utilizando-se apenas componentes de grau analítico. A Água foi obtida por osmose reversa Milli-Q water (18MΩ) da Millipore (EUA) foi usada em todas as soluções e diluições e os solventes (acetona, etanol, dimetilsulfóxido, acetato de etila, éter de petróleo) foram obtidos da Vetec e os padrões de betacaroteno foram obtidos da Sigma - Aldrich Chemical Co. Além disso, utilizaram-se, durante o trabalho, os seguintes equipamentos: mesa rotatória (TECNAL modelo TE 420), espectrofotômetro (Espectronic instruments), balança analítica (TECNAL), capela de fluxo laminar (LABCONCO), autoclave (PHOENIX) e cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) composto por duas bombas (modelo 1525) e dois detectores: índice de refração (modelo 2414) e UV-Vis (modelo 2487). A coluna cromatográfica analítica utilizada foi: supelcogel C-610H, 30 cm × 7,8 mm, e uma pré-coluna supelcogel 9 µm, 5 cm × 4,6 mm.

5.4 Condições de cultivo

Inicialmente, a cultura liofilizada de *Roduthorula glutinis* foi hidratada em meio YM em estufa (Tecnal, modelo TE 393/2), na temperatura de 25 °C por 72 h. Após ser hidratada, a cultura foi semeada em tubos inclinados contendo meio YMA, e incubada por 48 h na temperatura de 25 °C. Após o crescimento, os tubos foram conservados na temperatura de 4 °C em refrigerador (Brastemp). A cada 2 meses, os microrganismos foram repicados para haver manutenção do microrganismo.

As células foram transferidas através da alça de platina para um erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio YM para o preparo do inóculo e incubadas na temperatura de 25°C, com agitação de 180 rpm por 48 h em agitador orbital (Nova Ética, modelo 430 RDB) até absorbância (λ = 650 nm) próxima de 0,1, conforme observado na Figura 6.

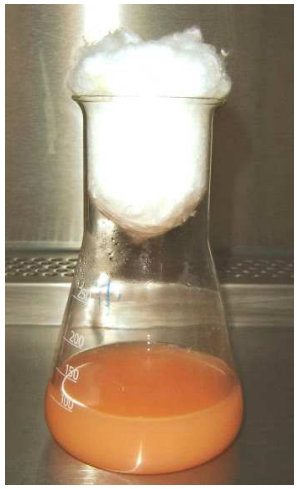


Figura 6 Inóculo após 48 h de cultivo, a 180 rpm mantido a 25°C

5.4.1 Cultivo em meio com polpa de umbu

Um volume de meio com 100 mL contendo poupa de umbu foi usado para os ensaios. Logo após, na câmara de fluxo laminar, realizou-se a inoculação de 5,0 ml de solução em uma concentração de 0,01 mg/ml contendo a polpa do umbu em pH anteriormente ajustado. Posteriormente, as condições de agitação e temperatura foram ajustadas conforme os dados do planejamento fatorial experimental e dava-se início à fermentação em mesa rotatória, que após análise das fases de crescimento celular ficou estabelecida em 72 horas.

Durante o crescimento do microrganismo foram realizadas medições de absorbância que aconteceram a cada duas horas. Com o sobrenadante foram realizados testes para quantificação de açúcares e da biomassa. Em seguida, essa biomassa foi separada, submetida à extração do betacaroteno e quantificou-se o betacaroteno.

5.4.2 Cultivo em meio sintético

A composição dos reagentes utilizados para preparação do meio de cultivo usado na fermentação da *Rhodotorula glutinis* está descrita na Tabela 4. Após a preparação do meio de cultivo, fez-se necessário a correção do pH.

Tabela 4 Composição do meio fermentativo para cultivo de *Rhodotorula glutinis*

Componentes	Concentrações
Dextrose	1% (m/v)
Extrato de levedura	0,3% (m/v)
Peptona	0,5% (m/v)
Extrato de malte	0,3% (m/v)
Agar	2% (m/v)
Água destilada	qsp

Após a preparação dos meios, estes foram autoclavados a 110 °C por 10 min. As fermentações foram conduzidas em mesa rotatória, utilizando *erlenmeyer* de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultivo, cuja composição contém para cada 1 L de meio 3 g de extrato de malte, 3 g de extrato de levedura, 5 g de peptona bacteriológica e 10 g de dextrose, nas temperaturas de 25 e 37ºC, nas velocidades de agitação de 100 e 150 rpm e pHs de 5,0 e 7,0. Para análise dos reagentes e produtos, amostras foram retiradas a cada duas horas para acompanhar o consumo de açúcares e produções de biomassa e de carotenóides. Na Figura 7, pode-se observar uma ilustração esquemática da fermentação da polpa de umbu por *Rhodotorula glutinis*.

Figura 7 Ilustração esquemática do processo fermentativo para *R. glutinis*

5.5 Extração de betacaroteno com solvente acoplado a ultrassom

A separação do betacaroteno de dentro da levedura foi realizada por extração com solvente usando ultrassom como técnica auxiliar. Testaram-se diferentes solventes para verificar com qual deles se obteria melhor rendimento de betacaroteno.

A despeito da natureza altamente lipolítica dos carotenóides, o betacaroteno é citosólico, ou seja, apresenta certo grau de hidrofilia. Os solventes escolhidos apresentavam baixa toxidade e valores de log $P_{o/w}$ superiores a 4, ou seja, eram biocompatíveis. Inicialmente, testou-se o solvente acetona, por apresentar baixa temperatura de vaporização e, portanto, fácil separação do produto recuperado. Em seguida, foram testados os solventes hexano e éter de petróleo.

Antes e após a operação de extração com solvente, foram analisadas amostras em microscópio para verificar a ruptura dos microrganismos. Verificou-se um baixo rendimento no processo de extração do betacaroteno somente com o uso de solvente. Assim, associada a técnica de extração com solvente, utilizou-se a técnica de ultrassom. A utilização desta técnica possibilitou um alto rendimento na recuperação do betacaroteno.

Para os diferentes solventes estudados (acetona, éter de petróleo, hexano e suas combinações em pares) adotou-se o procedimento a seguir: centrifugou-se 5 mL do fermentado puro por 10 minutos a 3000 rpm. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e a essa massa de células adicionou-se o solvente na razão de 1:1 (v/v). Colocou-se a amostra no sistema de ultrassom para rompimento celular e em intervalos de 15 minutos retirava-se uma amostra para análise em espectrofotômetro. Foram comparados os dados da extração com solvente puro e, com os dados de extração com solvente acoplado ao ultrassom.

5.6 Determinação dos carotenóides

Foi utilizado espectrofotômetro (modelo Agilent 8553) para a obtenção da absorbância**.** A concentração total de carotenóides foi estimada através do valor medido da absorbância a 450 nm, conforme equação descrita em curva padrão.

Ao final da extração foram analisadas amostras em microscópio para observar o betacaroteno extraído. Para isso fora retiradas amostras antes e após a extração e analisadas com a objetiva de 100 no microscópio da marca Olympus CX21. O parâmetro de medida foi a área (diâmetro) do microrganismo. Para cada amostra, o processo foi repetido três vezes usando posições diferentes da

lâmina.

5.7. Análise em cromatógrafo líquido

As amostras foram analisadas em CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência), após a extração, onde foram retirados 0,5 mL do sobrenadante extraído. Utilizou-se o metanol puro grau CLAE como fase móvel tanto na curva de calibração, quanto na análise da amostra. Utilizou-se uma vazão de 1 mL/min em temperatura ambiente, em uma coluna C18 Waters: Nova-Pak, 60Å, 5 µm de diâmetro, 3,9 × 150 mm. Para leitura do espectro de absorção dos carotenóides foi utilizado o detector de UV com comprimento de onda $\lambda = 450$ nm.

5.8 Determinação da massa de células

A determinação da concentração celular é obtida quando se avalia uma porção conhecida da amostra de células, analisada em espectrofotômetro. Foi realizada a centrifugação dessa alíquota do meio, com 3500 rpm por 10 min. Logo após a massa de células foi lavada várias vezes com ácido acético 5% com o objetivo de dissolver algum interferente que poderia de alguma forma atrapalhar a análise e após houve uma recentrifugação nas mesmas condições. Posteriormente foi realizada uma centrifugação final com água destilada para retirada do ácido e a massa de células final obtida foi colocada em uma estufa a 60ºC por 24 horas. A relação entre o volume da amostra e a massa de células determina a concentração celular. Com o fator diluição, a absorbância e o fator da curva de crescimento padrão do microrganismo foram possíveis medir a concentração de biomassa total na solução através da equação:

$$Concentração = Absorbância \times Diluição \times a^{-1}$$

Onde: *a* é o coeficiente angular da curva de crescimento padrão do microrganismo

5.9 Determinação de pH

Para o ajuste do pH inicial antes do início da fermentação utilizou-se um pHmetro digital (DIGIMED DMPH-2). Foi tomado o cuidado de realizar a calibração do eletrodo em solução tampão dentro do prazo de validade, com pH 7,0 e 4,0 e só então foi realizada a leitura.

5.10 Determinação de glicose

As determinações de glicose foram realizadas através do método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) conforme metodologia descrita por Miller (1959) e, a intensidade da coloração foi medida em espectrofotômetro (Agilent 8553) no comprimento de onda de 505 nm.

5.11 Determinação de proteína

A concentração de proteínas foi realizada pelo método de Bradford, onde as leituras foram feitas a 595nm (Bradford, 1976). Neste método ocorre ligação do corante azul de Coomassie BG-250 com grupos funcionais básicos ou aromáticos das proteínas. Para isto ocorrer, a proteína deve ter estrutura macromolecular complexa, ou seja, de 8-9 ligações peptídicas no mínimo. A ligação ocorre em dois minutos e esta dura aproximadamente duas horas (Bradford, 1976).

5.12 Determinação de cinzas

Segundo Merck (1993) o método mais indicado para determinação da matéria mineral de amostras de alimentos obtidos por meio de processos de cultivo de microrganismos, ou seja, de alimentos fermentados é a deteriorização da matéria orgânica em alta temperatura. Inicialmente há uma eliminação da matéria orgânica sob a temperatura de 550 ºC. O produto obtido é denominado de resíduo mineral fixo. O tempo necessário para calcinar as amostras na mufla à 550 °C foi de 3 horas demonstrando ao fim do processo uma coloração branco/acinzentada.

6. REFERÊNCIAS

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.

BHOSALE, P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 63, n. 4, p. 351-361, 2004.

BISPO, E. S. Estudo de produtos industrializáveis do umbu (*Spondias tuberosa, Arr. Câmara*). 1989.119 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza,1989.

BRADFORD, M. M. "Um ensaio de ligação do corante para a proteína." *Ana Biochem.* v. 72 p. 248-254, 1976.

BUZZINI, P. M.; GAETANI, M., TURCHETTI, B., PAGNONI, U. M.; DAVOLI. Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula graminis* DBVPG 7021 as a function of trace element concentration by means of response surface analysis. Enzyme and Microbial Technology, v. 36, n. 5, p. 687-692, 2005.

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.

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.

CAVALCANTI, N. B.; RESENDE, G. M.;BRITO, L. T. L. Anais do XXXIV Congresso Brasileiro de Economia e Sociologia Rural, Aracajú, Brasil, 1996.

MACHADO, F. M. V. F.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; PIEDADE, S. M. S. Avaliação da disponibilidade de ferro em ovo, cenoura e couve e em suas misturas. Cienc Tecnol Aliment, v. 26, n. 3, p. 610-8, 2006.

FAUSTO, M. A. Vitamina A e câncer. Revista de Nutrição da PUCCAMP, v.4, n.1/2, p.154-165, jan./dez. 1991.

FERREIRA, J. C. Efeitos do congelamento ultrarápido sobre as características físicoquímicas e sensoriais de polpa de umbu (*Spondias tuberosa* Arruda Câmara)

durante a armazenagem frigorificada. 2000, 85 p. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Agrícola) Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande, 2000.

FRAGA, A. Vinho de umbu é alternativa para os produtores do semiárido baiano. Jornal A Tarde, Bahia, 28 fev. 2011. Caderno de Economia, Seção de Agronegócios, p. B8.

FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. Progress in lipid research, v. 43, n. 3, p. 228-265, 2004.

FRENGOVA, G., Simova, E., Pavlova, K., Beshkova, D., & Grigorova, D. Formation of carotenoids by Rhodotorula glutinis in whey ultrafiltrate. *Biotechnology and bioengineering*, *44*(8), 888-894.

GARRETT, D. A.; FAILLA, M. L.; SARAMA, R. J. Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. Journal of agricultural and food chemistry, v. 47, n. 10, p. 4301-4309, 1999.

GOODWIN, T. W. The Biochemistry of the carotenoids: Biosynthesis.v.1 , p. 578 – 602, Chapman and Hall London, 1981.

