



MAYARA NUNES VITOR ANJOS

**PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA POR *Mucor circinelloides* UTILIZANDO
MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO SUBSTRATO ALTERNATIVO
SOB A INFLUÊNCIA DE LUZ AZUL**

**RECIFE
FEVEREIRO/2013**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

**PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA POR *Mucor circinelloides* UTILIZANDO
MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO SUBSTRATO ALTERNATIVO
SOB A INFLUÊNCIA DE LUZ AZUL**

MAYARA NUNES VITOR ANJOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Fungos de Interesse Industrial

Orientador: Norma Buarque de Gusmão

Co-orientador: Galba Maria de Campos Takaki

RECIFE

FEVEREIRO/2013

Anjos, Mayara Nunes Vitor

Produção de astaxatina por *Mucor circinelloides* utilizando melão de cana-de-açúcar como substrato alternativo sob a influência de luz azul/ Mayara Nunes Vitor Anjos– Recife: O Autor, 2013.

56 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Norma Buarque de Gusmão

Coorientador: Galba Maria de Campos Takaki

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Biologia de Fungos, 2013.

Inclui bibliografia

- 1. Cana-de-açúcar 2. Carotenóides 3. Biomassa I. Gusmão, Norma Buarque de (orientadora) II. Takaki, Galba Maria de Campos (coorientadora) III. Título**

633.61

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 152

**PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA POR *Mucor circinelloides* UTILIZANDO
MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO SUBSTRATO ALTERNATIVO
SOB A INFLUÊNCIA DE LUZ AZUL**

MAYARA NUNES VITOR ANJOS

Data da defesa: 28/02/2013

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Dra. Norma Buarque de Gusmão – (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Cledir Rodrigues Santos
Universidade do Minho

Dr. Nelson Manuel Viana da Silva Lima
Universidade do Minho

*“Não sei onde eu to indo, mas sei que eu to
no meu caminho.”*

Raul Seixas.

Agradecimentos

Aos meus pais, Adalberto Vitor e Severina Nunes pelo apoio incondicional e por ser a base dessa conquista. Sem eles, eu nada conseguiria; dedico-os todo o meu amor e gratidão eterna.

Aos meus familiares em especial, Vovó Das Dores, Mãe Luzinete e Tia Adeneide por sempre acreditarem que eu seria a cientista da família.

Ao meu esposo Fernando Roberto pela cumplicidade, pelo carinho e paciência, dando-me força para concluir essa caminhada e a Maísa que a cada dia cresce dentro de mim e torna-se minha fonte de inspiração.

As minhas amigas da escola e de toda vida: Auriely, Camila, Carina, Emilaine, Ingreti, Joseane, Lais, Leila e Tamiris, por estarem presente desde o princípio de tudo.

Aos meus amigos da faculdade: Mariana, Luiz, Rodolfo e Catarina, por todos os momentos de descontração, risos, lágrimas e especialmente por acreditarem no meu potencial e me fazerem me sentir especial.

Aos amigos do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais - NPCIAMB: Aline Alves por toda paciência e dedicação em me ensinar todos os passos dentro do laboratório, Marcela, Daniela, Nadiely, Rita, Rejane e em especial Priscilla Andrade por todos os momentos felizes dentro do laboratório, compartilhando dia-a-dia toda uma experiência ímpar, tornando-se uma irmã científica.

Aos amigos do mestrado: Camilla, Cyndy, Jadson, Jacilene, Patrícia, Iolanda, Vera, Juliana, Gleiceire, Alice, Vitor Xavier e Victor Rafael, obrigada por todos os momentos divididos, desde as aulas aos almoços mais divertidos regados a muita ciência.

Aos meus alunos, professores e funcionários do Educandário Santa Maria, que sempre me apoiaram e me ajudaram nos momentos em que precisei me ausentar, reconhecendo a importância e o significado desse trabalho.

A minha professora da Iniciação Científica e mãe científica: Kaoru Okada, por ter me dado a oportunidade durante a graduação, por todos os ensinamentos e por acreditar em meu potencial. Serei eternamente grata.

A minha orientadora Norma Gusmão por me acolher tão bem durante essa jornada, por todos os ensinamentos, atenção constante e dedicação mesmo com a distância existente.

A minha co-orientadora Galba Takaki por disponibilizar o Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais para a realização desse trabalho, por todos os ensinamentos e dedicação incondicional.

Aos técnicos do NPCIAMB: Sr. Humberto de Almeida e André Felipe pela ajuda durante toda minha permanência no laboratório.

Ao tradutor China, pela paciência ao traduzir e corrigir meus textos em inglês. Sua ajuda foi de grande importância para divulgação desse trabalho.

Ao CNPq pelo financiamento da minha bolsa de mestrado, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, ao NPCIAMB pelas instalações do laboratório e a Universidade Federal de Pernambuco.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram a concluir essa jornada.

RESUMO GERAL

Os carotenóides são substâncias naturais que podem ser sintetizados por plantas e microorganismos. Recentemente houve um aumento do interesse da produção de corantes naturais por processos biotecnológicos de fontes biológicas devido à preocupação com o uso de aditivos químicos nos alimentos. A astaxantina é um dos principais carotenóides amplamente utilizado na indústria e na aquicultura, além disso, possui um importante papel na diminuição do risco de várias doenças degenerativas devido ao seu alto poder antioxidante. Neste trabalho foi estudada a produção de astaxantina por *Mucor circinelloides* utilizando o meio definido Hesseltine e Anderson e o resíduo agroindustrial melão de cana-de-açúcar, nas concentrações de 4%, 7% e 10% na presença e ausência de LED's azul. O inóculo foi obtido a partir do *M. circinelloides* após 5 dias de crescimento no meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar), a 28°C, 96 horas, 120 rpm. Após a seleção da melhor concentração os frascos contendo melão de cana-de-açúcar foram incubados em shaker orbital sob diferentes temperaturas (25, 30 e 35°C), pH (6,0, 7,0 e 8,0) e agitação (120, 135 e 150 rpm) por 96h sob iluminação com LED'S de cor azul e no escuro, segundo um planejamento fatorial 2³ com quatro repetições no ponto central. Após o processo fermentativo, a astaxantina foi extraída da biomassa, utilizando uma solução de dimetilsulfóxido/acetona. Em seguida foi pré-purificada em éter de petróleo e analisada por espectrofotometria UV-visível (474 nm). A partir do ponto maximizado do planejamento fatorial foi realizada a determinação do peso seco, pH, proteínas totais, assim como teste de toxicidade e de atividade antioxidante da astaxantina obtida. A produção de astaxantina utilizando o meio Hesseltine e Anderson apresentou rendimento de 142,0 µg/g sem influência de LED's azul e 340,1 µg/g quando se utilizou LED's azul, com um aumento da produção de aproximadamente 42%. A melhor condição para a produção de astaxantina com melão de cana-de-açúcar deu-se na concentração de 4% na ausência (32,7 µg/g) e presença de LED's azul (134,4 µg/g) durante 96h, 120 rpm a 25°C. De acordo com o planejamento fatorial 2³ o ponto máximo de produção foi obtido a 30°C, pH 7,5 e 100 rpm com cerca de 469,0 µg/g na ausência de LED's azul e 667,6 µg/g na presença de LED's azul, aumentando em aproximadamente 89% a produção. A astaxantina obtida por *M. circinelloides* apresentou baixa toxicidade frente à *Artemia salina* na concentração de 25% e potencial de inibição dos radicais livres de cerca de 92% nos índices testados. O resíduo agroindustrial melão de cana-de-açúcar possui potencial para a produção de astaxantina por *M. circinelloides* principalmente na concentração de 4%. Os resultados apresentados demonstram que a utilização de LED'S azul pode aumentar significativamente o teor de astaxantina produzida pelo *M. circinelloides*.

Palavras-chave: Carotenóides, Astaxantina, *Mucor circinelloides*, Melão de cana-de-açúcar.

ABSTRACT

Carotenoids are natural substances that can be synthesized by plants and micro-organisms. Recently there has been increased interest in the production of natural colorants for biotechnological processes from biological sources due to the concern over the use of chemical additives in foods. Astaxanthin is a carotenoid major widely used in industry and aquaculture, in addition, has an important role in reducing the risk of various degenerative diseases due to its high antioxidant power. In this study the production of astaxanthin by *Mucor circinelloides* using Hesseltine and Anderson medium and agroindustrial sugar cane molasses, at concentrations of 4%, 7% and 10% in the presence and absence of blue LED's. The inoculum was obtained from *M. circinelloides* after 5 days of growth in PDA (Potato Dextrose Agar) at 28 ° C, 96 h, 120 rpm. After selecting the best concentration, vials containing sugar cane molasses, were incubated in orbital shaker at different temperatures (25, 30 and 35 ° C), pH (6.0, 7.0 and 8.0) and agitation (120 , 135 and 150 rpm) for 96 hours under illumination with blue LED's and in the dark, according to a 2³ factorial design with four replications at the center point. After the fermentation, the astaxanthin extracted from biomass, using a solution of dimethylsulfoxide / acetone. Then it was prepurified in petroleum ether and analyzed by UV-visible spectrophotometry (474 nm). From the point of maximized factorial design it became to be possible to determine the dry weight, pH, total index of protein, as well as test the toxicity and antioxidant activity of astaxanthin obtained. Production of astaxanthin using Hesseltine and Anderson medium had a yield of 142, 0 µg/g without influence of blue LED's 340, 1 µg/g when using blue LED's with an increased production of approximately 42%. The best condition for the production of astaxanthin with sugar cane molasses took place in a concentration of 4% in the absence (32, 7 µg/g) and presence of blue LED's (134, 4 µg/g) for 96h, 120 rpm at 25 ° C. According to the 2³ factorial design point maximum yield was obtained at 30 ° C, pH 7.5 and 100 rpm to about 469,0 µg/g in the absence of blue LED's and 667,6 µg/g in presence of blue LED's, increasing by approximately 89% production. Astaxanthin produced by *M. circinelloides* showed low toxicity against *Artemia salina* at a concentration of 25% and inhibition potential of free radicals from about 92% over the rates tested. The agroindustrial sugar cane molasses has potential for production of astaxanthin by *M. circinelloides* mainly on the concentration of 4%. The results show that using blue LED's can significantly increase the amount of astaxanthin produced by *M. Circinelloides*.

Key-words: Carotenoids, Astaxanthin, *Mucor circinelloides*, sugar cane molasses.

Lista de abreviaturas

CFR	Code of Federal Regulations
FDA	Food and Drug Administration
AST	Astaxantina
JECFA	Joint Expert Committee on Food Aditives
FAO	Food and Agriculture Organization
WHO	World Health Organization
LED's	Light Emitting Diode
DPPH	2,2-difenil-1- picril-hidrazil

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1 – Estrutura de carotenóides cíclicos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).....	17
Figura 2 – Estrutura de carotenóides acíclicos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).....	17
Figura 3 – Diagrama geral da biossíntese de carotenóides (MARGALITH, 1999).....	18
Figura 4 – Estrutura molecular da astaxantina. (FONTANA, 2000).....	20
Figura 5 – Esquema da biossíntese da AST, destacando as principais enzimas e seus produtos. Adaptado de BOSHALE; BERNSTEIN, 2005.....	21
Figura 6 – Esquema ilustrando a disposição espacial da astaxantina na bicamada lipídica (MANO, 2008).....	23
Figura 7 – Fluxograma do processamento de cana-de-açúcar para a produção de açúcar e álcool (SILVA, 2008).....	31
Figura 8 – Acompanhamento do pH durante a produção de astaxantina por <i>Mucor circinelloides</i>	40
Figura 9 – Diagrama de Pareto com o efeito estimado das variáveis testadas no planejamento fatorial 2^3 para a produção de astaxantina.....	41
Figura 10 – Superfície de resposta da variável astaxantina em função das variáveis independentes temperatura e pH.....	42
Figura 11 – Superfície de resposta da variável astaxantina em função das variáveis independentes temperatura e agitação.....	42
Figura 12 – (a) Cinética de crescimento do <i>Mucor circinelloides</i> (b) cinética de produção de astaxantina por <i>Mucor circinelloides</i> nas condições maximizadas do planejamento fatorial 2^3	43
Figura 13 – Determinação das proteínas totais durante a produção de astaxantina por <i>Mucor circinelloides</i>	45
Figura 14 – Determinação do potencial de inibição dos radicais livres da astaxantina obtida por <i>Mucor circinelloides</i>	46

Lista de tabelas

	Pág.
Tabela 1 – Micro-organismos produtores de carotenóides.....	25
Tabela 2 – Planejamento fatorial (2^3) utilizado para uma triagem de três fatores na produção de astaxantina por <i>Mucor circinelloides</i>	33
Tabela 3 – Matriz do planejamento fatorial (2^3) utilizado para uma triagem de três fatores na produção de astaxantina por <i>Mucor circinelloides</i> , para culturas iluminadas com LED'S azul com ausência de fonte luminosa.....	33
Tabela 4 – Resultados experimentais da produção de astaxantina por <i>Mucor circinelloides</i> utilizando meio Hesseltine e Anderson.....	36
Tabela 5 – Resultados experimentais da produção de astaxantina por <i>Mucor circinelloides</i> utilizando meio de melão de cana-de-açúcar em diferentes concentrações (4%, 7% e 10%)..	37
Tabela 6 – Resultados da produção de astaxantina de acordo com planejamento fatorial 2^3 com ausência de fonte luminosa.....	38
Tabela 7 – Resultados da produção de astaxantina de acordo com planejamento fatorial 2^3 sob a influência de luz azul.....	38
Tabela 8 – Resultados da determinação da toxicidade da astaxantina produzida por <i>Mucor circinelloides</i> utilizando meio de melão de cana-de-açúcar e Hesseltine e Anderson.....	46

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1 Carotenóides.....	15
2.1.1 Considerações gerais sobre a produção de carotenóides.....	15
2.1.2 Estrutura e biossíntese dos carotenóides.....	16
2.1.3 Propriedades e funções dos carotenóides.....	19
2.1.4 Astaxantina (AST).....	20
2.2.4.1 Atividade antioxidante da astaxantina.....	22
2.2 Micro-organismos produtores de carotenóides.....	23
2.3 Fatores que influenciam a bioprodução de carotenóides.....	25
2.3.1 Efeito da temperatura e pH na bioprodução de carotenóides.....	26
2.3.2 Efeito da taxa de aeração e agitação na bioprodução de carotenóides.....	27
2.3.3 Efeito da intensidade luminosa na bioprodução de carotenóides.....	28
2.3.4 Efeito da composição do meio de cultivo na bioprodução de carotenóides.....	29
2.3.4.1 Melaço de cana-de-açúcar.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1 Micro-organismo.....	32
3.2 Condições de Cultivo e de Produção de Astaxantina.....	32
3.3 Métodos analíticos.....	33
3.3.1 Determinação da concentração de biomassa.....	33
3.3.2 Determinação do pH.....	33
3.3.3 Determinação das proteínas totais.....	34
3.4. Extração e quantificação da astaxantina.....	34
3.5. Teste de toxicidade.....	34
3.6. Determinação da atividade antioxidante através do método de sequestro de radicais livres (DPPH).....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1 Produção de astaxantina utilizando meio Hesseltine e Anderson (1957).....	36
4.2 Screening da produção de astaxantina utilizando o meio melaço de cana-de-açúcar (4%, 7% e 10%).....	36
4.3 Produção de astaxantina utilizando melaço de cana-de-açúcar a 4% sob a influência de	

luz azul e com ausência de fonte luminosa.....	37
4.4 Influência das variáveis na produção de astaxantina utilizando melão de cana-de-açúcar a 4% sob influência de LED´s azul.....	39
4.5 Estudo cinético da produção de astaxantina utilizando melão de cana-de-açúcar a 4% sob LED´S azul e com ausência de fonte luminosa.....	43
4.6 Determinação da toxicidade da astaxantina produzida em melão de cana-de-açúcar a 4% e no meio Hesseltine e Anderson.....	45
4.7 Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH.....	46
5. CONCLUSÕES.....	48
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

1. INTRODUÇÃO

Os carotenóides são pigmentos naturais responsáveis pelas cores amarelas, laranja e vermelho, utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica, de cosméticos e ração (VALDUGA et al., 2009, AKSU; EREN, 2007). Também são encontrados em bactérias, leveduras e fungos filamentosos, protegendo tais organismos de danos gerados pela luz e oxigênio (NI et al., 2005). Além de colorir, os carotenóides possuem atividades biológicas importantes destacando-se a inibição de doenças onde os radicais livres apresentam papel fundamental, como arteriosclerose, catarata, degeneração macular, esclerose múltipla, câncer, doenças degenerativas e cardiovasculares (MALDONADE et al., 2007; NI et al., 2008).

A produção biotecnológica de carotenóides atualmente é uma área de intensa investigação devido à possibilidade da obtenção de compostos de origem natural em escala industrial (LIU; WU, 2007). Há algumas décadas as condições ambientais e os estimulantes da carotenogênese são utilizados, a fim de melhorar a produção de carotenóides e avaliar os micro-organismos produtores de pigmentos (microalgas, fungos, bactérias). A composição do meio de cultivo, tais como fonte de carbono e nitrogênio, presença de metais e sais, e agentes químicos, são fatores que necessitam de investigação para um aumento na produção. Além disso, as condições ambientais também merecem atenção como luminosidade, agitação, aeração e pH (LIU et al., 2006).

A astaxantina (3,3'-dihidroxi-4,4'-diceto- β -caroteno) é um carotenoide oxigenado, de coloração rosa alaranjado, amplamente distribuído na natureza. É um dos maiores pigmentos da família dos carotenóides usado para prover a coloração característica em alguns pássaros, crustáceos (camarão e lagosta), peixes (truta e salmão), pássaros (flamingo), algas, leveduras, e fungos filamentosos (NI et al., 2008). Nos últimos anos houve um aumento no interesse na produção de astaxantina, principalmente por via biotecnológica, através de micro-organismos como algumas microalgas e fungos, visto que possui alto valor no mercado e um aumento na demanda de produção (FONSECA et al., 2011). A acumulação de astaxantina pelos micro-organismos pode ser induzida sob condições de estresse, como deficiência de nutrientes, alta intensidade de luz, suplementação com luz azul e a adição de suplementos oxidativos no meio (LABABPOUR et al., 2004).

Estudos sugerem que a astaxantina pode ser aproximadamente 1000 vezes mais eficiente como antioxidante do que a vitamina E, e possui uma capacidade de 100-500 vezes maior em combater radicais livres quando comparada com o α - tocoferol (LIM et al., 2002). Além disso, atua

como inibidora da atividade do oxigênio livre, pelo menos 10 vezes mais que o β -caroteno (NAGUIB, 2000).

Entre os grupos de fungos produtores de carotenos, atenção especial tem sido dada ao subfilo Mucoromycotina (HIBBET et al., 2007). Os carotenóides são metabólitos secundários acumulados durante o crescimento micelial em culturas típicas de *Mucor circinelloides* (TIEGH., 1875). Pesquisas realizadas com mutantes de *Mucor circinelloides* constataram que o aparecimento de carotenóides ocorre na fase estacionária e com uma produção máxima depois de 3 dias em culturas típicas de *Mucor circinelloides*, mas em 4 dias em espécies deficientes em carotenóides (FRASER et al., 1996). De acordo com Papp et al., (2006) o *Mucor circinelloides* apresenta características morfológicas importantes aplicadas a estudos sobre a produção de carotenóides.

O Brasil é conhecido por seu grande potencial de produção de recursos renováveis tais como produtos agrícolas, florestais e resíduos agroindustriais. Contudo, esses produtos podem apresentar elevados problemas ambientais por serem considerados potenciais poluentes. Nos últimos anos diversos subprodutos e matérias-primas da indústria de alimentos e/ou da agroindústria têm sido empregados para a produção de proteínas isoladas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e metabólitos secundários biologicamente importantes, devido ao apelo ecológico, alta disponibilidade e baixo custo. Dentre estes, destacam-se o melão de cana-de-açúcar a qual tem sido comumente direcionado para produção de ração animal ou simplesmente depositado no solo. Além disso, pode ser utilizado como fonte de extração de outros componentes com alto valor agregado ou como meio de cultivo nos processos fermentativos, em virtude do alto teor de açúcares, nitrogênio, vitaminas, zinco, manganês e cobre (CAZETTA et al., 2005).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi investigar a produção de astaxantina sob a influência de luz azul e com ausência de fonte luminosa a partir de *Mucor circinelloides* utilizando meio definido Hesseltine e Anderson e o melão de cana-de-açúcar como substrato alternativo. Assim, foram analisadas as condições da cultura, tais como: temperatura, pH e agitação, visando à maximização da produção de astaxantina com o meio de melão de cana-de-açúcar, obtenção de parâmetros cinéticos de crescimento e de produção, além da avaliação da toxicidade e atividade antioxidante da astaxantina obtida.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Carotenóides

2.1.1 Considerações gerais sobre a produção de carotenóides

Existe atualmente nas indústrias de alimentos uma forte tendência pela substituição de corantes e aditivos sintéticos por produtos naturais, por serem estes considerados seguros e menos susceptíveis a efeitos adversos. Diferente dos corantes naturais, seus sucedâneos sintéticos possibilitam fácil padronização associado ainda a uma maior disponibilidade. Entretanto, a utilização de corantes artificiais nos alimentos tem sido questionada, especialmente pelo uso de compostos derivados de petróleo. Na década de 70 pesquisas constataram que muitos dos corantes sintéticos empregados na indústria apresentavam-se como potenciais causadores de doenças degenerativas como câncer (SANDI et al., 2003).

No entanto, devido à preocupação com o uso de aditivos químicos em alimentos, houve um crescente interesse nos carotenóides obtidos naturalmente por processos biotecnológicos. Segundo Silva (2004), a produção biotecnológica de carotenóides vem se destacando devido a fatores tais como: possibilidade de utilização de substratos de baixo custo para a bioprodução; denominação de substâncias naturais, pequeno espaço para produção, não estando sujeita às condições ambientais como clima, estação do ano ou composição do solo, e controle das condições de cultivo.

Destacam-se ainda os esforços para tornar os corantes solúveis em água. Isso é possível com o encapsulamento dos corantes em bases de amido, gomas e gelatinas, tornando-os uma emulsão. Isso amplia o uso para outros produtos, tendo em vista que a maior parte deles, sobretudo os carotenóides e antraquinonas, são apenas lipossolúveis (MEINICKE, 2008).

Em 2002, foi descrito que apenas oito dos aproximadamente 700 carotenóides de ocorrência natural podiam ser produzidos sinteticamente ou em escala industrial, como, β -caroteno, (3R-3'R)-zeaxantina, cantaxantina e astaxantina (ERNST, 2002). Os pigmentos carotenóides são utilizados comercialmente como corantes em alimentos, suplementos de ração animal, cosméticos e com propósitos farmacêuticos (VERDOES et al., 2003).

Somente os aditivos de cor que estão registrados no *Code of Federal Regulations* (CFR) podem ser usados legalmente nos Estados Unidos para promover a coloração do salmão e outros

animais utilizados como alimento. A astaxantina foi recentemente relacionada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) como um aditivo para pigmentar somente a carne de salmonídeos e o limite permitido foi de 8 mg de pigmento por quilograma de alimento para peixe. A cantaxantina está registrada no CFR como um aditivo de cor, mas ainda não foi aprovada pelo FDA (VALDUGA et al, 2009).

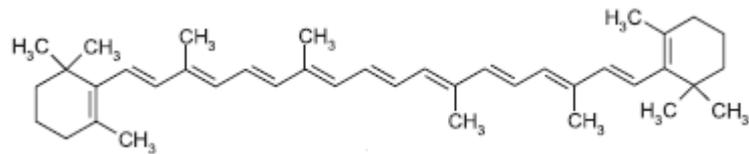
De acordo com os estudos de mercado publicados em 2008 pela Business Communications Company, em 2010 o comércio global de carotenóides chegou a 1,2 bilhões de dólares e espera-se que marca de 1,4 bilhões de dólares em 2018, com taxa de crescimento anual de 2,3%. Atualmente, o carotenóide de maior consumo é o β -caroteno, com 32% do mercado, e na segunda posição está a astaxantina, com 28%. Estima-se que os valores comercializados para a astaxantina atinjam 253 milhões de dólares em 2015, o que representa um crescimento de 1,8% ao ano. O preço de mercado, por grama, é em torno de R\$ 57 para o β -caroteno, e R\$ 633 para a astaxantina, já um miligrama de zeastaxantina chega a custar R\$ 1690 (BCC, 2011).

2.1.2 Estrutura e biossíntese dos carotenóides

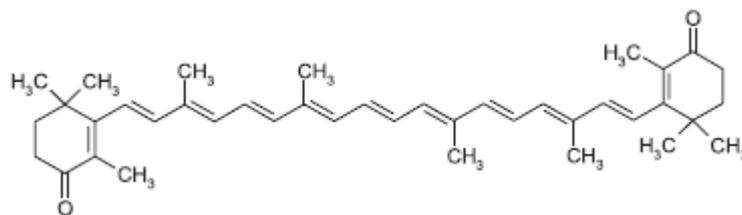
Os carotenóides são compostos isoprenóides ($C_{40}H_{56}$), constituídos por oito C_5 -isoprenos unidos, possuindo um esqueleto central com 22 átomos de carbono e 2 caudas com 9 carbonos cada uma, resultando numa molécula que contém em sua estrutura um hidrocarboneto com ligações duplas conjugadas, as quais são responsáveis por muitas de suas propriedades e ações (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 2004). O sistema de duplas ligações conjugadas serve como cromóforo, ou seja, confere a habilidade de absorver luz na região do visível. São necessárias, aproximadamente, sete ligações duplas conjugadas para que o carotenóide apresente coloração. Esse sistema também confere a estes pigmentos alta reatividade química, podendo ser facilmente isomerizados e oxidados durante a exposição ao ácido, calor ou luz, especialmente quando armazenados na presença de oxigênio (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 2004; DAMODARAN et al., 2010).