HAYMAN, E. P.; YOKOYAMA, H.; CHICHESTER, C.; SIMPSON, K. L. Carotenoid biosynthesis in Rhodotorula *glutinis*. J. Bacteriol., Washington, v.120, p.1339-1343, 1974

HAYMAN, E. P., Yokoyama, H., Chichester, C. O., & Simpson, K. L. Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. Journal of bacteriology, v. 120, n. 3, p. 1339-1343, 1974.

IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Produção da Extração Veg*et al* e da Silvicultura 2006-2007. 2008.

INAN BRASIL. Ministério da Saúde. Área técnica de alimentação e nutrição. http://www.saude.gov.br/sps/areastecnicas/carencias/index/html (03 fev. 2016).

KRINSKY, N.; RUSSELL, R. M. Regarding the Conversion of β-Carotene to Vitamin A. Nutrition reviews, v. 59, n. 9, p. 309-309, 2001.

KRINSKY, N. I.; JOHNSON, E. J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. Molecular aspects of medicine, v. 26, n. 6, p. 459-516, 2005.

KURTZMAN, P. C.; FELL, J. W. The yeasts: a taxonomic study. 4. ed. Amsterdam: Elsevier: 1998. 1055 p.

LIMA, L. F. N.; ARAÚJO, J. E. V.; ESPÍNDOLA, A. C. M. Umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Câm.). Funep, 2000. 29 p.

Linus Pauling Institute. (2009) Disponível em http://lpi.oregonstate.edu. Acesso em 06/02/2016

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. vol. 2. Nova Odessa, Brazil: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. 352p.-col. illus. Por Icones. Geog, v. 4, 2000.

MAHAN, L. K., Arlin, M. T., Mahan, L. K., & Arlin, M. T. Vitaminas. Alimentos, nutrição e dietoterapia. 8ª ed. São Paulo: Roca, p. 99-143, 1995.

MAIANI, G., Periago Castón, M. J., Catasta, G., Toti, E., Cambrodón, I. G., Bysted, A., ... & Böhm, V. Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. Molecular nutrition e foodresearch, Weinheim, v.53, n.2, p.194-218, 2008.

MALDONADE, I. R., Scamparini, A. R., Rodriguez-Amaya, D. B. Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, v. 38, p. 65 – 70, 2007.

MALISORN, C.; SUNTORNSUK, W. Optimization of β-carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. Bioresource Technology, v. 99, n. 7, p. 2281-2287, 2007.

MATTIETTO, R. A. Estudo tecnológico de um néctar misto de cajá (*Spondias lutea* L.) e umbu (*Spondias tuberosa*, Arruda Câmara). 2005, 299 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

MENDES, B. V. Umbuzeiro (*Spondias tuberos* Arr. Cam.): importante fruteira do semi-árido. Secretaria da Indústria e Comércio, 1990.

MERCK. Reactivos, diagnóstica, productos químicos 1992/93. Darmstadt, 1993. 1584p.

MILLER, G. L. Use oi Dinitrosalicylic Acid Reagent tor Determination oi Reducing Sugar. Analytical chemistry, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

NARAIN, N. H. H. J.; VASCONCELOS, M. D. S. Physical and chemical composition of carambola fruit (*Averrhoa carambola L.*) at three stages of maturity composición física y química de la fruta carambola (*Averrhoa carambola L.*) en tres estados de madurez composición física e química da fruta da carambola (*Averrhoa carambola l.*) en tres estados de madurez. CYTA-Journal of Food, v. 3, n. 3, p. 144-148, 2001.

OLSON, J. A. The conversion of carotene to vitamin A (Thomas Moore, 1930). 1997.

PARK, J. S., Song, J. H., Yeon, K. H., & Moon, S. H. Removal of hardness ions from tap water using electromembrane processes. Desalination, v. 202, n. 1-3, p. 1-8, 2007.

RAO, A. V.; RAO, L. G. Carotenoids and human health. Pharmacological research, v. 55, n. 3, p. 207-216, 2007.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoides y preparación de alimentos: La retención de los Carotenoides Provitamina A en alimentos preparados, procesados y almacenados. Agencia para el Desarollo Internacional de los Estados Unidos, 1999.

RODRÍGUEZ AMAYA, D.; AMAYA FARFÁN, J. Estado actual de los métodos analíticos para determinar provitamina A. Arch. latinoam. nutr, v. 42, n. 2, p. 180-91, 1992.

SANTOS, E. O. C.; OLIVEIRA, A. C. N. Importância sócio-econômica do beneficiamento do umbu para os municípios de Canudos, Uauá e Curaçá. Anais do 3º Simpósio Brasileiro de Captação de Água de Chuva no Semi-Árido, ABCMAC, 2004.

SILVA, M. C. Alterações na biossíntese de carotenóides em leveduras induzidas por agentes químicos. 2004.

SILVA, M. J.; Barr, D. B.; REIDY, J. A.; MALEK, N. A.; HODGE, C. C.; CAUDILL, S. P.; CALAFAT, A. M. Urinary levels of seven phthalate metabolites in the US population from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2000. Environmental health perspectives, v. 112, n. 3, p. 331, 2004.

SIMPSON, K. L.; CHICHESTER, C. O. Metabolism and nutritional significance of carotenoids. Annual review of nutrition, v. 1, n. 1, p. 351-374, 1981.

SOUZA, A. H.; CATÃO, D. D. Umbu e seu suco. Revista Brasileira de Farmácia, v. 51, p. 335-353, 1970.

TINOI, J.; RAKARIYATHAM, N.; DEMING, R. L. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. Process Biochemistry, v. 40, n. 7, p. 2551-2557, 2000.

USHIKUBO, F. Y. Efeito do tratamento enzimático, da velocidade tangencial e da pressão transmembrana na microfiltração da polpa diluída de umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.). 2006.

NARAIN, N.; BORA, P. S.; HOLSCHUH, H. J.; VASCONCELOS, M. A. D.

S. Variation in physical and chemical composition during maturation of umbu (Spondias tuberosa) fruits. Food Chemistry, v. 44, n. 4, p. 255-259, 1991.

VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G.; RONCADA, M. J. Deficiência de vitamina A e sua relação com a morbi-mortalidade infantil: aspectos epidemiológicos. Cad Nutr, v. 8, p. 10-18, 1994.

7. Artigo: PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES VIA CULTIVO SUBMERSO UTILIZANDO O FRUTO DO UMBUZEIRO (*Spondias tuberosa Arr. Cam.*)

PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES VIA CULTIVO SUBMERSO UTILIZANDO O FRUTO DO UMBUZEIRO (*Spondias tuberosa Arr. Cam.*)

SANTANA, Carlos Augusto da Silva. Produção de carotenóides via cultivo submerso utilizando o fruto do umbuzeiro (*Sapondias tuberosa Arr. Cam.*). 24, de março de 2017. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2017.

Os carotenóides são pigmentos naturais e possuem várias ações biológicas, sendo a atividade pró-vitamina A, a função fisiológica mais conhecida. Uma das alternativas para a produção de carotenóides é o cultivo submerso usando o fruto do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.) como fonte de carbono. O fruto do umbuzeiro é abundante no Nordeste do Brasil. Ele foi utilizado por ter um baixo custo e possuir em sua composição todos os nutrientes necessários para o crescimento de microrganismos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de utilização do fruto do umbuzeiro como substrato para produção de carotenóides. Para isso, foi utilizado o microrganismo selecionado como melhor produtor de carotenóides (alta produção de betacaroteno) *Rhodotorula glutinis*. Foi realizado um planejamento experimental fatorial 2^3 para avaliar a produção de carotenóides. O umbu foi colhido na região do sudoeste da Bahia. Pode-se observar que a condição de 150 rpm, 25ºC e pH 7,0 foi a que mais produziu carotenóides (11,170mg/L) e biomassa (3,017 g/L) após a fermentação com umbu. Nestas condições, o microrganismo produziu biomassa e quase não apresentou fase de adaptação, indicando sua fácil adaptação ao substrato. Essa característica é interessante para uma produção industrial. O umbu se mostrou um meio bem propício ao crescimento do microrganismo quando comparado com o meio sintético. A técnica de extração com solvente não foi capaz de extrair totalmente os carotenóides produzidos, sendo necessário ser acoplada a técnica de ultrassom, atingindo assim sua máxima extração. O umbu se mostrou um substrato viável para a produção de carotenóides usando *Rodothorula glutinis.*

Palavras-chave: Umbu, Cultivo Submerso, Betacaroteno, *Rhodotorula glutinis*, Extração Solvente, Vitamina A.

7.1 INTRODUÇÃO

Considerada como constituinte essencial na alimentação humana e animal, a vitamina A não é armazenada em grandes quantidades e nem biossintetizada pelo organismo e assim sendo, torna-se necessário sua suplementação contínua com o propósito de satisfazer as exigências diárias.

A vitamina A, descrita no século passado como fator dietético lipossolúvel A é um composto que participa de uma série de funções biológicas e, por não ser sintetizada no organismo, deve ser fornecida. A ingestão insuficiente de vitamina A ou de seus precursores, durante um período expressivo, origina diversas anormalidades, entre as quais, perda de apetite e de peso, alterações epiteliais, diminuição da resistência às infecções, e alterações visuais. A vitamina A (retinol), nutriente essencial ao organismo, desempenha importante papel em diversos processos vitais, atuando na manutenção da visão, na integridade do sistema imunológico, na formação e manutenção do tecido epitelial e das estruturas ósseas e dentes; na diferenciação e proliferação celular, na reprodução e no crescimento (Layrisse *et al*., 1997; Carvalho *et al*., 1995).

O betacaroteno é um precursor da vitamina A, também conhecida como retinol. Três formas da vitamina A são ativas no organismo: uma das formas, o retinol, é armazenado no fígado. As células convertem, quando necessário, o retinol em suas duas outras formas ativas, retinal e ácido retinóico. O betacaroteno é um antioxidante. Ele se liga a radicais livres, ou seja, ela impede que haja danos aos lipídeos do corpo.

Hoje os carotenóides que são utilizados industrialmente são adquiridos por reações químicas ou ainda por extração de plantas e algas. Nesse sentido sabendo-se da necessidade dos carotenóides na indústria de alimentos e a crescente preocupação com a utilização de aditivos químicos em alimentos, houve um aumento no interesse por carotenóides produzidos naturalmente por meios biotecnológicos.

A chamada "química verde" que possui quase nenhum risco de insalubridade vem se destacando na produção de carotenóides devido a fatores como: não depende de condições ambientais como época do ano, composição do solo e preocupação com as condições do cultivo, não necessita de grande espaço para a produção e ainda possui a possibilidade de utilização de substratos de baixo custo para a sua

bioprodução (Silva 2004), como por exemplo o fruto do umbuzeiro.

Os carotenóides são pigmentos naturais, encontrados em fungos, bactérias, em tecidos verdes de plantas e também órgãos não fotossintéticos como frutas, flores e sementes (Simpson e Chichester, 1981). Atribui-se também a esses compostos algumas atividades biológicas, dentre elas a mais importante é a sua função como pró-vitamina A. Destacam-se também outras funções como facilitação da comunicação celular, participação na resposta imune e capacidade antioxidante e ainda atua na prevenção de alguns tipos de câncer (Maiani *et al*., 2008).

Em sua estrutura básica, de uma forma geral, os carotenóides apresentam cadeia longa com duplas ligações carbono-carbono e simetria bilateral. Os compostos são formados essencialmente por rearranjos em sua estrutura primária, pela adição de anéis nas suas extremidades e pela adição de moléculas de oxigênio e assim adquire as características principais como cor e atividade antioxidante (Rao & Rao, 2007).

As leveduras são microrganismos que pertencem ao reino *Fungi* e possui características como a presença de parede celular rígida, núcleo organizado com membrana nuclear, aclorofilados, sua nutrição é heterotrófica através da absorção de nutrientes, sua reprodução é assexuada através de esporos e não possui motilidade própria (KURTZMAN & FELL, 1988).

A fermentação pode ser influenciada por diversos fatores, atuando na produção de bioprodutos e/ou no crescimento do microrganismo. Dentre esses fatores tem-se o pH que influencia diretamente na fase de adaptação do microrganismo no início da fermentação. Outro fator ambiental muito importante que interfere diretamente no crescimento dos microrganismos é a temperatura provocando mudanças em diversas vias biossintéticas. É importante observar também que a agitação influencia diretamente na produção prejudicando ou favorecendo o crescimento celular, devido a mudança na disponibilidade dos nutrientes do meio na superfície das células.

Fazer uso do fruto do umbuzeiro como substrato de cultivo submerso foi pensado de modo a ser mais uma alternativa ao processamento do umbu possibilitando uma maior agregação de valor à fruta e consequentemente um aumento na renda das famílias produtoras no semiárido nordestino. O gênero *Spondias* é nativo do semiárido do nordeste do Brasil. Este gênero é pertencente à família das anacardiáceas, possui um porte pequeno, sua copa é arredondada, tronco

curto, galhos retorcidos e bastante ramificados. É xerófila e caducifólia, sendo assim possui fácil adaptação ao calor, a baixa densidade pluvial e aos solos pobres (MENDES, 1990).