Dependendo da presença ou não de anéis em suas moléculas, eles podem ser classificados como carotenoides cíclicos (Figura 1) ou acíclicos (Figura 2), como também podem ser divididos em carotenos (contém apenas carbono e hidrogênio) e xantofilas (apresentam também o oxigênio em sua estrutura, como epóxi, hidroxila, carbonila, e outros grupos carboxílicos). Quando em suas fontes naturais, podem estar livres ou associados a outros compostos, como ácidos graxos, açúcares e proteínas (DAMODARAN et al., 2010).

Em sua maioria são encontrados na configuração *trans*, devido a sua alta estabilidade, comparada à forma *cis* (NUNES; MERCADANTE., 2007). Estes compostos são insolúveis em água e moderadamente solúveis em óleo a temperatura ambiente. O aumento da temperatura do óleo aumenta a sua solubilidade (DELGADO –VARGAS et al., 2000).

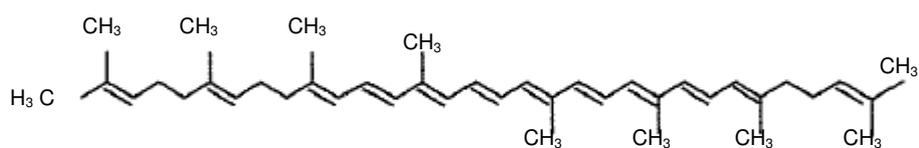


β -Caroteno

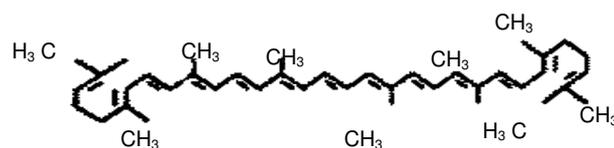


Cantaxantina

Figura 1 – Estrutura de carotenóides cíclicos
(RODRIGUEZ-AMAYA, 2001)



Neurosporeno



Licopeno

Figura 2 – Estrutura de carotenóides acíclicos
(RODRIGUEZ-AMAYA, 2001)

Os carotenóides são sintetizados somente pelas plantas e micro-organismos e sua biossíntese em plantas tem sido estudada há mais de 50 anos. A primeira etapa da biossíntese do carotenóide envolve a formação de geranyl-geranyl pirofosfato e na sua conversão em fitoeno (7,8,11,12,7',8',11',12'-octahidro – ψ , ψ -caroteno), através da ação da enzima fitoeno sintetase. Esse primeiro caroteno não apresenta coloração, contudo, através de uma série de desidrogenações, outros carotenos são formados (ZEB; MEHMOOD, 2004). A figura 3 apresenta um diagrama representativo da biossíntese geral dos carotenóides.

A biossíntese até fitoeno, pode ser dividida em três etapas: a) a formação de isopentenil pirofosfato (IPP), b) conversão de IPP para geranyl pirofosfato (GGPP), e c) a condensação de duas moléculas de GGPP para formar fitoeno, o qual é o precursor da maioria dos carotenóides (BRAMLEY, 1992).

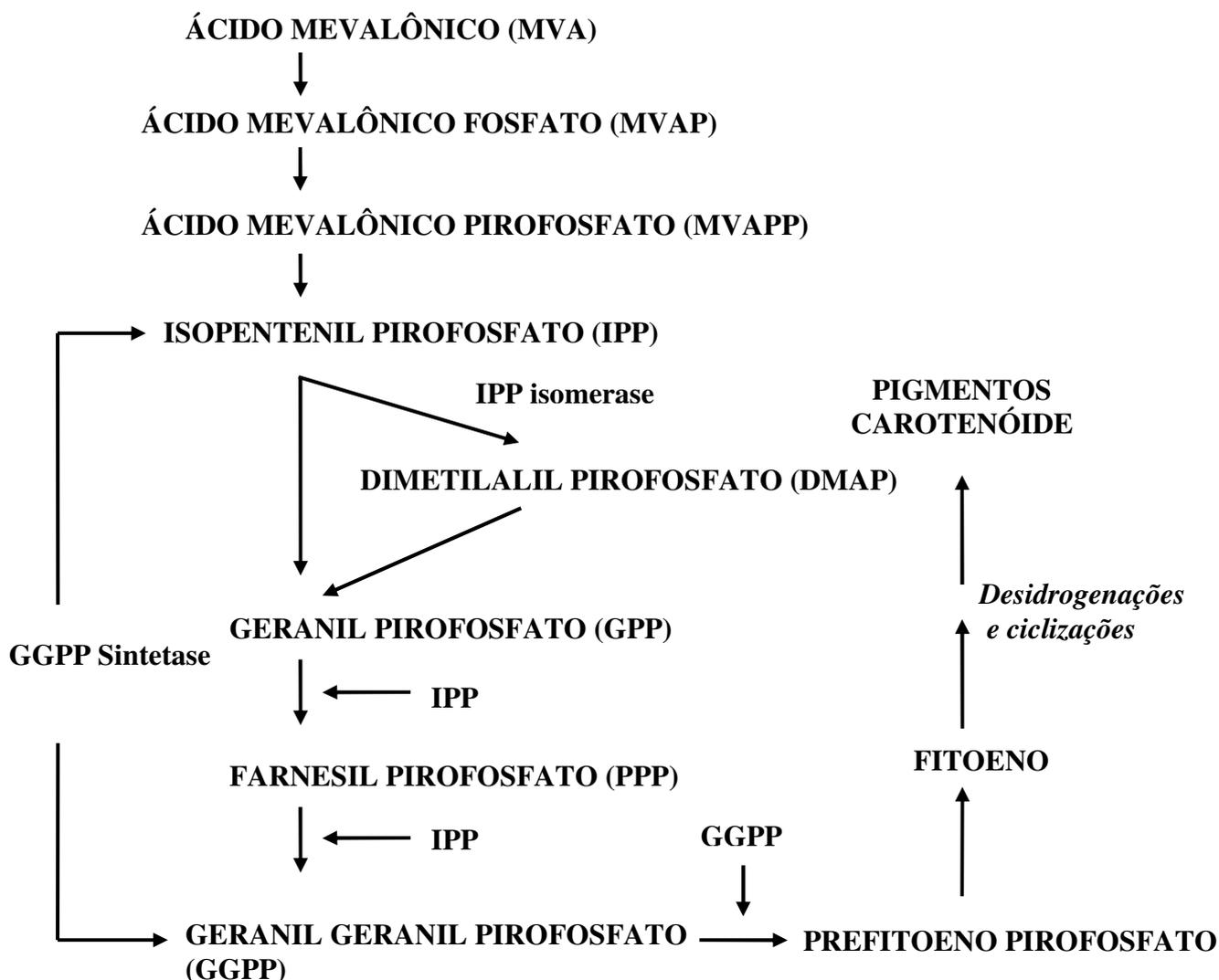


Figura 3 – Diagrama geral da biossíntese de carotenóides (MARGALITH, 1999)

2.1.3 Propriedades e funções dos carotenoides

Os carotenóides são pigmentos naturais responsáveis pelas cores amarelas, laranja e vermelho, utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica, de cosméticos e ração (VALDUGA et al., 2009, AKSU; EREN, 2007). Estes pigmentos são largamente utilizados como corantes para recuperar a cor perdida durante o processamento e armazenamento dos alimentos, bem como padronizar as cores de alguns produtos. Quando dispersíveis em água podem ser empregados em refrigerantes, sorvetes, sobremesas, sopas, produtos cárneos, bem como na alimentação natural (PRIAMO et al., 2010).

Também são encontrados em bactérias não fotossintetizantes, leveduras e fungos filamentosos, protegendo tais organismos de danos gerados pela luz e oxigênio (NI et al., 2005). São pigmentos altamente coloridos, insaturados e lipofílicos, apresentando uma variedade de cores desde o amarelo até o vermelho. Os carotenoides são responsáveis pela coloração apresentada por muitos insetos, pássaros, peixes e crustáceos. Por exemplo, são responsáveis pelas cores do salmão, da truta e do peixe dourado, pela plumagem rosa dos flamingos e, pela mudança de cor da lagosta, quando submetida ao aquecimento, em função da liberação de um carotenoide, astaxantina, que está inicialmente associado a uma proteína (CARDOSO, 1996).

Os efeitos benéficos desses compostos são largamente conhecidos e inclui reforço da resposta imunológica, possível papel na prevenção de doenças como arteriosclerose, câncer de pele e de próstata e doenças cardiovasculares, regulação do sistema digestivo, do crescimento e da concentração de açúcar no sangue e dos níveis de colesterol. Tais substâncias estão ainda associadas ao reforço da proteção da pele aos danos dos raios ultravioleta, possuem ação antioxidante (devido às suas múltiplas ações duplas conjugadas) e atividade pró-vitáminica A (FRASER; BRAMLEY, 2004).

A função biológica mais pesquisada e conhecida em seu papel nutricional é o de atividade precursora de vitamina A, que possui muitas funções aos sistemas vitais e é fornecida através da dieta como pró-vitamina A, proveniente de alimentos de origem animal (fígado, ovos, peixes, leites e carnes) ou como carotenóides que podem ser biologicamente transformados em vitamina A, como o β -caroteno, β -criptoxantina, criptoxantina, luteína, astaxantina (em alguns peixes), zeaxantina, geralmente provenientes de alimentos vegetais. Estima-se que 60% da vitamina A da dieta provenha da pró-vitamina A (MOREN et al., 2002; ANDRADE, 2003). A deficiência desta vitamina é a maior causa de mortes pré-maturas em nações em desenvolvimento, particularmente entre crianças (BRITTON, 1992)

2.1.4 Astaxantina (AST)

A astaxantina (3, 3' - diidroxib- β , β -caroteno-4, 4' diona) é um oxicarotenóide com fórmula molecular $C_{40}H_{52}O_4$ e peso molecular de 596,86 mol. Na forma cristalina e pura, aparece como um pó fino de coloração escura violeta amarronzada. Seu ponto de fusão é de aproximadamente 497.15 K. É insolúvel em solução aquosa, podendo ser dissolvida à temperatura ambiente em diclorometano, clorofórmio, acetona, dimetilsulfóxido e outros solventes não polares. Seu espectro de absorção representa um polieno conjugado, com $\lambda_{\text{máx}}$ de 489 nm em clorofórmio, 478 nm em etanol e 480 nm em acetona (JOHNSON; AN, 1991). Além disso, dessas características a astaxantina apresenta alto valor para o mercado farmacêutico e indústrias alimentícias (GUERIN et al., 2003). Pode ser produzida comercialmente por síntese química, fermentação ou isolada em pequenas quantidades providas de fontes naturais (LEE; SCHMIDT-DANNERT, 2002).

Apesar de ser encontrada em diversos animais, principalmente marinhos, a astaxantina não é sintetizada por estes seres e deve, portanto, ser adquirida através da dieta. (GUERIN et al, 2003). Atualmente, a astaxantina é comercializada como suplemento alimentar, principalmente na aquicultura de salmão (*Salmo salar*) e crustáceos (camarões e lagostas). A AST pode ser adquirida comercialmente na forma de extrato da alga verde unicelular *Haematococcus pluvialis* (YUAN; CHEN, 2000).

A astaxantina possui dois carbonos assimétricos nas posições 3 e 3', e pode existir em quatro configurações, incluindo os enantiômeros 3S,3'S e 3R,3'R e formas meso 3R3'S e 3'R,3S. Todas essas configurações podem ser encontradas em fontes naturais de astaxantina, dentro de uma mesma espécie ou em espécies diferentes (JOHNSON; AN, 1991). A Figura 4 apresenta a estrutura da molécula de astaxantina.

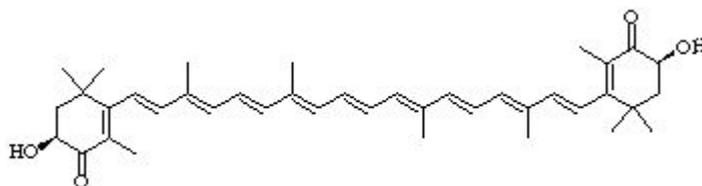


Figura 4 – Estrutura molecular da astaxantina (FONTANA, 2000)

A biossíntese da AST, iniciada pelo isopentenil pirofosfato, estende-se a partir da formação do β -caroteno. Após a geração deste, devido à ação das enzimas β -caroteno hidroxilase e β -caroteno oxigenase, os grupos hidroxila e carboxila são adicionados aos anéis do carotenóide (Figura 5) (EONSEON; LEE; POLLE, 2006).