Uma das alternativas para a produção de carotenóides é o cultivo submerso usando o fruto do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.) como fonte de carbono. O fruto do umbuzeiro é abundante no Nordeste do Brasil. Ele foi utilizado por ter um baixo custo e possuir em sua composição todos os nutrientes necessários para o crescimento de microrganismos. Neste contexto, este trabalho estudou o uso do fruto do umbuzeiro como substrato para produção de carotenóides. Para isso, foi utilizado o microrganismo selecionado como melhor produtor de carotenóides (alta produção de betacaroteno) *Rhodotorula glutinis*. Foi realizado um planejamento experimental fatorial 2^3 para avaliar a produção de carotenóides.

7.2 MATERIAIS E MÉTODOS

7.2.1 Cultivo em meio sintético

A composição dos reagentes utilizados para preparação do meio de cultivo usado na fermentação da *Rhodotorula glutinis* está descrita na Tabela 5. Após a preparação do meio de cultivo, fez-se necessário a correção do pH.

Tabela 5 Composição do meio fermentativo para cultivo de *Rhodotorula glutinis*

Componentes	Concentrações
Dextrose	1% (m/v)
Extrato de levedura	0,3% (m/v)
Peptona	0,5% (m/v)
Extrato de malte	0,3% (m/v)
Agar	2% (m/v)
Água destilada	q.b.

Após a preparação dos meios, estes foram autoclavados em 110°C por 10 min.

As fermentações foram conduzidas em mesa rotatória, utilizando erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultivo, cuja composição contém para cada litro de meio 3 g de extrato de malte, 3 g de extrato de levedura, 5 g de peptona bacteriológica e 10 g de dextrose, nas temperaturas de 25 e 37ºC, nas velocidades de agitação de 100 e 150 rpm e pH de 5,0 e 7,0. Para análise dos reagentes e produtos, amostras foram retiradas a cada duas horas para acompanhar o consumo de açúcares e produções de biomassa e de carotenóides.

7.2.2 Cultivo em meio com polpa de umbu

Um volume de meio com 100 mL contendo polpa de umbu foi usado para os ensaios. Logo após, na câmara de fluxo laminar, realizou-se a inoculação de 5,0 mL de solução em uma concentração de 0,01 mg/mL contendo a polpa do umbu com o pH anteriormente ajustado. Posteriormente, as condições de agitação e temperatura eram ajustadas conforme os dados do planejamento fatorial experimental e dava-se início à fermentação em mesa rotatória, que após análise das fases de crescimento celular ficou estabelecida em 72 horas.

Durante o crescimento do microrganismo foram realizadas medições de absorbância que aconteceram a cada duas horas. Com o sobrenadante foram realizados testes para quantificação de açúcares e da biomassa. Em seguida, essa biomassa foi separada, submetida à extração do betacaroteno e quantificou-se o betacaroteno.

7.2.3 Extração de betacaroteno com solvente acoplado a ultrassom

A separação do betacaroteno do meio intracelular foi realizada por extração com solvente usando ultrassom como técnica auxiliar. Testaram-se diferentes solventes para verificar com qual deles se obteria melhor rendimento de betacaroteno.

A despeito da natureza altamente lipolítica dos carotenóides, o betacaroteno é citosólico, ou seja, apresenta certo grau de hidrofilia. Os solventes escolhidos

apresentavam baixa toxidade e valores de log $P_{o/w}$ superiores a 4, ou seja, eram biocompatíveis. Inicialmente, testou-se o solvente acetona, por apresentar baixa temperatura de vaporização e, portanto, fácil separação do produto recuperado. Em seguida, foram testados os solventes hexano e éter de petróleo.

Antes e após a operação de extração com solvente, foram analisadas amostras em microscópio para verificar a ruptura dos microrganismos. Verificou-se um baixo rendimento no processo de extração do betacaroteno somente com o uso de solvente. Assim, associada a técnica de extração com solvente, utilizou-se a técnica de ultrassom. A utilização desta técnica possibilitou um alto rendimento na recuperação do betacaroteno.

Para os diferentes solventes estudados (acetona, éter de petróleo, hexano e suas combinações em pares) adotou-se o procedimento a seguir: centrifugou-se 5 mL do fermentado puro por 10 minutos a 3000 rpm. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e a essa massa de células adicionou-se o solvente na razão de 1:1 (v/v). Colocou-se a amostra no sistema de ultrassom para rompimento celular e em intervalos de 15 minutos retirava-se uma amostra para análise em espectrofotômetro. Foram comparados os dados da extração com solvente puro e, com os dados de extração com solvente acoplado ao ultrassom.

7.2.4 Determinação dos carotenóides

Foi utilizado espectrofotômetro (modelo Agilent 8553) para a obtenção da absorbância. A concentração total de carotenóides foi estimada através do valor medido da absorbância a 450nm, conforme equação descrita em curva padrão.

Ao final da extração foram analisadas amostras no microscópio para observar o betacaroteno extraído do meio intracelular para o meio extracelular. Para isso fora retiradas amostras antes e após a extração e analisadas com a objetiva de 100 no microscópio da marca Olympus CX21. O parâmetro de medida foi a área (diâmetro) do microrganismo. Para cada amostra, o processo foi repetido três vezes usando posições diferentes da lâmina.

7.2.5 Análise em cromatografia

As amostras foram analisadas em CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência), após a extração, onde foram retirados 0,5 mL do sobrenadante extraído. Utilizou-se o metanol puro grau CLAE como fase móvel tanto na curva de calibração, quanto na análise da amostra. Utilizou-se uma vazão de 1 mL/min em temperatura ambiente, numa coluna C18 Waters: Nova-Pak, 60 Å, 5 µm de diâmetro, 3,9 × 150 mm. Para leitura do espectro de absorção dos carotenóides foi utilizado o detector de UV com comprimento de onda $\lambda = 450$ nm.

7.2.6 Determinação da massa de células

A determinação da concentração celular É obtida quando se avalia uma porção conhecida da amostra de células, analisada inclusive em espectrofotômetro. Foi realizada a centrifugação dessa alíquota do meio, com 3500 rpm por 10 min. Logo após a massa de células foi lavada várias vezes com ácido acético 5% com o objetivo de dissolver algum interferente que poderia de alguma forma atrapalhar a análise e após houve uma recentrifugação nas mesmas condições. Posteriormente houve uma centrifugação final com água destilada para retirada do ácido e a massa de células final obtida foi colocada em uma estufa a 60ºC por 24 horas. A relação entre o volume da amostra e a massa de células determina a concentração celular. Com o fator diluição, a absorbância e o fator da curva de crescimento padrão do microrganismo foram possíveis medir a concentração de biomassa total na solução através da equação:

$$Concentração = Absorbância \times Diluição \times a^{-1}$$

Onde: *a* é o coeficiente angular da curva de crescimento padrão do microrganismo

7.2.7 Determinação de pH

Para o ajuste do pH inicial antes do início da fermentação utilizou-se um

pHmetro digital (DIGIMED DMPH-2). Foi tomado o cuidado de realizar a calibração do eletrodo em solução tampão dentro do prazo de validade, com pH 7,0 e 4,0 e só então foi realizada a leitura.

7.2.8 Determinação de açúcares totais

As determinações de glicose foram realizadas através do método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) conforme metodologia descrita por Miller (1959) e, a intensidade da coloração foi medida em espectrofotômetro (Agilent 8553) no comprimento de onda de 505 nm.

7.2.9 Determinação de proteína

A concentração de proteínas foi realizada pelo método de Bradford, onde as leituras foram feitas a 595nm (Bradford, 1976). Neste método ocorre ligação do corante azul de Coomassie BG-250 com grupos funcionais básicos ou aromáticos das proteínas. Para isto ocorrer, a proteína deve ter estrutura macromolecular complexa, ou seja, de 8-9 ligações peptídicas no mínimo. A ligação ocorre em dois minutos e esta dura aproximadamente duas horas (Bradford, 1976).

7.2.10 Determinação de cinzas

Segundo Merck (1993) o método mais indicado para determinação da matéria mineral de amostras de alimentos obtidos por meio de processos de cultivo de microrganismos, ou seja, de alimentos fermentados é a deteriorização da matéria orgânica em alta temperatura. Inicialmente há uma eliminação da matéria orgânica sob a temperatura de 550ºC. O produto obtido é denominado de resíduo mineral fixo. O tempo necessário para calcinar as amostras na mufla à 550°C foi de 3 horas demonstrando ao fim do processo uma coloração branco/acinzentada;

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1 Análise química do substrato

A polpa do umbu possui características físico-químicas bastante propícias para o crescimento microbiológico, com alto teor de umidade, açúcares totais, cinzas e proteínas, sendo um importante produto agroindustrial a ser utilizado para este fim. Os resultados apresentados na Tabela 6 se mostraram semelhantes às análises realizadas por outros pesquisadores, as poucas diferenças se devem ao fato de que a composição química do umbu depende principalmente às condições climáticas e do solo onde foi cultivado.

É importante ressaltar que a diferença entre os dados dos diferentes pesquisadores se deve ao fato de que o umbu é um produto agroindustrial, seu cultivo, tipo de solo e o clima da região onde foi cultivado influencia diretamente na sua composição química. Observa-se uma maior concentração de cinzas nas amostras de umbu analisadas (0,77%) neste trabalho. Essa propriedade pode ser importante para a produção industrial, uma vez que estas cinzas são resíduos inorgânicos e seus principais constituintes, K, Na, Ca, Mg (micronutrientes) são importantes nos processos biológicos. A polpa de umbu possui uma alta concentração de Açúcares Totais (6,01%) o que favorece diretamente no crescimento microbiológico tornando viável o cultivo submerso.

Tabela 6 Características químicas da polpa do umbu (*Spondias tuberosa Arr. Cam.*).

Determinações	Dados Amostrais	Narain *et al.* (1991)	Ferreira (2000)	Mattietto (2005)	Ushikubo (2006)
Umidade (%)	90,01	87,25	91,33	89,40	-
Proteínas (%)	0,46	0,31	-	0,75	0,58
Açúcares totais (%)	6,01	5,38	6,25	4,93	5,11
Cinzas	0,77	0,30	0,53	0,40	0,40

7.3.2 Análise das variáveis temperatura, pH e velocidade de agitação por

planejamento fatorial experimental

7.3.2.1 Planejamento experimental para analisar o crescimento da biomassa em meio sintético

São várias as condições que podem influenciar a bioprodução usando o microrganismo *Roduthorula glutinis*, contudo, segundo Silva (2004), são poucas as que influenciam diretamente o seu desempenho. As condições de cultivo submerso em meio sintético foram estudadas através de planejamento fatorial experimental e suas variáveis investigadas foram determinadas visando uma melhor bioprodução de carotenóides. As variáveis estudadas e seus respectivos níveis estão descritos na Tabela 7.

Os ensaios foram realizados em cultivo submerso e em dois níveis (-1) e (+1), sendo estes: velocidade de agitação de 100 rpm e 150 rpm; temperatura de 25ºC e 37ºC e pH 5,0 e 7,0, respectivamente. Após iniciada a fermentação não houve nenhuma adição de qualquer espécie com o objetivo de suplementar ou alterar o meio. As variáveis estudadas demonstraram importante relação com a variação da produção de biomassa pela levedura *Roduthorula glutinis* e seus resultados foram expressos na Tabela 6.

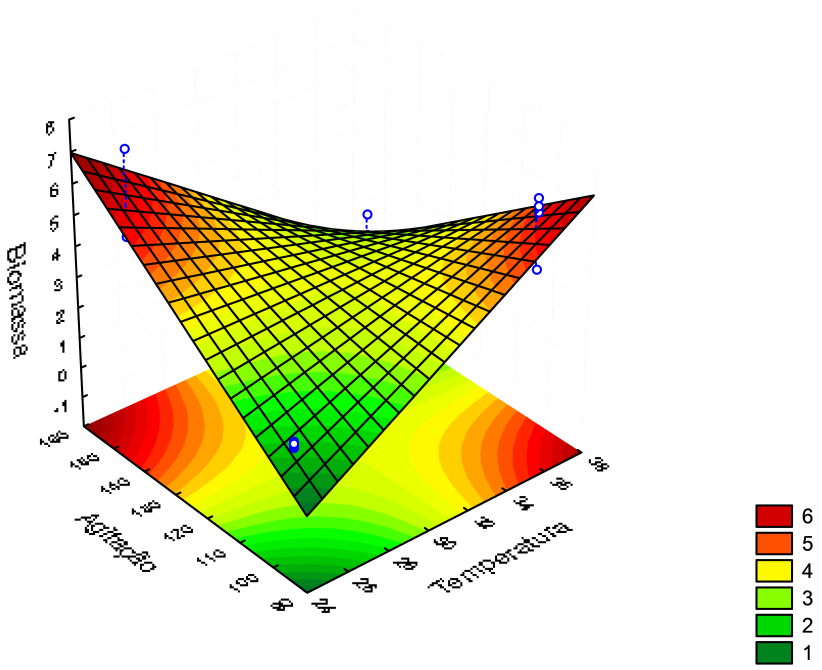
Pode-se observar na Tabela 6 que ao fixar a agitação em 100 rpm, nível inferior de planejamento, a temperatura que mais produziu biomassa foi 37ºC. Entretanto, quando a agitação foi ajustada para 150 rpm houve uma maior produção de biomassa quando a temperatura foi de 25ºC. Segundo a Tabela 6 os maiores valores de produção de biomassa estão relacionados com o pH 7,0 com exceção dos experimentos números 5 e 6 que aumentaram a sua produção quando o pH foi mantido em 5,0. Sendo assim, pode-se afirmar que o experimento em que houve maior produção de biomassa foi o experimento 11 que produziu 3,018 g/L. Isto se deve ao fato de que quase não houve fase de adaptação do microrganismo ao meio e nessas condições a *Roduthorula glutinis* teve o seu crescimento exponencial após a segunda hora do início da fermentação (Figura 20). Também pode ser observado que o aumento da agitação de um modo geral aumentou a multiplicação celular sendo importante fator para uma melhor fermentação.