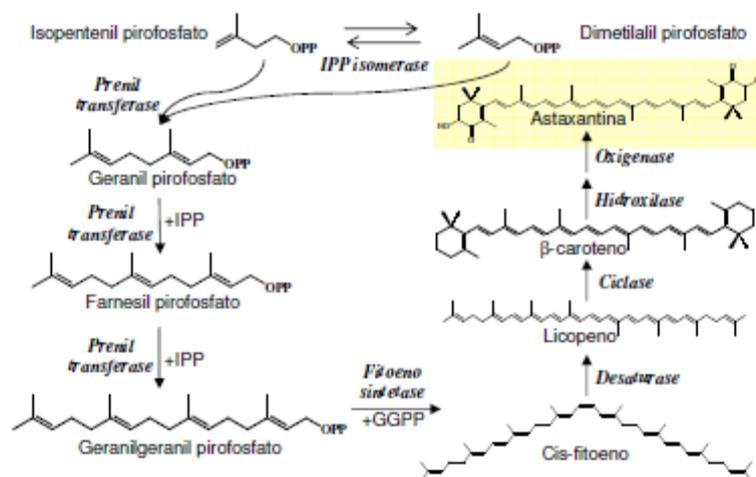


Figura 5 – Esquema da biossíntese da AST, destacando as principais enzimas e seus produtos (MANO, 2008)

Dentre as propriedades benéficas da astaxantina destaca-se a ação curativa para muitos problemas de saúde e ainda proteção contra radicais livres, peroxidação lipídica, danos oxidativos ao colesterol LDL, oxidação de ácidos graxos poli-insaturados essenciais e proteção contra os efeitos da luz UV, membranas celulares e tecidos (HU et al., 2006).

Como os demais carotenóides, a AST pode prover fotoproteção às membranas onde se encontra associada ao captar o excesso de radiação, dissipá-la na forma de calor e, assim, evitar danos peroxidativos a biomoléculas (DNA, açúcares, proteínas, lipídios) (MIKI, 1991). Do mesmo modo, em organismos fotossintetizantes, carotenóides apresentam a importante função de captar radiação luminosa e transferir essa energia para clorofila, participando assim da fase clara da fotossíntese (CUNNINGHAM; GANTT, 1998). Apesar de poder participar da fotossíntese, a AST é um carotenóide secundário, ou seja, não é essencial para a realização do processo fotossintético, diferentemente, por exemplo, do β -caroteno. Além disso, a AST também é um importante pigmento para coloração de algumas plantas e algas (CUNNINGHAM; GANTT, 1998).

O valor de mercado da astaxantina sintética rende cerca US \$ 200 milhões por ano, e os maiores produtores são DSM na Holanda, a BASF na França e a NHU na China. O estimado custo de produção é cerca de US \$ 1000/kg, e o preço de mercado está acima \$ 2000/kg. Embora a síntese química proporcione uma fonte estável de astaxantina em grandes quantidades, existem ainda preocupações sobre as suas funções biológicas e segurança alimentar (MILLEDGE, 2010).

É possível encontrar no mercado a astaxantina para consumo humano em formas de cápsulas ou tabletes, em concentrações que variam de 1 mg a 4 mg, as quais indicam serem capazes de conferir atividade antioxidante e aumentar a imunidade, energia, força cardiovascular e a proteção natural da pele. Os preços variam de 10 a 30 dólares para embalagens contendo 60 unidades, de acordo com a marca e concentração (CALIBEX, 2008).

2.1.4.1 Atividade antioxidante da astaxantina

Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais (PIETTA, 2000). Eles podem ser sintéticos ou naturais e, para serem utilizados em alimentos, devem ser seguros para a saúde. Alguns dos antioxidantes sintéticos mais importantes são hidroxianisol de butila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BHT) e entre os naturais destacam-se ácido ascórbico, vitamina E e β -caroteno (RICE-EVANS et al., 1996). Estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade de esses antioxidantes apresentarem efeito tóxico, e o Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) da Food and Agriculture Organization (FAO) e World Health Organization (WHO) têm alterado nos últimos anos a ingestão diária aceitável (IDA) destas substâncias como resultado de algumas pesquisas científicas (SOARES, 2002).

Tendo em vista os indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm sido dirigidas no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associação entre eles, com o intuito de diminuir sua quantidade nos alimentos (CABRAL, 2012).

A astaxantina tem sido reportada como um eficiente interceptador de radicais peroxila (ROO^{\cdot}) e alcoxila (RO^{\cdot}), intermediários regulares do processo de lipoperoxidação de membranas naturais ou sistemas biomiméticos lipídicos (lipossomos, micelas, etc.) (BARROS et al., 2000). Tal propriedade da astaxantina é 10 vezes maior que a do β -caroteno e até 500 vezes maior que a da vitamina E. Entretanto, em função de ser uma molécula altamente saturada, a astaxantina pode ser facilmente degradada pela luz e calor, o que pode causar a perda das propriedades biológicas (CHEN et al., 2007).

A astaxantina apresenta propriedades antioxidantes, as quais são devidas a sua estrutura especial, com 11 duplas ligações carbono-carbono conjugadas. Nos anéis β da astaxantina, estão dispostos dois grupamentos hidroxilas (posições 3 e 3') e dois grupamentos carbonila (posições 4 e 4'), que lhe conferem características mais hidrofílicas se comparada com outros carotenóides

típicos. Em termos de disposição espacial em membranas, a astaxantina se distribui de uma forma quase perpendicular em relação à superfície da membrana (Figura 6), com as duas extremidades em contato com a água. A astaxantina pode interceptar diretamente ERO/ERNs, através de reações de transferência de elétrons ou de hidrogênio em duplas ligações (SHIBATA et al., 2001). Estes ERO(s) são gerados no percurso normal do metabolismo do oxigênio, mas podem ser intensificados após a exposição à xenobióticos (ex.: pesticidas). Como efetores maléficos clivam o DNA, peroxidam lipídios insaturados, alteram a atividade enzimática e despolimerizam alguns polissacarídeos. O efeito provocado é o envelhecimento e conseqüentemente, a morte celular (FONTANA et al., 2000).

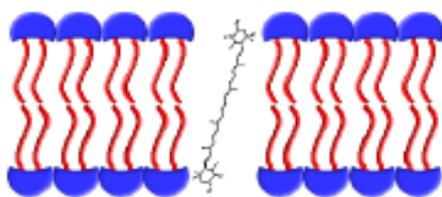


Figura 6 – Esquema ilustrando a disposição espacial da astaxantina na bicamada lipídica (MANO, 2008)

2.2 Micro-organismos produtores de carotenóides

Os carotenóides podem ser biossintetizados por micro-organismos fotossintetizantes como, por exemplo, algas e cianobactérias (azuis e verdes), e por micro-organismos não fotossintetizantes, como bactérias, fungos filamentosos e leveduras (JOHNSON; SCHOROEDER, 1995).

Micro-organismos e microalgas produtores de pigmentos são comuns na natureza. Entre as moléculas produzidas estão carotenóides, melaninas, flavinas, quinonas e mais especificamente monascinas, violaceínas, ficocianinas ou índigo. Entretanto, existe um longo caminho dos laboratórios até os mercados uma vez que somente cinco são produzidos em escala industrial. O mais antigo é o *angkak* ou koji vermelho, arroz transformado pelo fungo *Monascus*, usado na Ásia por séculos como colorante de alimentos para vinho de arroz vermelho, queijo de soja vermelho, produtos de carne e de peixes. A primeira história de sucesso na Europa na produção de pigmentos por micro-organismos foi a utilização do fungo *Blakeslea* para a produção de β -caroteno. O diretório geral para saúde e proteção dos consumidores da União Europeia considera que o β -caroteno produzido por essa via é equivalente ao material sintetizado quimicamente e é aceitável

para uso como agente colorante em alimentos. Entre as microalgas, existem duas histórias bem sucedidas para a produção eficiente de carotenóides, o β -caroteno usando *Dunaliella* e a astaxantina usando *Haematococcus* (DUFOSSE et al., 2005).

A descoberta da *Phaffia* em meados da década de 60 e a elucidação das estruturas químicas dos pigmentos fez com que o interesse em produzir carotenóides por leveduras aumentasse. As principais leveduras estudadas para a produção de carotenóides são *Xanthophyllomyces dendrorhous* e *Rhodotorula* sp., que se destacam pela alta concentração de astaxantina e toruleno, respectivamente. Recentemente, devido às modernas técnicas de biologia molecular, *Phaffia rhodozyma* foi reclassificada e renomeada como *Xanthophyllomyces dendrorhous* (MALDONADE, 2003).

Entre os grupos de fungos produtores de carotenos, atenção especial tem sido dada ao subfilo Mucoromycotina, representados por um grupo de seres sapróbios que utilizam matéria vegetal ou animal como substrato. (HIBBET et al., 2007). Na tabela 1, estão descritos alguns carotenóides produzidos por fungos.

Os *Mucorales* têm sido exaustivamente explorados em processos biotecnológicos em função de seu rápido crescimento, reunindo organismos que despertam grandes interesses em virtude de sua importância na indústria e na horticultura (PELCZAR, 1996).

Técnicas clássicas são bem estabelecidas em *Blakeslea trispora* e *Phycomyces blakesleeanus*, no entanto, é difícil aplicar técnicas moleculares para esses fungos, por causa da falta de um sistema de transformação eficiente e habilidade de expressar genes exógenos, tornam o *Mucor circinelloides* mais receptivo para técnicas moleculares em comparação com outros Zygomycetes tradicionalmente utilizados (FRASER et al., 1996)

Tabela 1 – Micro-organismos produtores de carotenóides

Espécies	Carotenóides principais	Autores
Cianobactérias		
<i>Anabaena variabilis</i>	Cantaxantina	Johnson; Schroeder (1995)
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	Cantaxantina	Johnson; Schroeder (1995)
<i>Nostoc commune</i>	Cantaxantina	Johnson; Schroeder (1995)
Algas verdes		
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Luteína	Johnson; Schroeder (1995)
<i>Dictyococcus cinnabarinus</i>	Cantaxantina	Johnson; Schroeder (1995)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxantina	Johnson; Schroeder (1995)
<i>Spongiococcum excetricum</i>	Luteína	Johnson; Schroeder (1995)
<i>Dunaliella salina</i>	β -caroteno	Aguilar <i>et al.</i> , (2004)
Fungos filamentosos e leveduras		
<i>Blakeslea trispora</i>	β -caroteno e licopeno	Johnson; Schroeder (1995)
<i>Dacrymyces deliquescens</i>	Luteína	Johnson; Schroeder (1995)
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxantina e β -caroteno	Liu <i>et al.</i> , (2006)
<i>Rhodotorula graminis.</i>	Toruleno	Buzzini <i>et al.</i> , (2005)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Toruleno, torularrodina e β -caroteno	Bhosale; Grade (2001)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Toruleno, torularrodina e β -caroteno	Buzzini; Martini (1999)
<i>Sporobolomyces roseus</i>	Torularrodina, β -caroteno, toruleno	Davoli <i>et al.</i> , (2004)
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Astaxantina	Hu <i>et al.</i> , (2006)
Bactérias		
<i>Mycobacterium revicaie</i>	Cantaxantina	Johnson; Schroeder (1995)
<i>Mycobacterium lacticola</i>	Cantaxantina	Johnson; Schroeder (1995)
<i>Rhodococcus maris</i>	Astaxantina	Johnson; Schroeder (1995)
<i>Streptomyces chrestomyceticus</i>	Cantaxantina	Johnson; Schroeder (1995)
	Xantofilas	

2.3 Fatores que influenciam a bioprodução de carotenóides

A possibilidade da produção de corantes naturais em escala industrial e o elevado valor dos produtos tornam a produção biotecnológica de carotenóides uma área de intenso estudo. A produtividade de um bioprocessamento em um dado sistema depende das condições nutricionais e físicas da cultura, afetando não somente o crescimento celular como a produção de pigmento (LIU; WU, 2007). Sendo assim, os micro-organismos acumulam vários tipos de carotenóides como resposta ao estresse das condições ambientais, como deficiência de nutrientes, alta intensidade de luz, suplementação com luz azul e a adição de suplementos oxidativos no meio (LABABPOUR *et al.*, 2004).