Tabela 7 Resultados do planejamento experimental para produção de biomassa

Ensaio	Agitação (rpm)	T (ºC)	pH	Duplicata	Biomassa (g/L)
1	-1	-1	-1	1	0,719
2	-1	-1	-1	2	0,653
3	-1	-1	+1	1	0,696
4	-1	-1	+1	2	0,759
5	-1	+1	-1	1	2,586
6	-1	+1	-1	2	2,521
7	-1	+1	+1	1	2,418
8	-1	+1	+1	2	2,281
9	+1	-1	-1	1	2,039
10	+1	-1	-1	2	2,338
11	+1	-1	+1	1	3,018
12	+1	-1	+1	2	2,205
13	+1	+1	-1	1	0,713
14	+1	+1	-1	2	0,728
15	+1	+1	+1	1	0,765
16	+1	+1	+1	2	0,716

A Figura 8 mostra os valores de biomassa produzidos em relação à agitação e à temperatura. Quando a temperatura estava em seu nível mais baixo (25ºC), a produção de biomassa cresceu com o aumento da velocidade de agitação. Entretanto, quando a temperatura estava em seu nível mais alto (37ºC), a produção de biomassa diminuiu com o aumento da velocidade de agitação. Esse comportamento mostra claramente que esses efeitos apresentam características de interação.

Figura 8 Valores da biomassa produzida comparando a agitação e a temperatura.



Por outro lado, quando observamos a produção de biomassa em relação às variáveis temperatura e pH, foi demonstrado (Figura 9) que houve uma maior produção de biomassa quando temperatura e pH estiveram elevados. Uenojo *et al.* 2007 demonstraram que a temperatura influenciou diretamente o crescimento celular da levedura, eles testaram várias temperaturas e constataram que a faixa em que houve maior crescimento foi de 28 a 30°C. Aksu e Eren (2007) observaram que a *R. glutinis* dobrou sua produção de biomassa quando esteve em condições em que a temperatura esteve entre 25 e 30ºC, porem o crescimento diminuiu em temperaturas maiores. Os resultados obtidos por esses autores se devem ao fato de que eles não analisaram a variável pH, indicando a importância dessa variável no planejamento experimental.

Quando se analisa a produção de biomassa em relação às variáveis velocidade de agitação e pH, foi demonstrado (Figura 10), pode-se observar que a produção de biomassa foi maior quando as variáveis agitação e pH estavam em maiores valores. Ao se fixar a agitação em seu nível mais baixo (100 rpm), a variação de pH não influenciou a produção de biomassa. Entretanto, quando a velocidade de agitação estava em seu nível mais alto (150 rpm), a produção de biomassa cresceu com o aumento do pH. A superfície indica que maiores produções de biomassa serão alcançadas quando ensaios forem realizados em pH 7,0 e velocidade de agitação 150 rpm. Isso indica que os efeitos de pH e agitação não tem uma variação linear, esses

efeitos podem apresentar alguma interação entre si, ou seja, não podem ser analisados separadamente.

Figura 9 Valores da biomassa produzida em função da temperatura e pH.

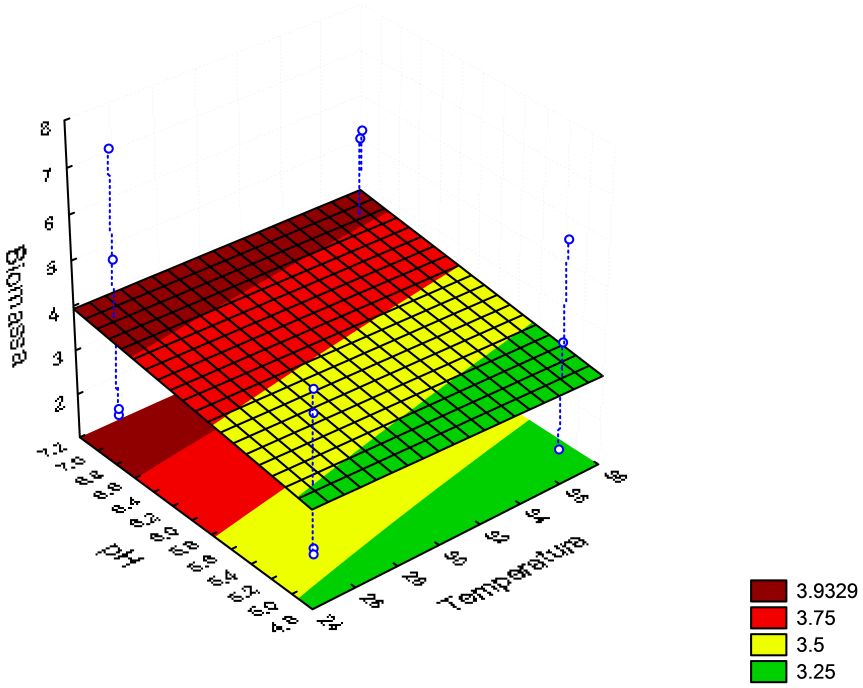
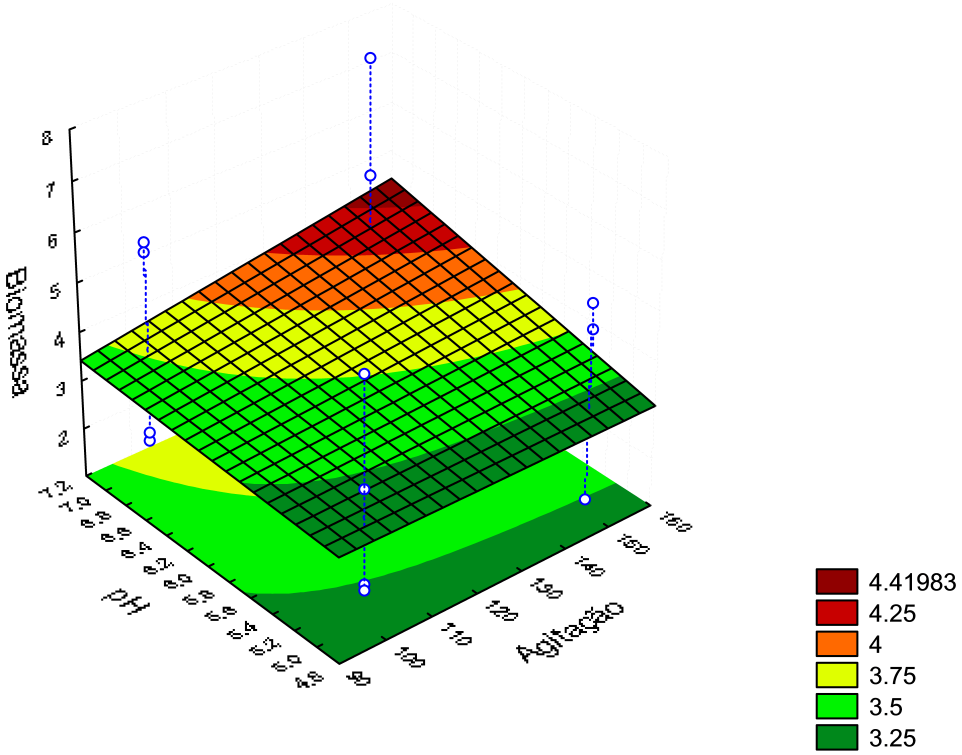


Figura 10 Valores da biomassa produzida comparando velocidade de agitação e pH.



O número de fatores que foi analisado (três) resulta em um modelo matemático com até oito termos, incluindo interações com até três termos. Os valores ótimos das variáveis selecionadas podem ser obtidos através da resolução da equação de regressão e também por análise dos gráficos de superfície de resposta da forma:

$$Y = \beta o + \sum k\, j + 1\ \beta jxj + \sum\sum i\ b\, j\ \beta ijxixj + \sum k\, j + 1\ \beta jjx\ 2\, j + \varepsilon$$

Em que:

- Y é a resposta prevista;
- βo, βj, βij e βjj constante coeficientes;
- xi e xj são as variáveis ou fatores independentes codificados;
- ε é o erro aleatório.

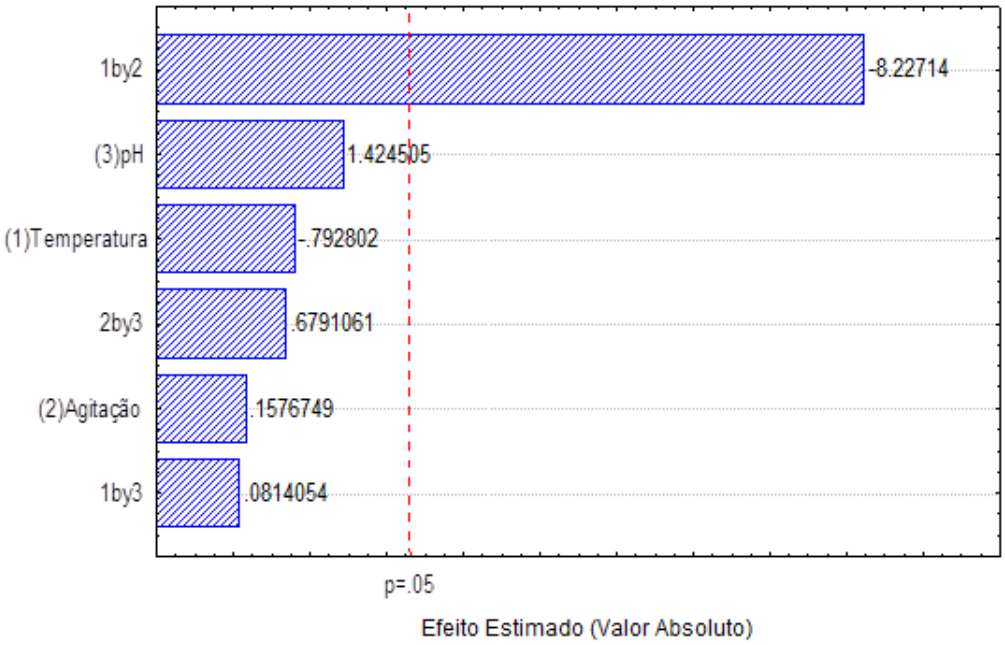
A Tabela 8 mostra claramente que alguns efeitos são mais significativos que outros. Assim, os valores determinados para esses fatores menos significativos podem ser atribuídos às flutuações aleatórias do processo, isto é, ao "ruído" embutido nos valores das respostas (princípio da esparsidade dos efeitos). A análise de variância (ANOVA) apontou que, das variáveis individuais, as que mais exercem influencia

sobre a produção tanto de biomassa quanto de betacaroteno foi a temperatura e a velocidade de agitação, contudo quando observadas em conjunto, conforme pode ser observado no gráfico de Pareto (Figura 11), pode-se observar que a interação temperatura/agitação foi o efeito mais significativo com intervalo de confiança de 95%.

Tabela 8 ANOVA para produção de biomassa

	SS	*df*	*MS*	*F*	*p*
• Temperatura	0,50101	1	0,50101	0,62854	0,450762
• Agitação	0,01982	1	0,01982	0,02486	0,878620
• pH	1,61751	1	1,61751	2,02922	0,192118
Interação (1)(2)	53,95322	1	53,95322	67,68578	0,000036
Interação (1)(3)	0,00528	1	0,00528	0,00663	0,937119
Interação (2)(3)	0,36762	1	0,36762	0,46119	0,516233
Erro	6,37690	8	0,79711		
Soma Quadrática Total (SS)	61,90916	14			

Figura 11 Gráfico de Pareto para produção de biomassa



O modelo para todas as variáveis analisadas foi considerado satisfatório, pois os gráficos dos resíduos *versus* as respostas têm uma aparência aleatória e os gráficos normais dos resíduos têm uma aparência mais ou menos retilínea. Na equação 01 é apresentado o modelo obtido para a produção de biomassa com 75% de intervalo de confiança. As variáveis que mais influenciaram a bioprodução foram temperatura e velocidade de agitação, principalmente quando são observadas em conjunto conforme pode ser observado no gráfico de Pareto (Figura 11).

$$Biomassa = 3{,}5057 - 3{,}8713\ \ Temperatura\ \ Agitação + 0{,}6703\ \ pH \quad (01)$$

(0,2353) (0,4706) (0,4706)

É importante observar que o diagrama de Pareto mostra claramente que as variáveis temperatura e agitação não podem ser analisados separadamente, o pH mais

importante é o 7,0 (nível +1), bem como a melhor agitação foi a 150 rpm (nível +1). A temperatura que mais favoreceu o crescimento da biomassa de uma forma geral foi a 25ºC (nível –1).