Melhorar a eficiência da biossíntese de carotenoides pode aumentar a produção. Juntamente com as condições de cultivo, a biossíntese de carotenoides é conduzida pelo nível e atividade das enzimas biossintéticas e o fluxo total de carbono do sistema sintetizante. Assim, uma alta produção pode ser alcançada alterando-se o nível e a atividade destas enzimas ou a via biossintética, pela utilização de uma abordagem molecular (BHOSALE, 2004).

2.3.1 Efeito da temperatura e pH na bioprodução de carotenóides

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes que influenciam o crescimento e o desenvolvimento dos micro-organismos, causando alterações em muitas vias biossintéticas, inclusive na carotenogênese. Segundo Hayman et al., (1974) a temperatura exerce controle na concentração de enzimas envolvidas na produção de carotenoides e mudanças na concentração enzimática, definitivamente controla o nível de carotenoides nos micro-organismos.

O efeito de três níveis de temperatura sobre o crescimento e a produtividade de carotenoides na levedura *Rhodotorula mucilaginosa* foi avaliado por Aksu; Eren (2005). Com a elevação da temperatura de 25 para 30°C, verificaram um aumento nas taxas de formação de carotenoides e crescimento específico, sendo que estas diminuíram bruscamente acima de 30 °C. Tal comportamento é devido à desnaturação do sistema enzimático do microrganismo exposto à alta temperatura. Assim, para *Rhodotorula mucilaginosa* a temperatura ótima de cultivo foi de 30 °C com uma produção de 69,8 mg/L de carotenoides e 5,1 g/L de biomassa, respectivamente.

Ramírez et al., (2001), testando diferentes temperaturas, observaram que para as cepas selvagens e mutante de *Phaffia rhodozyma* as temperaturas ótimas foram de 22 e 19,7 °C, respectivamente.

O pH também é um dos parâmetros ambientais mais importantes que exercem influência no crescimento celular e formação de produto. Desta forma, o pH inicial é objeto de estudo na produção de carotenoides. Para a levedura *Sporobolomyces ruberrimus*, o pH inicial apresentou um intenso efeito sobre o conteúdo de carotenoides e biomassa. O conteúdo mínimo de carotenoides e células foi observado com cultivo a pH 3,5 (biomassa: 6,8 g/L; carotenoides específicos: 2,0 mg/g). A carotenogênese e o crescimento foram induzidos pela elevação do pH de 3,5 a 6,0, sendo pH 6,0 ótimo para o crescimento celular (11,3 g/L) e formação de pigmento (38,7 mg/L) (Razavi et al., 2006).

Aksu; Eren (2005) verificaram que o pH do meio de cultivo não influenciou somente a atividade biossintética da levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, mas também na taxa de crescimento da cultura. Com a elevação do pH de 3,0 para 7,0 observaram um aumento nas taxas de crescimento e produção de carotenoides, com decréscimo em pH superior. Em outro caso, a levedura *Rhodotorula glutinis*, estudada apresentou um pH ótimo para o crescimento de 5,91, confirmando a preferência geral das leveduras por pH levemente ácido.

Shih; Hang (1996) observaram que em pH baixos, na faixa de 3,4 a 4,5, ocorreu inibição do crescimento celular e da produção de carotenoides por *Rhodotorula rubra*, sendo que a máxima concentração celular (131 µg/L) e produção (1041 µg/L de β-caroteno) foram obtidas em pH inicial de 5,0.

2.3.2 Efeito da taxa de aeração e agitação na bioprodução de carotenóides

Liu et al., (2006) estudaram os efeitos da transferência de oxigênio em frascos agitados em *Phaffia rhodozyma*. Os autores observaram que com 30h de bioprodução a concentração de oxigênio dissolvido na fase líquida era próxima de zero (3,5%), enquanto que na fase gasosa, a concentração de oxigênio diminuiu lentamente nas primeiras 30 h (10%) e permaneceu em altas concentrações. Devido ao comportamento observado em ambas as fases definiram que esta era a etapa limitante do transporte de oxigênio. No mesmo trabalho foi evidenciado que o aumento da agitação (200 a 250 rpm) e a diminuição do volume de líquido (50 a 20 mL) ocasionaram elevações no crescimento celular (8 a 10,7 g/L) e produção de carotenoides (7,4 a 15,5 mg/L), sendo que a mudança na velocidade de agitação apresentou maior efeito no rendimento de carotenoides nos maiores volumes de líquido. O coeficiente de transferência de oxigênio diminuiu com a redução do volume de líquido e aumentou com a velocidade de agitação.

Na avaliação da influência da aeração sobre o conteúdo de carotenoides das leveduras *Sporobolomyces roseus* e *Rhodotorula glutinis*, observou-se que para *Rhodotorula glutinis* a maior taxa de aeração (frascos com entalhes) permite obter maior concentração de carotenoides, um aumento de 113 para 206 µg/g, embora o perfil de carotenoides permaneça inalterado. No entanto para *Sporobolomyces roseus*, o aumento na aeração proporcionou o incremento na concentração de carotenoides de 109 para 412 µg/g, porém ocorreu mudança no conteúdo dos carotenoides específicos, indicando uma mudança biossintética (DAVOLI et al., 2004).

Tinoi et al., (2005), em frascos agitados, verificaram que em taxas de agitação baixas (100 a 150 rpm) tem-se menor crescimento celular, devido à diminuição da disponibilidade de nutrientes

na superfície das células. Ao contrário, em altas taxas de agitação (>250 rpm) ocorreu ruptura celular evidenciada pelo aparecimento de uma fina camada oleosa.

Valduga et al., (2009) realizaram um *screening* de variáveis na bioprodução de carotenoides em frascos agitados por *Sporidiobolus salmonicolor*, observando que a agitação (150 a 200 rpm) exerceu efeito positivo significativo ($p < 0,05$) sobre a concentração de carotenoides totais, carotenoides específicos e biomassa.

2.3.3 Efeito da intensidade luminosa na bioprodução de carotenóides

A produção e o acúmulo de carotenoides são positivamente afetados pela irradiação de luz em algas, fungos e bactérias. Contudo, a intensidade e forma de iluminação variam com o microrganismo. A teoria da foto indução pode ser descrita em dois aspectos; no primeiro, o efeito da luz sobre o crescimento do microrganismo exerce papel fundamental, como estimulante da produção; o segundo aspecto considera que o acúmulo de carotenoides na célula está associado com o aumento da atividade das enzimas envolvidas na biossíntese de carotenoides (BHOSALE., 2004).

Tada et al., (1990) mostraram que em *Rhodotorula minuta*, o fitoeno e outros carotenóides tiveram concentrações baixas quando as células foram cultivadas no escuro, mas estas concentrações aumentaram quando as células foram cultivadas sob iluminação. Os autores concluíram que as enzimas necessárias para converter o fitoeno em outros carotenóides não eram induzidas pela luz e somente as enzimas envolvidas na síntese de fitoeno sofreram influência da luz. Tada; Shiroishi (1982) realizaram outro trabalho com a finalidade de observar o efeito da atividade enzimática de 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima-A redutase (HMG-Co-A) em relação à intensidade luminosa. Eles observaram que a atividade enzimática da HMG-Co-A redutase foi maior para as células cultivadas sob iluminação, ou seja, a atividade enzimática é influenciada pela intensidade luminosa, utilizada durante a fermentação.

As lâmpadas LED's (Light Emitting Diode) emitem luz com comprimento de onda variável. Segundo Kim et al., (2006) vários fatores afetam a acumulação de astaxantina em *Haematococcus pluvialis*: limitação de nutriente ou suplemento, estresse de oxigênio, alta intensidade de luz e luz azul. Dentre esses, o efeito da luz azul é o fator mais importante para o acúmulo de astaxantina. A luz é tão importante para a produção de astaxantina, que num futuro próximo ela poderá ser a resposta para a sua produção. Quando culturas de *Haematococcus pluvialis* são iluminadas continuamente por LED's azul (λ_{\max} de 470 nm), a concentração de astaxantina aumentou rapidamente, enquanto que na presença de LED's vermelho (λ_{\max} de 625nm) inicia de maneira

tardia e diminui com o tempo (LABABPOUR et al., 2005). Segundo Katsuda et al., (2004) LED'S que emitem baixos comprimentos de onda (380 - 470 nm), ocorrendo apenas a indução da mudança morfológica em *Haematococcus pluvialis* e aumento na acumulação da astaxantina, embora a indução cause a supressão do crescimento celular.

Alguns estudos sugerem que a alga *Haematococcus pluvialis* pode acumular aproximadamente 3% de astaxantina em relação ao peso da célula seca quando exposta à luz solar ou lâmpadas fluorescentes ou halógenas. A luz azul aumentou a biossíntese de astaxantina na *Haematococcus pluvialis* e elevou o conteúdo deste pigmento em aproximadamente 7% sob luminosidade emitida de diodos de luz azul (LED'S) (KATSUDA, 2004).

2.3.4 Efeito da composição do meio de cultivo na bioprodução de carotenóides

A sacarose e a glicose são as formas de carbono mais comumente utilizadas na bioprodução de carotenóides. O uso de glicose levou a maiores rendimentos na produção específica de carotenóides (1000µg/g) por *Rhodotorula* sp. (BUZZINI et al., 1999). Porém, na produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma*, verificou-se que as concentrações altas de glicose inibem a carotenogênese, enquanto que a sacarose, maltose e celobiose foram os dissacarídeos que produziram melhores resultados. Um aumento de até 12 vezes na produção de β-caroteno foi observado no cultivo de *Phaffia rhodozyma* em meio com 5% (m/v) de glicose (SUTHERLAND et al., 1996).

Fontes de nitrogênio também afetam o crescimento e a pigmentação em *Xanthophyllomyces dendrorhous*. A peptona foi considerada melhor fonte de nitrogênio para pigmentação, entretanto, estudos relataram que o uso do extrato de leveduras como fonte de nitrogênio aumentou a concentração de carotenóides totais (MALDONADE, 2003). An et al., (1991) observaram que a fonte de nitrogênio é lentamente absorvida pelas linhagens mutantes de *Xanthophyllomyces dendrorhous*, indicando que a biossíntese de astaxantina pode ser regulada pelo teor de nitrogênio.

Nos últimos anos muitos processos têm sido desenvolvidos baseados na aplicação de resíduos agroindustriais como substratos em bioprocessos para a produção de proteínas isoladas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e metabólitos secundários biologicamente importantes (LAUFENBERG et al., 2003; MASSADEH et al., 2001).

Vandenberg et al., (2000) observaram que na produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* em bagaço de mandioca, houve um enriquecimento proteico do material cultivado. O teor proteico que no início do processo era de 13,1% passou para 23,1% em 120h de cultivo.

Bravo et al., (2000) pesquisaram a produção de poligalacturonase (enzima amplamente usada na indústria de alimentos, tais como as de sucos de frutas, vinhos, cacau e café) utilizando-se o caldo de cana (resíduo da indústria de sucro-alcóoleira).

Haard (1988) otimizou a produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma*, utilizando melão de cana-de-açúcar (1% de glicose), sendo que a concentração do carotenóide foi de 52 µg/g de biomassa seca.

O uso destes resíduos agroindustriais nestes bioprocessos pode promover substratos alternativos e, além disso, auxilia na resolução de problemas ambientais, os quais são diferentemente causados por sua disposição (REDDY, 2003).

2.3.4.1 Melão de cana-de-açúcar

O melão é um subproduto da fabricação do açúcar (Figura 7), apresenta-se como um líquido viscoso, de cor escura e muito doce, do qual não é possível extrair maior quantidade de sacarose cristalizada. Este possui como principais destinos às indústrias de fermentação alcoólica, de panificação e de alimentos para animais (SILVA, 2008).

A composição do melão de cana-de-açúcar é muito variável, pois depende de fatores agrícolas, industriais, como a variedade de cana-de-açúcar, o grau de maturação, clima, condições de cultura, tipo de corte, eficiência industrial entre outros. Os principais componentes do melão de cana-de-açúcar são: a água, carboidratos, compostos não açúcares de origem orgânica como: aminoácidos, ácidos carboxílicos alifáticos e olefínicos, vitaminas, proteínas, fenóis e outros. O melão de cana-de-açúcar é constituído por uma fração de origem mineral de grande importância, na qual estão presentes mais de 20 metais e não metais em diferentes proporções. Entre os cátions encontrados, o potássio, o cálcio e o magnésio ocupam mais de 98% do total. Do nitrogênio presente no melão de cana-de-açúcar somente 35% são assimilados, na forma de proteína pura, contando com um adicional de 7% de componentes nitrogenados na forma de ácidos nucleicos, aminoácidos livres e outros compostos. A composição de aminoácidos no melão de cana-de-açúcar

é de 1%, entre os quais se destacam os ácidos aspártico e glutâmico, que constituem mais de 70% do total (ROMBLA et al., 1999).

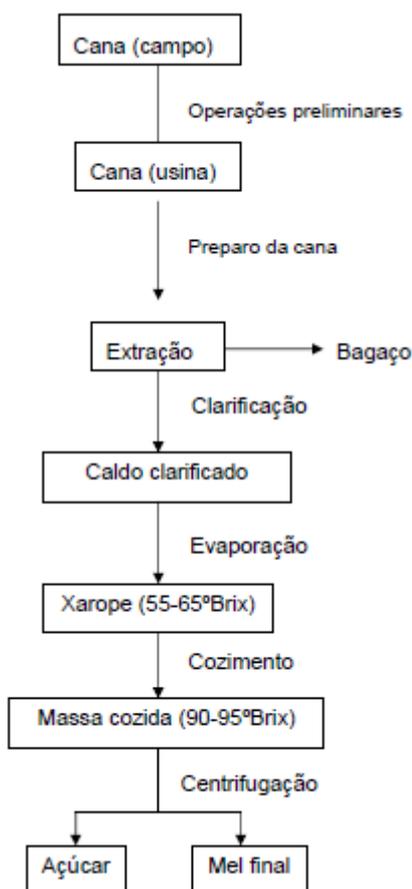


Figura 7 – Fluxograma do processamento de cana-de-açúcar para a produção de açúcar e álcool (SILVA, 2008)

Por apresentar muitos nutrientes importantes para o metabolismo celular, com o tratamento adequado pode ser empregado para o desenvolvimento de bprodutos por muitos micro-organismos como leveduras, fungos filamentosos, algas e bactérias (JIANG et al., 2009; YAN., 2011).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Micro-organismo

A produção de astaxantina foi investigada a partir da linhagem de *Mucor circinelloides*, (IFM 45507), Research Center for Pathogenic Fungi – Chiba University, Japão, depositada na Coleção de culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (UCP 070), Universidade Católica de Pernambuco.

3.2. Condições de Cultivo e de Produção de Astaxantina

Os meios utilizados foram Synthetic Medium for Mucorales (Hesseltine; Anderson., 1957) como padrão e como substrato alternativo o melão de cana-de-açúcar em diferentes concentrações (4%, 7% e 10%) a 25°C, 120 rpm, pH 6,5 por 96h, sendo submetidos à iluminação com LED'S de cor azul (λ_{max} de 470 nm) e no escuro. O inóculo utilizado para o crescimento em meio líquido foi obtido a partir de culturas crescidas em placas de Petri contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), após 5 dias de incubação a 28 °C. A contagem de esporos foi realizada em Câmara de Neubauer, com inóculo padronizado em 10^7 esporos/mL. Para a preparação do inóculo, 1 mL da suspensão de esporos foi inoculada em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio utilizado para a produção de astaxantina, segundo metodologia de Bonfim (1999). Após a seleção da melhor concentração os frascos contendo melão de cana-de-açúcar foram incubados em shaker orbital sob diferentes temperaturas (25, 30 e 35°C), pH (6,0, 7,0 e 8,0) e agitação (120, 135 e 150 rpm) por 96h sob iluminação com LED'S de cor azul e no escuro, segundo um planejamento fatorial 2^3 com quatro repetições no ponto central (Tabela 2 e 3). Ao final do cultivo a biomassa foi obtida por centrifugação a 10.000g, 15 min, 5^o C. A biomassa foi lavada para remoção do meio, congelada e liofilizada.

Tabela 2 - Planejamento fatorial (2^3) utilizado para uma triagem de três fatores na produção de astaxantina por *Mucor circinelloides*

Variáveis independentes	Níveis de variação		
	-1	0	+1
Temperatura	20°C	25°C	30°C
pH	5,5	6,5	7,5
Agitação	100 rpm	120 rpm	140 rpm

Tabela 3 – Matriz do planejamento fatorial (2^3) utilizado para uma triagem de três fatores na produção de astaxantina por *Mucor circinelloides*, para culturas iluminadas com LED'S azul com ausência de fonte luminosa

Experimento	Temperatura	pH	Agitação
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0

3.3. Métodos analíticos

3.3.1 Determinação da concentração de biomassa

A biomassa foi determinada através da realização do peso seco nos intervalos de tempo de 0, 24, 48, 72 e 96 horas.

3.3.2 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada através da leitura da amostra (líquido metabólico) em um pHmetro nos intervalos de tempo de 0, 24, 48, 72 e 96 horas.

3.3.3 Determinação das proteínas totais

As concentrações de proteínas nos líquidos metabólicos livre de células foram avaliadas utilizando o Kit de Proteínas Totais do LabTest Diagnóstica S.A., Brasil, para dosagem colorimétrica de proteínas totais, pelo reativo de Biureto. Foram pipetados 2,5 mL do reativo para 50 µL de cada amostra na presença de 2 gotas de hidróxido de sódio. A absorbância foi avaliada a 550 nm.

3.4. Extração e quantificação da astaxantina

A astaxantina foi extraída a partir das células secas adicionadas com 2 mL de dimetilsulfóxido. Após 30 minutos foram acrescentados 6 mL de acetona, homogeneizados e centrifugados a 4.000 rpm por 5 minutos. Aos sobrenadantes reunidos, serão adicionados 10 mL de solução aquosa de cloreto de sódio 200 g/L, 10 mL de água destilada e 5 mL de éter de petróleo. A fase etérea foi separada, seca por filtração através de acetato de etila, transferida para um balão volumétrico de 25 mL. O cálculo da concentração de astaxantina foi realizado a partir de uma curva de calibração da astaxantina padrão (Sigma), com a absorvidade de 474 nm: $A = 1.600$, segundo metodologia otimizada de Bonfim (1999).

3.5. Teste de toxicidade

A avaliação da toxicidade foi realizada segundo a metodologia descrita por Mc Laughlin et al., (1985). Foi utilizado o microcrustáceo *Artemia salina* como bioindicador sendo, bioensaio baseado na porcentagem de morte dos organismos em relação ao seu número inicial (10 larvas), na presença de diferentes concentrações da astaxantina (v/v de 25%, 50% e 75%), diluídas em 5 mL de uma solução aquosa de sal marinho sintético (33,3 g/L), incubado por 24h. O volume máximo da amostra teste (líquido metabólico) foi de 1,5 mL. Em seguida, foi realizada a contagem dos organismos sobreviventes, determinando-se assim a dose limite (CL50) de astaxantina. Os testes foram realizados em duplicata.

3.6. Determinação da atividade antioxidante através do método de sequestro de radicais livres (DPPH)

Em ambiente escuro, uma alíquota de 0,1 mL da astaxantina foi transferida para tubos de ensaio com 3,9 mL do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e homogeneizada em agitador de tubos. Como padrão foi utilizado 0,1 mL da solução controle (de álcool metílico, acetona e água) com 3,9 mL do radical DPPH e homogeneizado. O álcool metílico foi utilizado como branco, para calibrar o espectrofotômetro. As leituras (515 nm) foram monitoradas a cada minuto, onde foi observada a redução da absorbância até sua estabilização (BRAND-WILLIAMS, 1995).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção de astaxantina utilizando meio Hesseltine & Anderson (1957)

O Synthetic Medium for Mucorales é descrito como meio padrão para a produção de carotenóides com o objetivo de aumentar a produção de astaxantina. A cultura de *Mucor circinelloides* nas condições padrões de produção (25°C, pH 6,5 e 120 rpm) produziu astaxantina, (Tabela 4) apresentando rendimento de 142,0 µg/g sem influência da luz e 340,1 µg/g quando se utilizou a luz azul, com um aumento da produção de aproximadamente 42%.

Tabela 4 – Resultados experimentais da produção de astaxantina por *Mucor circinelloides* utilizando Synthetic Medium for Mucorales

Ausência de fonte luminosa		Sob Influência de LED'S azul	
Astaxantina (µg/g)	Biomassa (g/L)	Astaxantina (µg/g)	Biomassa (g/L)
142,0	1,2	340,1	1,4

4.2 Screening da produção de astaxantina utilizando o meio melação de cana-de-açúcar (4%, 7% e 10%)

Os resultados da produção de astaxantina com o Synthetic Medium for Mucorales serviram de subsídio para a realização de experimentos com o melação de cana-de-açúcar, com a finalidade de observar a produção de astaxantina. De acordo com o screening a melhor concentração de astaxantina se deu na condição de melação de cana-de-açúcar a 4% (Tabela 5) tanto na presença de luz azul como na ausência de fonte luminosa, quando comparada com as demais condições.

Considerando que o rendimento industrial do processo depende em grande parte dos nutrientes presentes, quanto menor a disponibilidade do melação de cana-de-açúcar haverá maiores rendimentos de astaxantina, uma vez que o melação de cana-de-açúcar disponível em maior

quantidade pode inibir o processo devido ao grande número de compostos orgânicos e outros materiais (JANG et al., 2009). Jin Lui et al., 2012 utilizou o melão de cana-de-açúcar em baixas concentrações (5g/L) para a produção de astaxantina por *Chorella zofingiensis* e obteve alta produtividade de biomassa (3,1 g/L) e astaxantina (1,7 mg/L).

Tabela 5 – Resultados experimentais da produção de astaxantina por *Mucor circinelloides* utilizando meio de melão de cana-de-açúcar em diferentes concentrações (4%, 7% e 10%)

Concentração do melão de cana-de-açúcar	Astaxantina (µg/g)	
	Sem luz	Luz azul
4%	32,7	134,4
7%	14,6	52,9
10%	7,9	18,7

4.3 Produção de astaxantina utilizando melão de cana-de-açúcar a 4% sob a influência de luz azul e com ausência de fonte luminosa

A partir dos resultados com o meio melão de cana-de-açúcar a 4%, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 com 4 repetições no ponto central, para identificar os fatores ou variáveis independentes que possam apresentar um impacto significativo na variável resposta – produção de astaxantina em diversas condições. A redução do número de ensaios, do custo e qualidade das informações utilizando planejamento experimental são incontestáveis, quando comparado com a metodologia convencional que avalia um fator por vez. As Tabelas 6 e 7 demonstram os resultados experimentais de astaxantina *versus* biomassa a partir de culturas de *Mucor circinelloides* com ausência de fonte luminosa e sob influência de luz azul, respectivamente.

A melhor condição para a produção de astaxantina por melão de cana-de-açúcar a 4% (Tabelas 5 e 6) deu-se na condição experimental 4, onde as culturas foram submetidas a uma maior temperatura (30°C), maior pH (7,5) e menor agitação (100 rpm), tanto na ausência de fonte luminosa (469,0 µg/g) como com a presença de luz azul (667,6 µg/g) aumentando 42,3% a produção de astaxantina quando essas culturas foram submetidas à iluminação com LED's azul.

Tabela 6 – Resultados da produção de astaxantina de acordo com planejamento fatorial 2^3 com ausência de fonte luminosa

Experimento	Astaxantina (µg/g)	Biomassa (g/L)
1	353,5	2,1
2	110,1	1,7
3	159,3	2,0
4	469,0	1,0
5	79,3	2,2
6	55,7	1,9
7	95,6	1,9
8	95,8	2,1
9	132,4	2,2
10	127,4	2,1
11	129,1	2,3
12	128,2	2,3

Tabela 7 – Resultados da produção de astaxantina de acordo com planejamento fatorial 2^3 sob a influência de luz azul

Experimento	Astaxantina (µg/g)	Biomassa (g/L)
1	429,3	1,0
2	168,5	1,6
3	264,1	2,0
4	667,6	1,1
5	420,7	1,9
6	99,5	2,0
7	344,2	2,1
8	257,0	1,8
9	335,5	2,2
10	335	2,1
11	334,9	2,6
12	335,2	2,6

Os resultados apresentados demonstraram que a utilização de LED's azul de forma contínua, pode aumentar significativamente o teor de astaxantina produzida pelo micro-organismo *Mucor circinelloides*, corroborando com o que descrevem Tada; Shiroishi, (1982), quando sugerem que a luz possa estimular a carotenogênese em fungos, e de acordo com o demonstrado em espécies de *Phycomyces* e *Xanthophyllomyces dendrorhous*, quando a luz demonstrou-se favorável para o aumento de carotenóides no micélio, através da indução luminosa (MORIEL, 2005).

Segundo Katsuda et al., (2004), LED's que emitem baixos comprimentos de onda (380 - 470 nm), como é o caso do LED's azul, podem induzir a mudança morfológica em *H. pluvialis* e o aumento na acumulação de astaxantina, embora a indução cause a supressão do crescimento celular, como foi observado nos experimentos realizados.

Tada; Shiroishi (1978) observaram que a luz não afetou a taxa de crescimento celular, assim como o consumo de glicose e aminoácidos por *Rhodotorula minuta*. Porém, a concentração de carotenóides nas células cultivadas sob iluminação, diferiu daquelas cultivadas no escuro. As células cultivadas sob intensidade luminosa de 4.000 lux produziram 140 µg/g de carotenóides por g de célula seca, enquanto que as células crescidas no escuro apresentaram somente de 10 a 15 µg/g.