Individualmente os parâmetros temperatura e velocidade de agitação não demonstraram influencia com intervalo de confiança de 95%, entretanto quando analisados em conjunto obtiveram maior significância. Isso aponta para o fato de que a relação da temperatura com a agitação influencia diretamente na produção de biomassa.

7.3.2.2 Planejamento experimental para analisar a produção de carotenóides em meio sintético

Foi realizado o planejamento fatorial experimental 2^3 para a bioprodução de carotenóides cujas condições estudadas foram: pH, velocidade de agitação e temperatura. A escolha dessas variáveis (Tabela 8) teve como fonte a literatura. Os ensaios foram realizados nos níveis: (–1) e (+1): temperaturas de 25 ºC e 37 ºC; pH 5,0 e 7,0 e velocidade de agitação de 100 rpm e 150 rpm.

Na Tabela 9 estão descritos os dados do planejamento experimental tendo como objetivo a bioprodução de carotenóides. Pode-se observar principalmente que em relação às influências da agitação e da temperatura, os maiores resultados estão relacionados com menor temperatura e maior agitação. Essa relação influenciou positivamente na carotenogênese, havendo um maior aumento quando experimentos foram realizados em pH 7,0 (ensaios 6 e 4).

Tabela 9 Resultados do planejamento experimental para bioprodução de carotenóides

Ensaio	Agitação (rpm)	T (ºC)	pH	Carotenóide (mg/L)
1	-1	-1	-1	3,661
2	-1	-1	+1	3,225
3	-1	+1	-1	3,225
4	-1	+1	+1	9,331
5	+1	-1	-1	8,833
6	+1	-1	+1	11,170
7	+1	+1	-1	2,726
8	+1	+1	+1	1,978

9	-1	-1	-1	3,661
10	-1	-1	+1	3,225
11	-1	+1	-1	1,761
12	-1	+1	+1	5,531
13	+1	-1	-1	2,945
14	+1	-1	+1	9,332
15	+1	+1	-1	2,727
16	+1	+1	+1	1,761

Pode ser observado na Figura 12 que há um aumento na produção de betacaroteno com a redução da temperatura (25°C) e esse efeito é muito mais pronunciado quando o pH se encontrava em seu nível mais elevado (7,0). Quando o pH estava em seu nível mais baixo, houve um leve aumento da produção de betacaroteno a medida que a temperatura diminuía. Ou seja, o decréscimo da temperatura faz o microrganismo direcionar sua produção carotenóides para o betacaroteno. Esse efeito pode ser mais observado quando o pH estava em torno da neutralidade (nível +1). Nestas condições o microrganismo já havia chegado a um nível satisfatório de crescimento e a troca de íons com o meio não alterou seu pH, de modo que favoreceu a produção do betacaroteno.

A Figura 13 mostra a produção de betacaroteno em relação à temperatura e a velocidade de agitação, onde pode ser observado que quando a velocidade de agitação e a temperatura estão em seus níveis mais baixos (100 rpm e 25 ºC) houve maior produção de betacaroteno. Quando a temperatura estava em seu nível mais baixo, pode-se observar que a produção de betacaroteno teve um suave decréscimo à medida que a velocidade de agitação aumentava. Quando a temperatura estava em seu nível mais alto (37ºC), a produção de betacaroteno apresentou um crescimento a medida que a velocidade de agitação diminuía, ou seja, menores temperaturas e menores velocidades de agitação favoreceram a produção deste carotenóide.

A Figura 14 mostra a produção de betacaroteno em relação a velocidade de agitação e de pH. Pode-se observar que a maior produção de betacaroteno aconteceu quando a velocidade de agitação estava em seu nível mais baixo (100 rpm) e o pH em seu nível mais alto (7,0). A Figura 14 também mostra que quando o pH estava em 5,0 praticamente não houve mudança na bioprodução de betacaroteno a medida que a

velocidade de agitação se modificava. Observando-se uma bioprodução baixa. Sendo assim foi possível observar que não houve grande influência da variável velocidade de agitação na produção do betacaroteno quando o pH do meio variou de 5,0 até 7,0. Resultado semelhante pode ser observado quando o pH estava em seu nível mais baixo (5,0). Nesta condição, ao se variar a velocidade de agitação, a produção de betacaroteno se manteve baixa. Portanto, baixos valores de pH e velocidades de agitação altas não favorecem a formação de betacaroteno.

Figura 12 Valores produção de carotenóides comparando o pH e a temperatura.

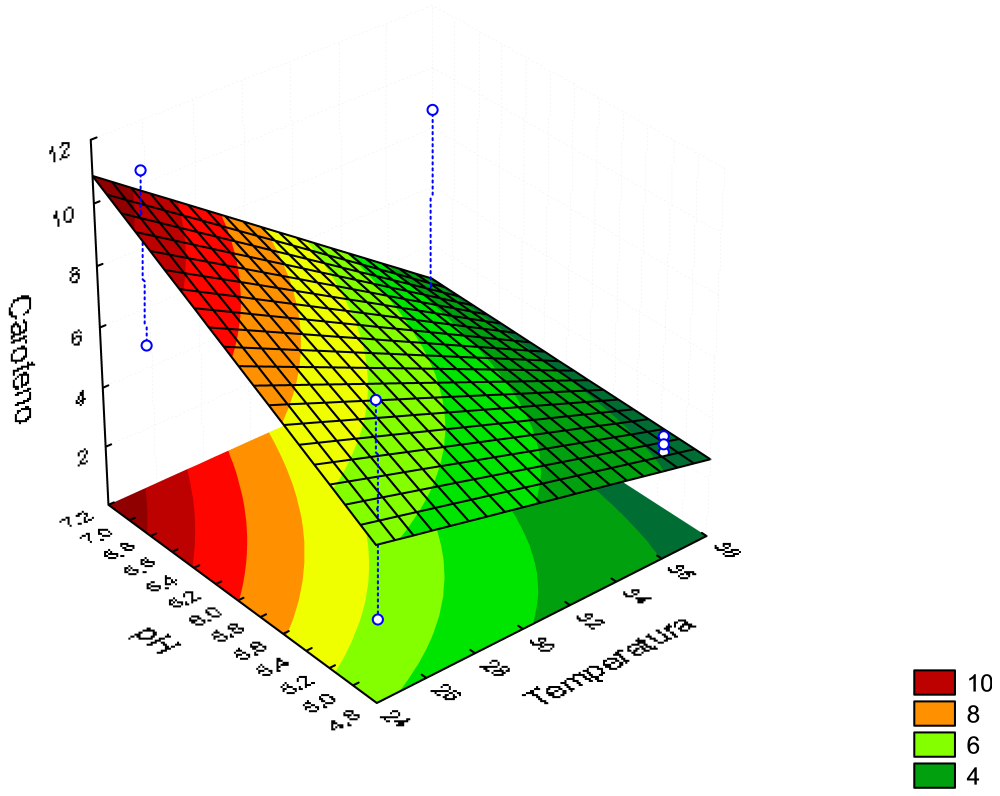


Figura 13 Valores produção de carotenóides comparando a agitação e a temperatura

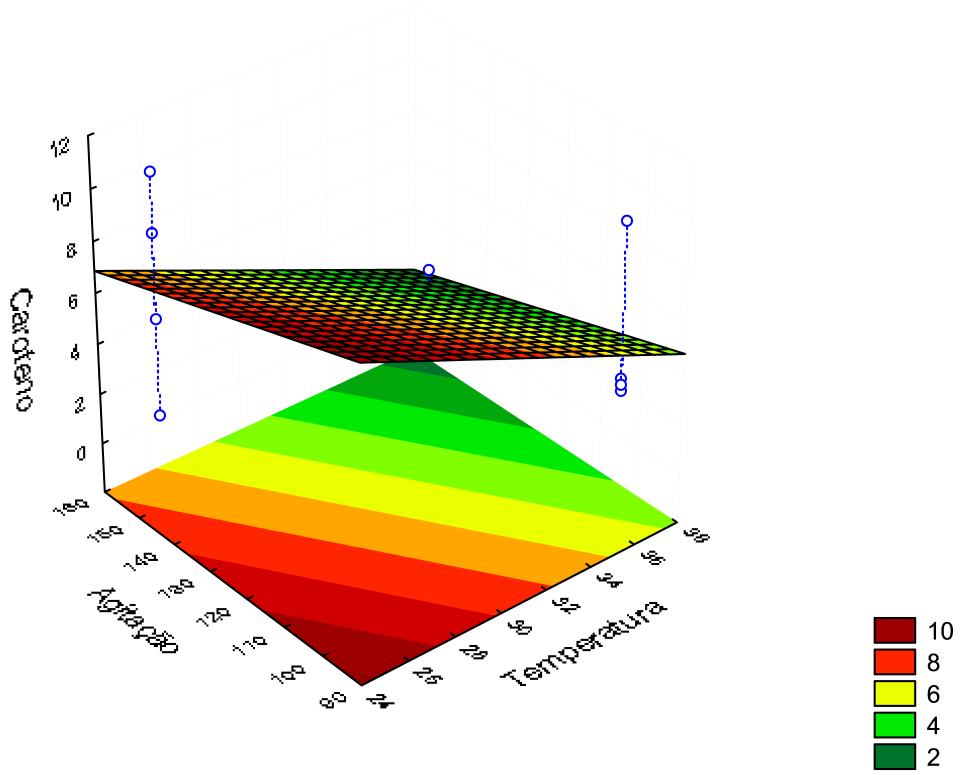
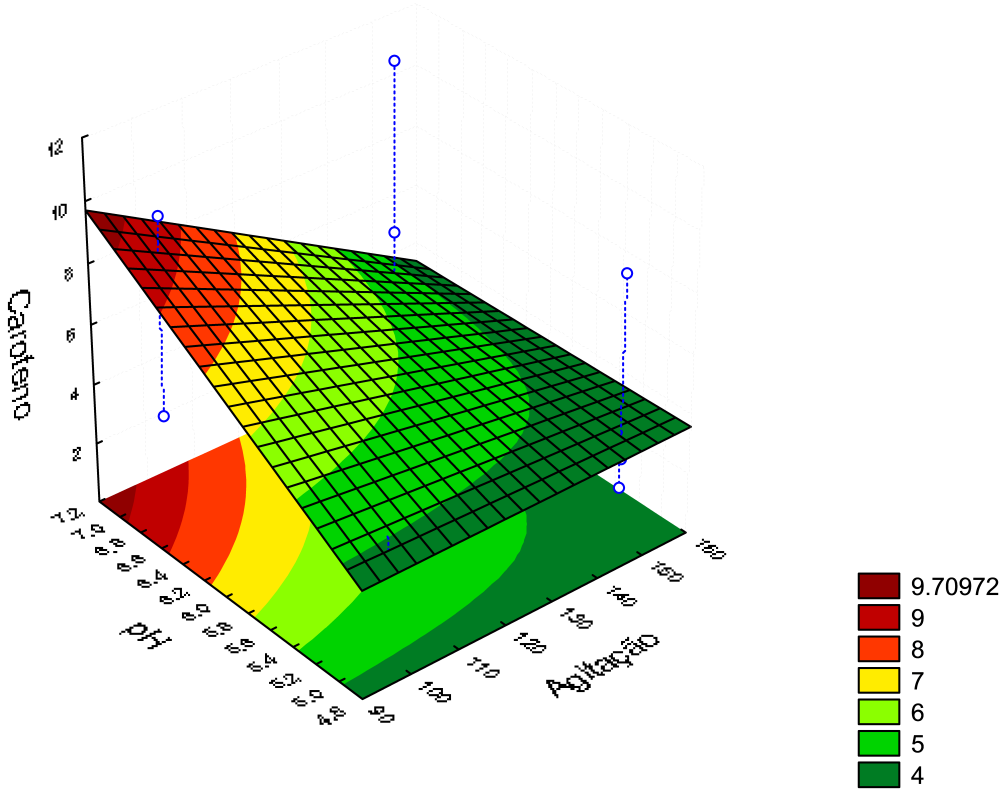


Figura 14 Valores produção de carotenóides em relação ao pH e a agitação

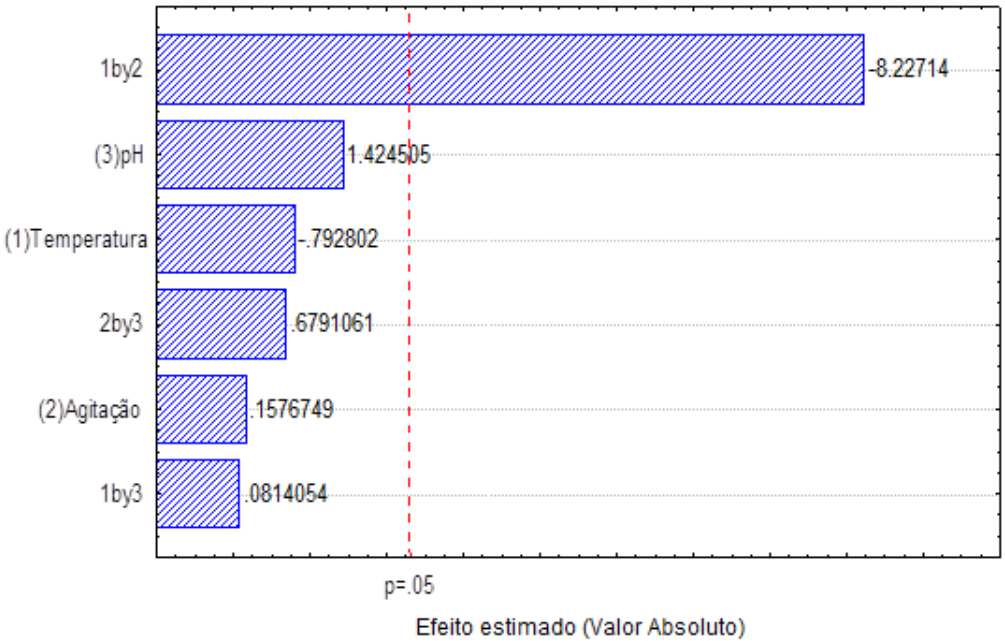


Os resultados obtidos neste estudo concordam com os dados encontrados por Aksu e Eren (2007) que observaram que o aumento do pH de 3,0 para 7,0 alterou positivamente a produção de betacaroteno em leveduras. Pôde-se observar ainda através da Figura 14 que, de modo geral, quanto menor foi a velocidade de agitação mais favorável ao aumento na carotenogênese.

A Figura 15 mostra o gráfico de Pareto para os efeitos significativos num intervalo de confiança de 75%. Analisando o gráfico, pode-se observar que não houve efeitos de interação significativos. Analisando o efeito da temperatura, pode-se

observar que este foi o único efeito significativo estatisticamente para produção de betacaroteno. Efeitos de interação não se mostraram significativos para a produção de betacaroteno. Sabe-se que uma maior temperatura aumenta a velocidade de síntese das reações de forma geral, entretanto outros fatores devem ser considerados ao se analisar o efeito da temperatura nas reações biológicas.

Figura 15 Gráfico de Pareto com 75% de intervalo de confiança.



Analisando a Tabela 10 que mostra a ANOVA para a produção de carotenóides,

pode-se observar que o valor do teste F 2,6 é maior que F(5,1) indicando que o modelo é significativo com 25% de nível de confiança. O valor da probabilidade do nível *p* também é baixo (0,167) indicando a significância do modelo para a variável temperatura. Pois, os efeitos de interação não foram estatisticamente significantes, assim, o ajuste do modelo foi de regressão linear. Deve-se observar que as condições operacionais escolhidas levaram em consideração crescimento de biomassa e produção de betacaroteno, que são importantes respostas para definir a produção dessa pró-vitamina. Além disso, para se obter alta concentração de biomassa com alta produção de betacaroteno não é necessário trabalhar em um único conjunto de condições experimentais. O modelo de regressão foi ajustado, como mostra a equação 2.

$$Betacaroteno = 5{,}6865 - 4{,}5254\ Temperatura \quad (02)$$

(1,2549) (2,8061)

Tabela 10 Análise de variância (ANOVA) para produção de betacaroteno

	SS	*df*	*MS*	*F*	*p*
• Temperatura	32,7672	1	32,76715	2,600845	0,167725
• Agitação	8,1074	1	8,10741	0,643513	0,458855
• pH	17,8920	1	17,89201	1,420152	0,286853
Interação (1)(3)	6,1155	1	6,11553	0,485411	0,517036
Interação (2)(3)	5,7319	1	5,73191	0,454962	0,529911
Erro	62,9933	5	12,59866		
Soma Quadrática Total SS	118,9314	10			

7.3.3 Crescimento celular

A morfologia das colônias de *Roduthorula glutinis* é mostrada na Figura 16.

Esta linhagem cresceu em meio YMA como descrito na metodologia. Elas apresentam cor vermelho alaranjado, textura firme e não apresenta maiores dificuldades de cultivo ou de manutenção.

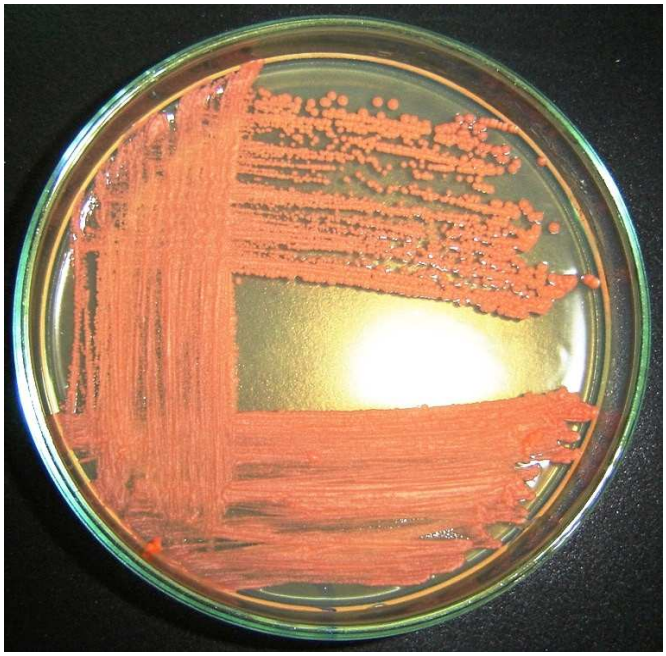


Figura 16 Características macroscópicas das colônias de *Roduthorula glutinis* em meio YMA após 48 horas de crescimento.

7.3.4 Crescimento celular em meio sintético

A Figura 17 mostra o crescimento da biomassa ao longo de tempo, cultivada na temperatura de 37 C, velocidade de agitação 150 rpm com pH 5,0 e 7,0. Pode-se observar na Figura 17 que o cultivo de *R. glutinis* no pH 5,0 mostrou que a fase *lag* iniciou-se antes da vigésima hora de corrida e apresentou crescimento celular até a 44ª hora, atingindo seu pico máximo de crescimento com 0,728g/L. Sua Fase Estacionária foi imprecisa, pois apresentou muitas variações de concentração, sendo de pouca produção de biomassa. Já o cultivo no pH 7,0 apresentou uma fase *lag* um pouco mais extensa (mais de vinte horas nesta fase) e também houve pequena produção de biomassa 0,764g/L, o que não é interessante para o objetivo deste trabalho.

A Figura 18 mostra o cultivo de *R. glutinis* na condição de 100 rpm, temperatura de 25ºC e com pHs 5,0 e 7,0. O crescimento celular iniciou a fase *log* na 26ª hora, atingindo seu pico máximo de produção de biomassa e iniciando a fase

estacionária em 44 horas após o início da fermentação. A concentração de microrganismo atingiu 0,715 g/L quando o pH foi ajustado para 5,0 e atingiu 0,759 g/L quando o pH foi ajustado para 7,0.

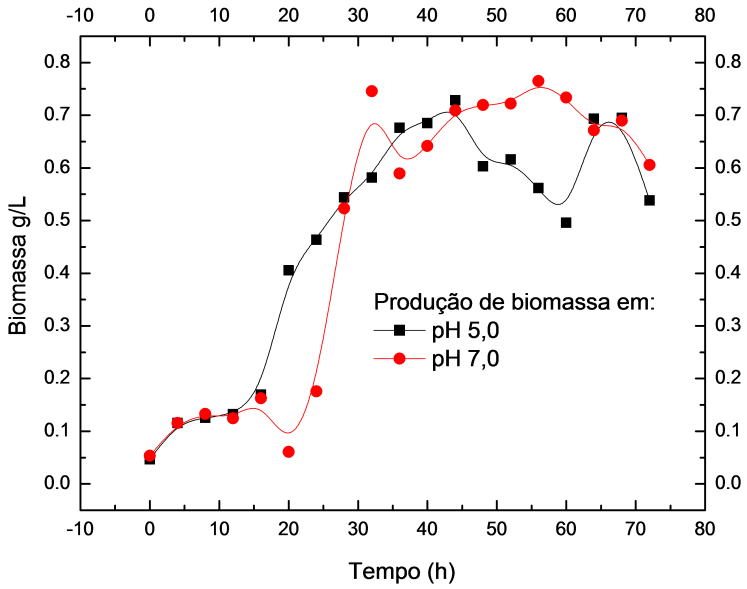


Figura 17 Crescimento celular da levedura *Roduthorula glutinis* em meio YM, pH 5,0 e pH 7,0 nas condições: velocidade 150 rpm e temperatura 37ºC. Durante 72 horas.

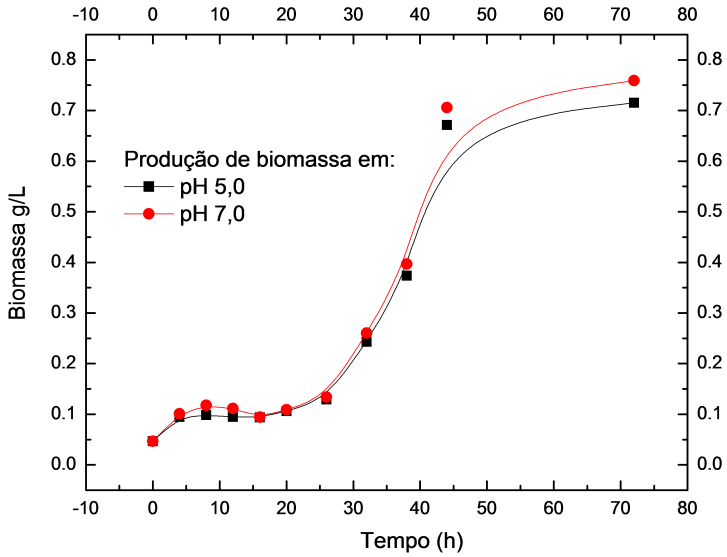


Figura 18 Crescimento celular da levedura *Roduthorula glutinis* em meio YM, pH 5,0 e pH 7,0 nas condições: velocidade 100 rpm e temperatura 25ºC. Durante 72 horas.

A Figura 19 mostra o crescimento de biomassa ao longo do tempo para o cultivo com velocidade de agitação de 100 rpm e 37C em pH 5,0 e 7,0. Pode-se observar na Figura 19 que esta condição apresentou uma fase de adaptação de crescimento bem curta e também apresentou uma baixa produção de biomassa nas primeiras vinte horas de fermentação. A levedura apresentou crescimento apenas depois da 20ª hora de cultivo. Neste período seu crescimento foi bastante significativo e quase não houve fase de adaptação, resultado muito promissor e interessante, visto que houve uma excelente produção de biomassa onde a fase *log* durou até a 59ª hora no cultivo em pH 5,0 e até a 65ª hora no cultivo em pH 7,0. A levedura alcançou uma concentração nos pH 5,0 e 7,0 de 2,366g/L e 2,571g/L respectivamente.

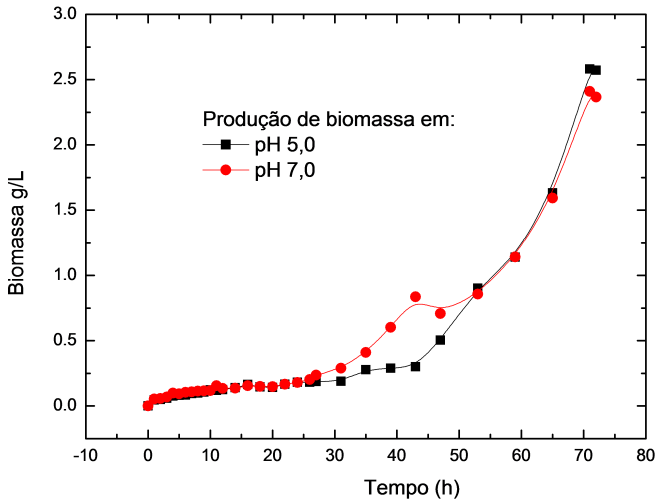


Figura 19 Crescimento celular da levedura *Roduthorula glutinis* em meio YM, pH 5,0 e pH 7,0 nas condições: velocidade 100 rpm e temperatura 37ºC. Durante 72 horas.