Como a astaxantina é uma molécula rica em carbono, provavelmente uma estimulação deste carotenóide certamente pode levar a um redirecionamento de carbono disponível para a síntese de biomassa conforme os estudos de Meyer; Du Preez (1994). Isto explicaria a diminuição de biomassa ao mesmo tempo em que ocorre o aumento dos rendimentos de astaxantina.

4.4 Influência das variáveis na produção de astaxantina utilizando melação de cana-de-açúcar a 4% sob influência de LED's azul

Considerando que a temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes nas vias de carotenogênese foi observado que para a cultura de *Mucor circinelloides* a temperatura favorável para a produção de acordo com o planejamento experimental foi de 30°C.

Quando a levedura *R. glutinis* foi cultivada em 5 °C, ocorreu a produção predominante de β-caroteno, enquanto que o cultivo a 25 °C levou à síntese de toruleno e torularrodina. O crescimento celular ótimo foi obtido a 30 °C. Nesta mesma temperatura, a máxima produção de carotenoides foi de 8388 µg/L e 31,9 g/L de biomassa (FRENGOVA et al., 1995). Em outra investigação estudando a produção de carotenoides com *R. glutinis*, Aksu; Eren (2007) obtiveram o comportamento semelhante ao da *R. mucilaginosa*. A taxa de crescimento específico da levedura aumentou com a elevação da temperatura de 25 para 30 °C, de aproximadamente 0,175 para 0,238 h⁻¹ e, diminuiu de maneira drástica em temperatura superior a 30 °C (~0,14 h⁻¹).

Tratando-se do pH inicial (7,5) este apresentou um baixo efeito sobre a produção de astaxantina e biomassa inicial, contudo a produção de astaxantina e o crescimento da biomassa foram induzidos com o decréscimo do pH para 6,5 (Figura 8) estabelecendo assim como o pH ótimo para a produção, sobretudo porque a biossíntese de carotenoides naturalmente ocasiona mudanças do pH do meio de cultivo, como consequência do crescimento dos fungos. Esses resultados corroboram com Meinicke (2008) que afirma que uma vez em pH ácido ocorre inibição da produção, e em pH neutro a alcalino há um favorecimento para um aumento da permeabilidade celular e liberação dos pigmentos.

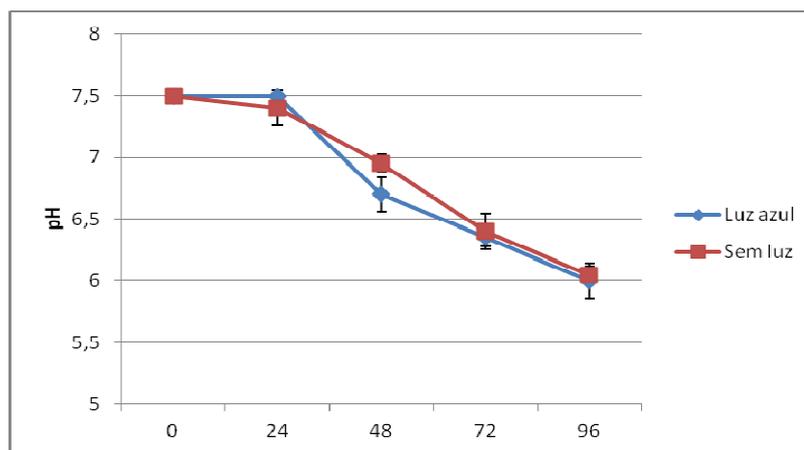


Figura 8 – Acompanhamento do pH durante a produção de astaxantina por *Mucor circinelloides*

Os efeitos do pH (inicial e controlado) foram estudados durante o cultivo de *X. dendrorhous* para produção de astaxantina por Hu et al., 2006. Na bioprodução em frascos agitados foram observados pH iniciais ótimos de 6,0 para crescimento celular (17,2 g/L) e 5,0 para produção de astaxantina (20,4 mg/L). Em relação ao pH controlado no biorreator, obtiveram-se as seguintes respostas para concentração de astaxantina: pH 4,0 – 17,7 mg/L, pH 5,0 – 21,8 mg/L e pH 6,0 – 18,8 mg/L. Para crescimento celular, a maior concentração de biomassa foi obtida a pH 6,0 (17,2 g/L). Em função da variabilidade dos resultados, os autores desenvolveram uma estratégia de controle de pH com a finalidade de aumentar a produção de astaxantina. Como o fator de conversão YP/X (1,5 mg/g) mais elevado foi em pH 4,0 e o maior crescimento celular foi em pH 6,0, os mesmos realizaram a bioprodução onde nas primeiras 80 h manteve-se pH 6,0 e na sequência em pH 4,0. Com essa estratégia de cultivo, a concentração de astaxantina foi de 27,0 mg/L, proporcionando um aumento de 24,1% em comparação com o cultivo em pH constante.

Por sua vez, a taxa de agitação foi de 100 rpm (baixa), influenciando em um menor crescimento celular devido à diminuição da disponibilidade de nutrientes, mas influenciando positivamente o acúmulo de astaxantina devido ao estresse. Tinoi et al., (2005) em frascos agitados, verificaram que em taxas de agitação baixas (100 a 150 rpm) tem-se menor crescimento celular, devido à diminuição da disponibilidade de nutrientes na superfície das células. Ao contrário, em altas taxas de agitação (>250 rpm) ocorreu ruptura celular evidenciada pelo aparecimento de uma fina camada oleosa.

Com os resultados expressos na Tabela 6 e utilizando o programa Statistica 7.0, obteve-se os valores dos efeitos de cada parâmetro (Temperatura; pH; Agitação) sobre o rendimento de

astaxantina. Para tanto foi necessário determinar quais parâmetros realmente apresentam influência estatística significativa e isso pode ser observado por meio do Diagrama de Pareto (Figura 9).

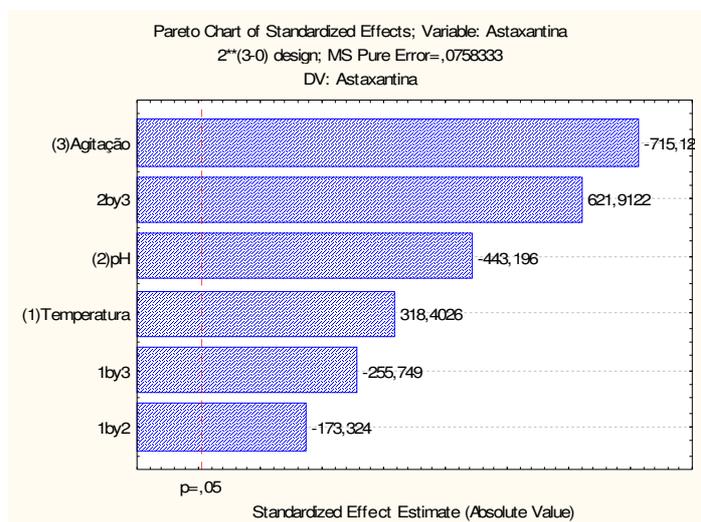


Figura 9 – Diagrama de Pareto com o efeito estimado das variáveis testadas no planejamento fatorial 2^3 para a produção de astaxantina

O Diagrama de Pareto demonstra que todas as variáveis e suas interações foram estatisticamente significativas para obtenção da variável resposta – astaxantina. Contudo na faixa estudada, a temperatura, e a interação pH/Agitação apresentaram efeitos significativos positivos ($p < 0.05$) a um nível de 95% de confiança. Assim o aumento nestes parâmetros ocasionaria uma elevação na concentração de astaxantina. Por sua vez, o pH e a agitação apresentaram efeitos negativos, indicando que para o aumento da variável resposta deve-se diminuir a faixa de concentração desses parâmetros.

As respostas demonstram que para atingir a região ótima para a produção faz-se necessário o aumento da temperatura e diminuição do pH e agitação, porém esse resultado ainda precisa ser otimizado, pois, de acordo com as análises da superfície de resposta figuras 10 e 11, pode-se inferir que o modelo precisa ser mais bem ajustado aos dados experimentais.

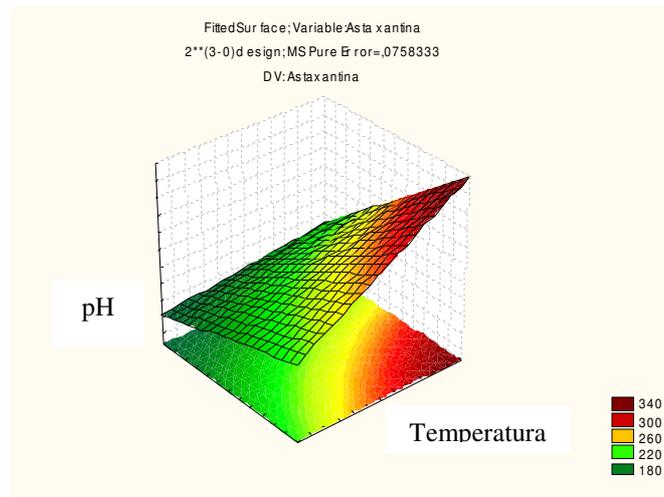


Figura 10 – Superfície de resposta da variável astaxantina em função das variáveis independentes temperatura e pH

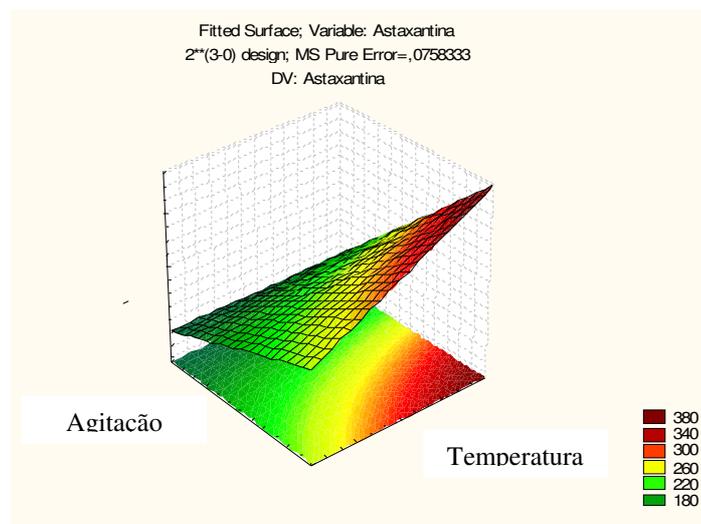


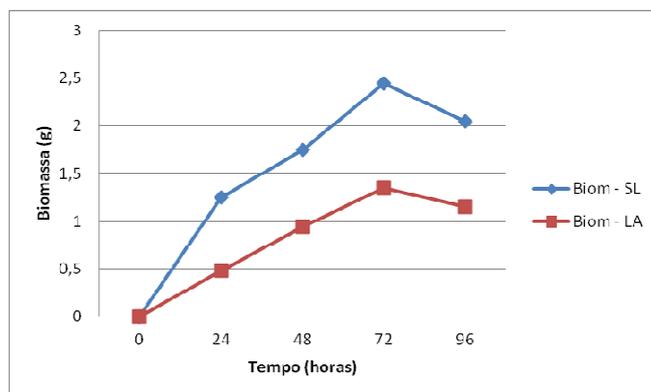
Figura 11 – Superfície de resposta da variável astaxantina em função das variáveis independentes temperatura e agitação

As pesquisas de produção de pigmentos naturais utilizando micro-organismos vêm enfocando não somente a seleção de linhagens produtoras de uma variedade de carotenoides, mas também a otimização das metodologias de cultivo para um aumento na produção de pigmento, redução de custos com a bioprodução e posterior aplicação em escala industrial. Além disso,

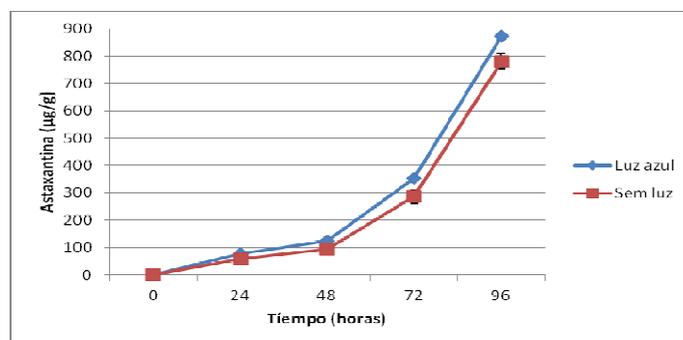
inúmeros trabalhos são realizados aplicando engenharia genética visando a obtenção de carotenoides de maior interesse e em maiores quantidades. A tendência é o aumento nas pesquisas em relação à produção de pigmentos através de micro-organismos, pois se tem a necessidade de redução de custos de produção e aumento no rendimento, tornando assim a bioprodução competitiva com a síntese química (VALDUGA et al., 2009).