A Figura 20 mostra o cultivo de *R. glutinis* ao longo do tempo em meio YM nas condições de 150 rpm e 25C nos pHs 5,0 e 7,0. A Figura 20 aponta que a condição de 150 rpm e 25ºC foi a que mais produziu biomassa e onde a levedura apresentou a maior fase *log* quando comparada com as outras condições de cultivo

testadas. A fase *log* começou praticamente desde o início da fermentação, quase não houve fase de adaptação, sendo isso muito interessante para obtenção de alta produtividade industrial, pois a levedura não demonstrou dificuldades para se adaptar ao meio e iniciar a produção de biomassa. A fase *log* é evidenciada principalmente a partir da quarta hora do início da fermentação onde há um importante aumento no crescimento exponencial. A *Roduthorula glutinis,* nessas condições experimentais, permanece na fase exponencial (onde há maior produção de biomassa) durante quase todas 72 horas da fermentação, atingindo seu pico máximo de multiplicação na 68ª hora com concentração de 2,338g/L no pH 5,0 e 3,018 g/L no pH 7,0.

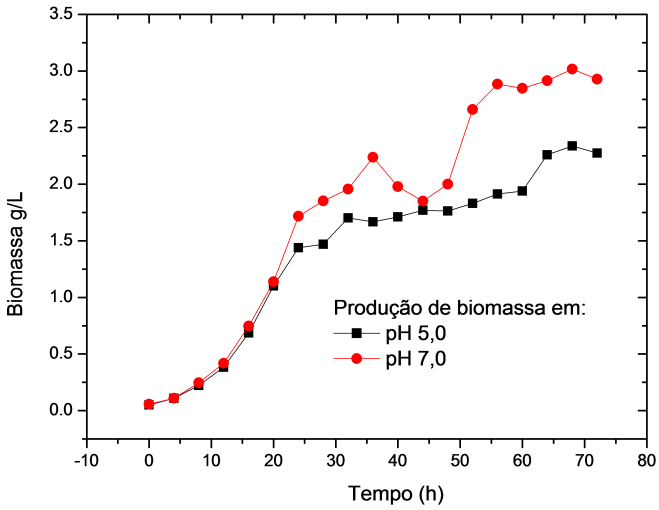


Figura 20 Crescimento celular da levedura *R. glutinis* em meio YM, pH 5,0 e pH 7,0 nas condições: velocidade 150 rpm e temperatura 25ºC. Durante 72 horas.

7.3.5 Produção de biomassa tendo com substrato a polpa do umbu

A Figura 21 mostra o crescimento celular da *R. glutinis* ao longo de tempo cultivada em polpa de umbu. A fermentação foi realizada com velocidade de 150 rpm, 25C e pH 5,0 e 7,0. Pode ser observado que o microrganismo produziu mais biomassa em pH 7,0 chegando ao seu pico máximo de produção na 72º hora com 2,243 g/L.

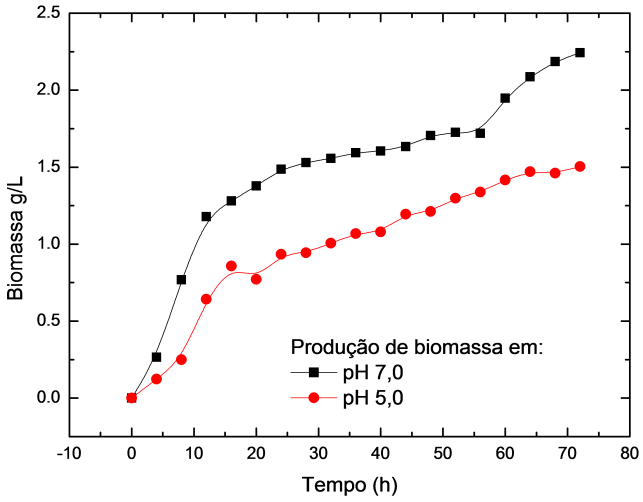


Figura 21 Crescimento celular da levedura *Roduthorula glutinis* cultivado em polpa de Umbu nas condições: pH 5,0 (a) e pH 7,0, velocidade 150 rpm e temperatura 25ºC. Durante 72 horas.

7.3.6 Comparação da produção de biomassa produzida *Roduthorula glutinis* com umbu e com meio sintético nas condições: pH 7,0, agitação 150 rpm e temperatura 25ºC.

A Figura 22 mostra o crescimento celular cultivado em meio sintético e em meio com polpa de umbu na velocidade de 150 rpm, 25C e pH 7,0. Pode-se observar que no início do cultivo (primeiras 24 horas), o umbu apresentou maior crescimento celular que o meio sintético. Nas horas seguintes esse comportamento mudou, o umbu apresentou crescimento celular maior até o final da fermentação. A poupa do umbu se mostrou um meio bem propício ao crescimento do microrganismo quando comparado com o meio sintético. Isso se deve ao fato de o umbu ser um produto rico em macro e micro nutrientes, conseguindo assim, suprir as necessidades nutricionais do microrganismo.

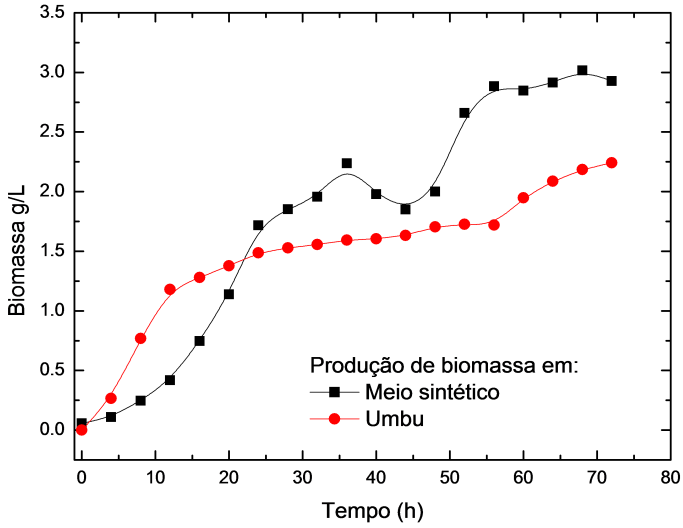


Figura 22 Comparação da produção de Biomassa por *Roduthorula glutinis* com o meio YM e com a polpa do Umbu nas condições: pH 7,0, velocidade 150 rpm e temperatura 25ºC. Durante 72 horas.

7.3.7 Curva de decréscimo de açúcares

A Figura 23 mostra o consumo de açúcares e a produção de betacaroteno ao longo do tempo para o cultivo de *R. glutinis* em polpa de umbu. Pode-se observar que o consumo de açúcares se iniciou com uma concentração de 6,250 g/L e após 72 horas pode-se observar uma baixa concentração (1,386 g/L) de açúcares. Pode-se observar também que a produção de betacaroteno está ligada ao consumo de açúcares, mostrando que este é um metabólito primário importante da *R. glutinis*.

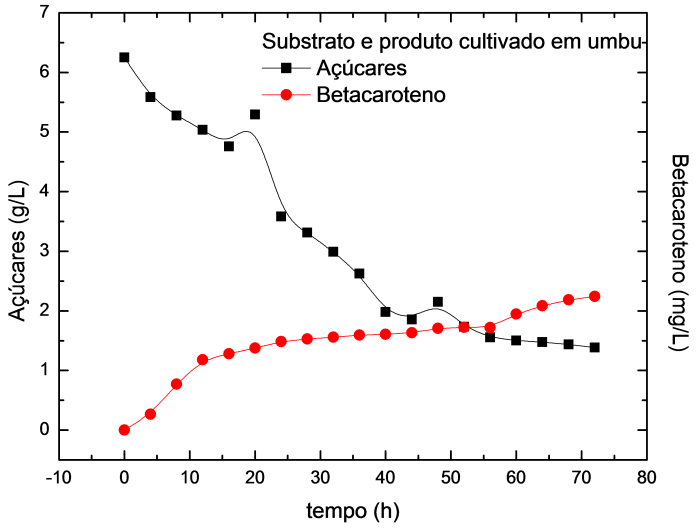


Figura 23 Curva de decréscimo de açúcares por *Roduthorula glutinis* com polpa de umbu nas condições: pH 7,0 (b), velocidade 150 rpm e temperatura 25ºC. Durante 72 horas.

7.3.8 Extração do betacaroteno

7.3.8.1 Solvente acoplado ao ultrassom

Por ser um produto produzido no meio intracelular, a quebra da parede celular da *R. glutinis* de forma adequada e a escolha do método de extração se mostrou uma etapa importante para a quantificação do betacaroteno, pois havia a preocupação de que operações muito drásticas poderiam de alguma forma degradar o produto, uma vez que o betacaroteno possui a característica de ser facilmente oxidada pela luz, temperatura e pH (Mahan & Arlin, 1995).

Sendo assim, foram descartadas formas clássicas de extração como, por exemplo, os Moinhos de Bolas por apresentarem condições operacionais incompatíveis e altas temperaturas locais de processamento, o que degradaria a molécula de betacaroteno. Filtrações, que de um modo geral, são inviáveis neste caso pelo fato de se tratar de uma levedura e causar muito entupimento, o que impossibilita a filtração.

Portanto, a extração do betacaroteno neste trabalho foi feita depois de uma

seleção de solventes mais utilizados na literatura para esse fim. Os solventes escolhidos foram Hexano, Eter de Petróleo e Acetona. Esses solventes são biocompatíveis com o produto, apresentam baixa toxicidade além de possuírem baixa temperatura de vaporização e, por isso, proporcionam facilidade na separação do produto recuperado. Por fim, também foi testado a extração com ultrassom acoplado, para que, com a ajuda das ondas sonoras fosse rompida mais células e assim alcançar maior concentração do carotenóide desejado e, com isso, aumentar o rendimento da extração.

A Tabela 11 mostra os resultados obtidos da extração de betacaroteno com os diferentes solventes estudados e com o uso da técnica de ultrassom. Pode-se observar que as maiores concentrações de betacaroteno foram alcançadas quando se utilizou solvente acoplado ao ultrassom.

Tabela 11. Concentração de Betacaroteno utilizando Hexano, Éter de Petróleo e Acetona, com e sem o auxílio do ultrassom.

Solvente	Concentração de betacaroteno (mg/L)	
	Extração com solvente	Extração com solvente acoplado ao ultrassom
ÉTER DE PETRÓLEO	8,65	10,36
ÉTER DE PETRÓLEO + ACETONA	2,58	4,129
HEXANO	1,8	2,727
ACETONA	1,9	2,5
ACETONA + HEXANO	1,3	1,885
ÉTER DE PETRÓLEO + HEXANO	0,968	1,792

A extração do carotenóide com o auxilio do ultrassom foi mais eficiente mesmo quando se usou concentrações de solvente 50:50 (v/v). Observa-se também que o Éter de Petróleo foi o solvente mais eficaz na extração, recuperando mais que o dobro dos demais solventes usados. A mistura de hexano com éter de petróleo foi o solvente que menos conseguiu extrair betacaroteno, mesmo com o uso de ultrassom. Assim, o solvente escolhido nesta pesquisa foi éter de petróleo acoplado a técnica de ultrassom.

7.3.8.2 Extração do betacaroteno produzido a partir de meio sintético

A Tabela 12 mostra os resultados de extração de betacaroteno para os ensaios realizados em meio sintético sob as diferentes condições experimentais estudadas. Pode-se observar que a condição de 150 rpm, 25ºC e pH 7,0 foi a que mais produziu carotenóides devido a sua grande concentração celular de 3,017 g/L (produção de 11,17 mg/L de betacaroteno) e a sua curva quase não apresentou fase de adaptação (Figura 19) demonstrando assim a grande afinidade do microrganismo à esta condição.

Por outro lado, pode-se observar também que a condição de 150 rpm, 37ºC e pH 7,0 foi a que menos produziu o carotenóide 1,978 mg/L (concentração celular de 0,764 g/L), visto a demora do microrganismo para se adaptar a essa condição experimental e começar de fato a fermentação que ultrapassou a vigésima hora de cultivo (Figura 16)

Tabela 12 Concentração de betacaroteno utilizando, éter de petróleo com o auxílio do ultrassom**.**

CURVAS	Agitação (rpm)	Temperatura (ºC)	pH	Carotenóides (mg/L)
1	150	25	7,0	11,170
2	100	37	7,0	9,331
3	150	25	5,0	8,833
4	100	25	5,0	3,661
5	100	37	5,0	3,225
6	100	25	7,0	3,225
7	150	37	5,0	2,726
8	150	37	7,0	1,978

7.3.8.3 Extração do betacaroteno extraído a partir do cultivo em polpa de umbu

O microrganismo estudado nesta pesquisa foi analisado em microscópio em duas etapas: anterior e posterior à extração do carotenóide do meio intracelular. Isto foi feito para verificar a ruptura da parede celular da *R. glutinis*. A Figura 24 mostra *Rhodotorula glutinis* após cultivo submerso em polpa de umbu, com aumento de 100 ×.

Na Figura 24, pode-se observar uma amostra do fermentado puro de *R. glutinis* cultivado em polpa de umbu por 72 horas antes da adição do Éter de Petróleo, onde pode ser observado o betacaroteno em forma de um ponto brilhante no meio intracelular. A Figura 25 mostra a amostra da fermentação ocorrida em polpa de umbu por 72 horas após a utilização do ultrassom e a adição do solvente (Éter de Petróleo). Pode-se observar que a levedura foi rompida e o produto extraído tornando a coloração do meio mais alaranjada, cor característica do betacaroteno, como também é demonstrado na Figura 26 após a última centrifugação, onde as células encontram-se no fundo do tubo.

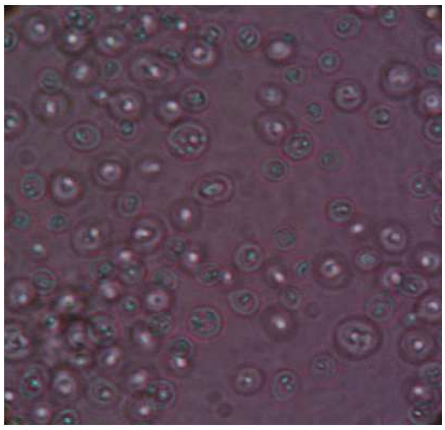


Figura 24 *Rhodotorula glutinis* após cultivo submerso em polpa de umbu, com aumento de 100×.

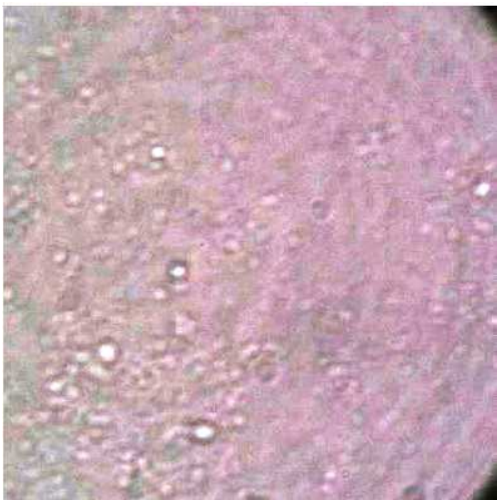


Figura 25 *Rhodotorula glutinis* após cultivo submerso em polpa de umbu com aumento de 100 ×, após uso de ultrassom e solvente: Éter de Petróleo, por 15 minutos.

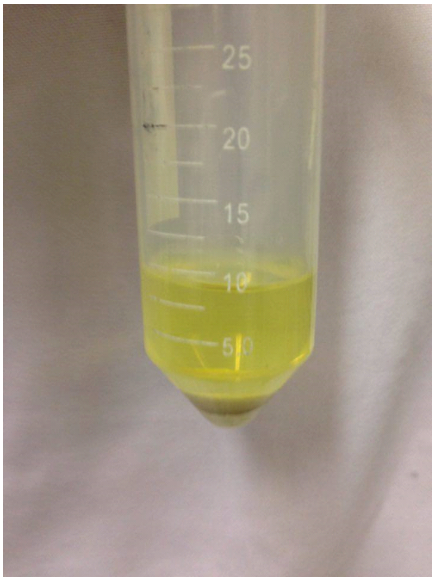


Figura 26 Carotenóide produzido por *Rhodotorula glutinis* após cultivo submerso em polpa de umbu por 72 horas, extraído com Éter de Petróleo nas condições: 150 rpm, 25ºC e pH 7,0 (após centrifugação).

A Tabela 13 sumariza as quantidades de betacaroteno alcançadas em todo este trabalho. Os resultados da produção de betacaroteno por *Roduthorula glutinis* em polpa de umbu estão expressos na Tabela 12. Foi alcançado a máxima produção no

pH 7,0 onde foi produzido 11,92 mg/L após 72 horas de fermentação. Portanto, o umbu mostrou-se um substrato viável para produção de betacaroteno.

Tabela 13 Produção de carotenóide via cultivo submerso utilizando o fruto do umbuzeiro após 72 horas de fermentação nas condições: 150 rpm, 25ºC e pH 7,0

Ensaio	pH	Concentração mg/L
1	7,0	11,92
2	5,0	8,210

7.3.9 Análise em CLAE do carotenóide produzido

A etapa anterior à análise do betacaroteno em CLAE foi a escolha da fase móvel, sendo assim fora feitos testes com padrões de betacaroteno de acordo com trabalhos publicados na literatura e do grupo de pesquisa com várias composições da fase móvel (acetona, álcool isopropílico e metanol). Alguns critérios foram observados para a seleção da fase móvel mais adequada, os critérios foram: solubilidade, estabilidade da amostra no solvente escolhido, e o tempo de retenção. Dentre todas as fases analisadas, o metanol foi a que apresentou maior adequação aos critérios levados em consideração.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é uma técnica bastante sensível para essa análise, sendo assim, foi necessário a realização de uma curva de calibração do betacaroteno como pode ser visto na Figura 27 para se saber qual o tempo do pico do betacaroteno com a fase móvel escolhida (metanol) que nesse caso foi de aproximadamente 7,0 minutos.

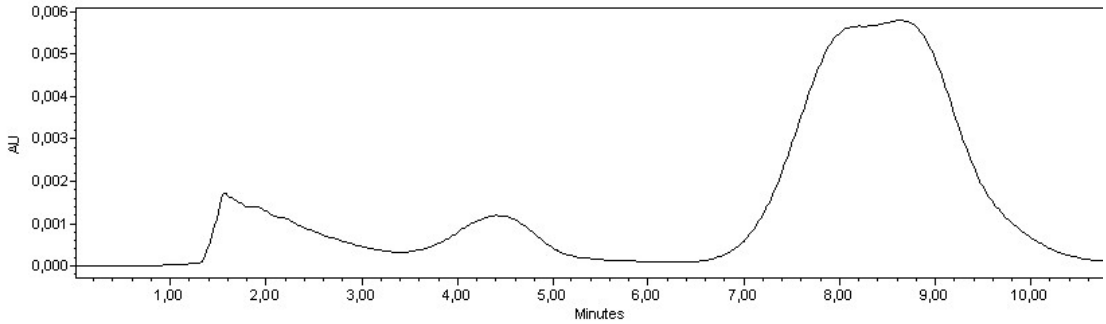


Figura 27 Análise do padrão do betacaroteno por HPLC.

A solução contendo o betacaroteno produzido pela levedura em polpa de umbu foi analisado em HPLC. A Figura 28 apresenta o cromatograma da análise do betacaroteno após ser extraído com Éter de petróleo com a ajuda do ultrassom.

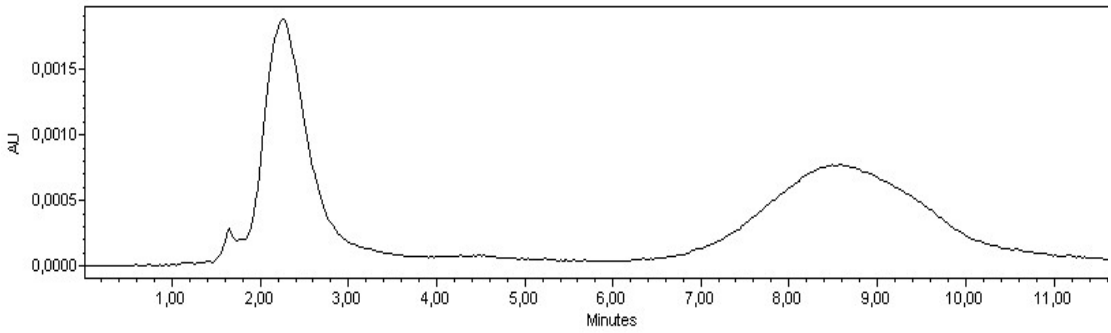


Figura 28 Cromatograma da análise do betacaroteno obtido através do cultivo submerso de *Roduthorula glutinis* em polpa de umbu após extração com Éter de Petróleo acoplado ao ultrassom.

Durante a análise do betacaroteno por CLAE, obtido através do cultivo submerso de *R. glutinis* em polpa de umbu após extração com Éter de Petróleo acoplado ao ultrassom surgiram três picos (Figura 28) o primeiro e o segundo picos surgiram em aproximadamente 1,5 minutos e faz referência ao solvente (Éter de Petróleo) e o terceiro pico apareceu no tempo do betacaroteno especificado na curva de calibração que foi em aproximadamente 7,0 minutos

A separação dos compostos é evidenciada pelo fato de que os picos não apresentaram efeito de cauda demonstrando que houve uma completa separação dos compostos garantindo a qualidade deste método de extração utilizado.

7.4 CONCLUSÕES

Após a finalização deste trabalho, pode-se chegar às seguintes conclusões:

A maior concentração de betacaroteno produzido foi alcançada com a

fermentação da polpa do umbu após 72 horas de fermentação chegando a 11,92 mg/L, nas condições operacionais de: velocidade de agitação 150 rpm, temperatura 25ºC e pH 7,0.

A bioprodução de carotenóide via cultivo submerso utilizando a polpa do umbu como fonte de carbono através da levedura *Roduthorula glutinis* apresentou aumento parcialmente associado ao crescimento da biomassa celular.

A maior produção de biomassa no meio com umbu foi observada na 72ª hora atingindo 2,243 g/L.

O Éter de Petróleo foi o solvente que mais conseguiu extrair o carotenóide quando comparados com os demais solventes.

A técnica de extração somente com solvente não foi capaz de extrair totalmente os carotenóides produzidos, sendo necessário ser melhorada com a ajuda de um ultrassom, atingindo assim máxima extração.

O umbu se mostrou uma forma viável à produção de carotenóides pela *Roduthorula glutinis* e assim este trabalho pôde contribuir para a valorização deste fruto agregando valor a cultura de um produto tão comum no semi-árido brasileiro.

7.5 REFERÊNCIAS

- Bradford, M. M. "Um ensaio de ligação do corante para a proteína."*Ana Biochem* 72 (1976): 248-54.
- Carvalho, Raimundo Wilson de, SOUZA, M., FREIRE, N., & de ALMEIDA, A. B. "Fauna de Flebotomos da Ilha do Araujo, Município de Paraty-RJ. 1-Diversidade e aspectos do comportamento." (1995).
- Germano, R. M. A. *Disponibilidade de ferro na presença do ββ-caroteno e o efeito dos interferentes em combinações de alimentos*. Diss. Universidade de São Paulo, 1991.
- Ferreira, J. C. "Efeito do congelamento ultra-rápido sobre as caracteristicas fisico-quimicas e sensoriais de polpa de umbu (*Spondias tuberosa Arruda Camara*) durante a armazenagem frigorificada." (2000).
- Garrett, D. A.; Failla, M. L.; Sarama, R. J. "Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals". *Journal of agricultural and food chemistry* 47.10 (1999).
- Kurtzman, C. P.; Robnett, C. J. "Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences."*Antonie van Leeuwenhoek*73.4 (1998): 331-371.
- Mahan, L. K.; Marucci, M. D. F. N.; Aldrighi, J. M "Vitaminas."*Alimentos, nutrição e dietoterapia. 8ª ed. São Paulo: Roca* (1995): 99-143.

- Maiani, G.; Periago Castón, M. J.; Catasta, G.; Toti, E.; Cambrodón, I. G.; Bysted, A.; Böhm, V. "Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans."*Molecular Nutrition & Food Research* 53. S2 (2008): S194-S218.
- Mattietto, R. A. "Estudo tecnologico de um nectar misto de caja (*Spondias Lutea L.*) e umbu (*Spondias tuberosa, Arruda Camara*)". (2005).
- Layrisse, M.; García-Casal, M. N.; Solano, L.; Baron, M. A.; Arguello, F.; Llovera, D.; Tropper, E. "The role of vitamin A on the inhibitors of nonheme iron absorption: preliminary results."*The Journal of Nutritional Biochemistry* 8.2 (1997): 61-67.
- Narain, J. D. N.; Galvão, M. D. S.; Madruga, M. S.; Brito, E. S. D. "Volatile compounds in passion fruit (Passiflora edulis forma Flavicarpa) and yellow mombin (*Spondias mombin L.*) fruits obtained by dynamic headspace technique."*Food Science and Technology (Campinas)* 24.2 (1991): 212-216.
- Perez. 10.ed. Produção de Astaxantinas; Washington: NAS, 1999. 286p.
- Rao, A. V.; Rao, L. G. "Carotenoids and human health." *Pharmacological research* 55.3 (2007): 207-216.
- Rodríguez A. D.; Farfán, J. A. "Estado actual de los métodos analíticos para determinar provitamina A."*Arch. latinoam. Nutr* 42.2 (1992): 180-91.
- Silva, M. C. "Alterações na biossíntese de carotenóides em leveduras induzidas por agentes químicos." (2004).
- Simpson, K. L.; Co O. C. "Metabolism and nutritional significance of carotenoids."*Annual review of nutrition* 1.1 (1981): 351-374.
- Ushikubo, F. Y. "Efeito do tratamento enzimático, da velocidade tangencial e da pressão transmembrana na microfiltração da polpa diluída de umbu (*Spondias tuberosa Arr. Cam.*)." (2006).
- Uenojo, M.; Marostica, M. R.; Pastore, G. M. "Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma."*Química Nova* 30.3 (2007): 616.