4.5 Estudo cinético da produção de astaxantina utilizando melão de cana-de-açúcar a 4% sob LED'S azul e com ausência de fonte luminosa

A Figura 12 apresenta as cinéticas de crescimento e produção de astaxantina em meio de melão de cana-de-açúcar para o ponto maximizado (ensaio 4) do planejamento fatorial 2^3 em função do tempo.



(a)



(b)

Figura 12 – (a) Cinética de crescimento do *Mucor circinelloides* (b) cinética de produção de astaxantina por *Mucor circinelloides* nas condições maximizadas do planejamento fatorial 2^3

De acordo com a Figura 12 (a), analisando o crescimento celular, pode-se observar uma fase lag ou de latência, imediatamente após a inoculação do meio até 24h de processo, onde ocorre a adaptação do micro-organismo e síntese de enzimas necessárias ao metabolismo dos componentes presentes no meio. Entre 24h e 48h é possível observar uma fase de transição, onde se observa o início da reprodução microbiana propriamente dita. Esta fase é seguida pela fase logarítmica ou exponencial, onde a velocidade de crescimento é máxima observada em 72h, tanto na ausência de fonte luminosa (1,307 g) como na presença de LED's azul (1,302 g). As fases seguintes observadas são a fase linear e de desaceleração do crescimento, observada em 96h, onde a velocidade de crescimento diminui em função do esgotamento da fonte de carbono no meio de cultivo. Nestas fases, a biomassa atinge o seu valor máximo e constante, onde ocorre um balanço entre a velocidade de crescimento e a velocidade de morte do micro-organismo, seguida por uma diminuição na concentração celular em função do aumento da velocidade de morte celular comparada com a velocidade de formação de células novas.

Os micélios de *Mucor circinelloides* mostraram uma intensa pigmentação amarelo-alaranjados durante o final do cultivo. Geralmente, as cores produzidas por estes carotenóides variam de amarelo a laranja até vermelho brilhante, e são o resultado da multiplicidade de ligações duplas conjugadas nas suas estruturas químicas (BRITTON, 1995).

De acordo com a Figura 12 (b), a concentração máxima de astaxantina por *Mucor circinelloides* foi obtida também em 72 h do início do cultivo, indicando que a produção inicial ocorre exatamente na fase exponencial de crescimento, ou seja, o acúmulo de pigmentos está diretamente associado ao crescimento. Meyer; Du Press (1993) descreveram que a astaxantina fungica é produzida principalmente durante a fase exponencial, podendo também ser observada na fase estacionária, mas em pequena quantidade. Moriel (2004) descobriu que a concentração celular da astaxantina não varia após o término da fase exponencial e que não é necessário se chegar à fase estacionária para se obter a máxima concentração de astaxantina.

Pesquisas realizadas com mutantes de *Mucor circinelloides* constataram que o aparecimento de carotenóides ocorre na fase estacionária e com uma produção máxima depois de 3 dias em culturas típicas de *Mucor circinelloides*, mas em 4 dias em espécies deficientes em carotenóides. Com esse perfil de acumulação de carotenóides, os autores concluíram que os carotenóides são metabólitos secundários em *Mucor circinelloides* (FRASER et al., 1996).

A Figura 13 apresenta os resultados de proteínas totais determinados nos experimentos realizados com *Mucor circinelloides* durante as 96 h de cultivo em meio de melão de cana-de-açúcar a 4% na ausência de fonte luminosa e com LED's azul. Analisando os valores médios

determinados ficou evidenciada a produção máxima de proteínas totais com 96 h de cultivo atingindo aproximadamente 23 g/dL. O aumento da concentração de proteínas com 96 h de cultivo foi devido à lise das células fungicas na fase de morte celular (FELIX et al., 2004).

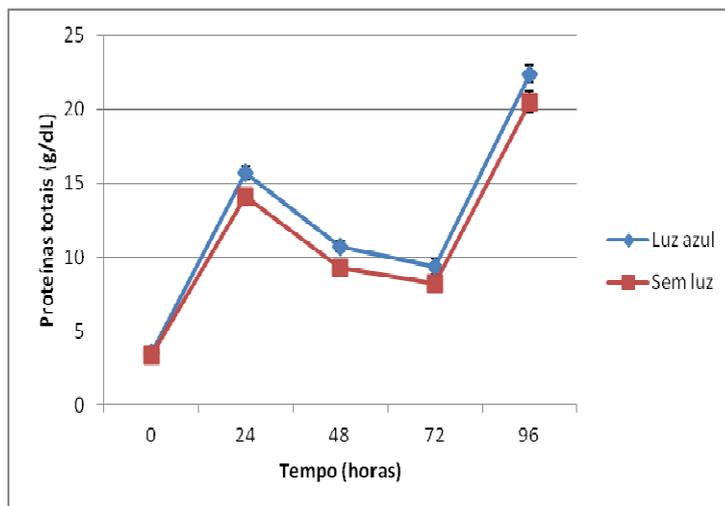


Figura 13 – Determinação das proteínas totais durante a produção de astaxantina por *Mucor circinelloides*

4.6 Determinação da toxicidade da astaxantina produzida em melão de cana-de-açúcar a 4% e no meio Hesseltine e Anderson

De acordo com a tabela 7 a astaxantina produzida por *Mucor circinelloides* em meio de melão de cana-de-açúcar apresentou baixa toxicidade frente à *Artemia salina* na concentração de 25%, com índice de letalidade (LC 50) de cerca de 60%, porém com o aumento da concentração a astaxantina mostrou-se tóxica principalmente na concentração de 75% com LC 50 de 100%.

Utilizando o meio Hesseltine e Anderson a astaxantina obtida também apresenta baixa toxicidade frente à *Artemia salina* com 25% e LC 50 de 65% e alta toxicidade na concentração de 75% com LC 50 de 100%. Esses resultados indicam que a concentração mínima de utilização da astaxantina obtida por *Mucor circinelloides* nas condições testadas são de aproximadamente 25%, requerendo mais testes frente a outros organismos para avaliar essa toxicidade. No entanto, esses resultados são considerados pioneiros, uma vez que não se tem registros na literatura de testes de toxicidade da astaxantina obtida por espécies de *Mucor circinelloides*.

Tabela 8 - Resultados da determinação da toxicidade da astaxantina produzida por *Mucor circinelloides* utilizando meio de melação de cana-de-açúcar e Hesseltine e Anderson

Concentração de astaxantina %	Mortalidade no meio		Mortalidade no meio H & A	
	Melaço de cana-de-açúcar	LC 50 (%)		LC 50 (%)
25	4	60	4	65
50	7	70	8	78
75	10	100	10	100

4.7 Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH

De acordo com as análises da Figura 14, a astaxantina obtida em melação de cana-de-açúcar apresentou potencial de inibição dos radicais livres de 57%, 72% e 86% nas concentrações testadas, indicando uma boa atividade antioxidante quando comparada com o ácido gálico (padrão) que apresentou 75%, 92% e 100% de potencial de inibição. Contudo, este trabalho relata pela primeira vez a atividade antioxidante da astaxantina obtida por culturas de *Mucor circinelloides*.

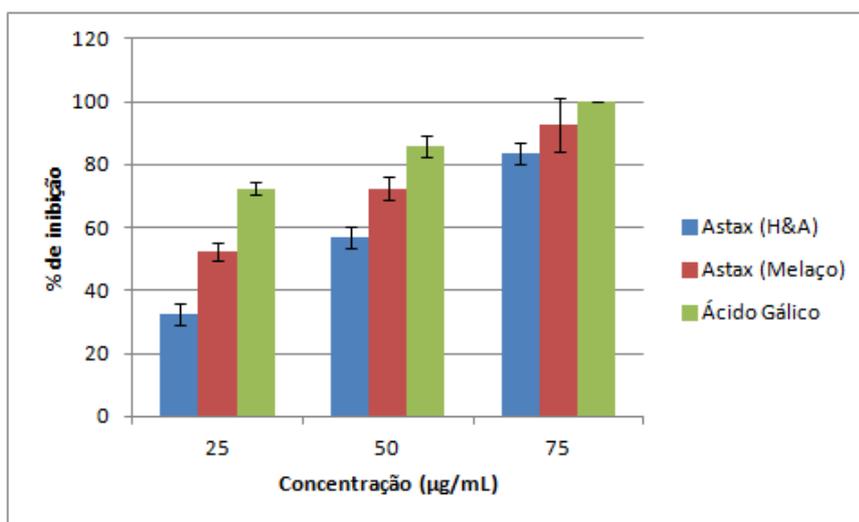


Figura 14 - Determinação do potencial de inibição dos radicais livres da astaxantina obtida por *Mucor circinelloides*

Pesquisas demonstram que a eficiência da AST na capacidade antioxidante decorre também por via indireta, pela diminuição da fluidez da membrana na fase líquido-cristalina, além da sua disposição na bicamada lipídica (que é perpendicular com relação à superfície da membrana). Este efeito permitiria que as espécies reativas fossem interceptadas tanto na interface membrana/água quanto no *core* da bicamada (MCNULTY et al, 2007). Segundo Wisniewska et al (2006) os carotenóides somente interferem na difusibilidade de espécies reativas se estiverem dissolvidos na membrana como “monômeros” e a presença de agregados causa perturbações nas membranas que aumentariam esta permeabilidade.

5. CONCLUSÕES

- O resíduo agroindustrial melão de cana-de-açúcar possui potencial para a produção de astaxantina;
- O melão de cana-de-açúcar aumentou a produção de astaxantina principalmente na concentração de 4%;
- O teor máximo de astaxantina no planejamento fatorial 2^3 foi de 667,6 $\mu\text{g/g}$ com luz azul e 469,0 $\mu\text{g/g}$ sem luz nas condições de 30°C, 100 rpm, e pH inicial de 7,5.
- A luz azul interfere diretamente na síntese de astaxantina;
- Na cinética da bioprodução do ponto maximizado do planejamento fatorial 2^3 obteve-se a máxima concentração de astaxantina 667,6 $\mu\text{g/g}$ com 96h de cultivo em pH 6,5;
- A astaxantina obtida por *Mucor circinelloides* apresenta potencial antioxidante, sendo capaz de sequestrar os radicais livres;
- A astaxantina apresenta baixa toxicidade frente à *Artemia salina* na concentração de 25%.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Artigos:

- An, G.H., Bielich, J., Auerbach, R., Johnson, E. A. 1991. Isolation and characterization of carotenoid hyperproducing mutants of yeasts by flow cytometry and cell sorting. *Biotechnology* 9: 70-73.
- Aksu, Z; Eren, A. T. 2007. Production of carotenoids by isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochemical Engineering Journal*. 35: 107-113.
- Aksu, Z; Eren, A.T. 2005. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochemistry* 40: 2985-2991.
- Barros, M.P., Pinto, E., Colepicolo, P., Pedersén, M. 2001. Astaxanthin and peridinin inhibit oxidative damage in Fe²⁺-Loaded Liposomes: Scavenging Oxyradicals or changing membrane permeability? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 288: 225-232.
- Bhosale, P. 2004. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63: 351 – 361.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology* 28: 25-30.
- Bravo, C. E. C., Carvalho, E. P., Schwan, R. F., Gómez, R. J. H. C., Pilon, L., 2000. Determinação de Condições Ideais para Produção de Poligalacturonase por *Kluyveromyces Marxianus*. *Ciência e agrotecnologia* 24: 137-152.
- Branley, P. M., Mackenzie, A. 1992. Carotenoid biosynthesis and regulation in fungi. *Handbook of Applied Mycology*. 55: 401-444.
- Britton, G. 1992. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *Methods in Enzymology* 213: 3-13.
- Britton, G. 1995. UV/visible spectroscopy. *Carotenoids* 43: 13-62.
- Buzzini, P; Martini, A. 1999. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. *Bioresource Technology* 71: 41 –44.
- Cardoso, S. L., Nicodem, D. E., Moore, T. A., Moore, A. L., Gust, D. 1996. *Journal of Brazilian Chemical Society*. 7: 19.
- Cazetta L. M., Colabone Celligoi, M. A. P. 2005. Aproveitamento do melação e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa proteica e lipídica por leveduras e bactéria. *Ciências Exatas e Tecnológicas* 26: 105-112.

- Chen, X., Chen, R., Guo, Z., Li, C., Li, P. 2007. The preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with β -cyclodextrin. *Food Chemistry* 101: 1580-1584.
- Cunningham, F.X., Gantt, E. Genes and Enzymes of Carotenoid Biosynthesis in Plants. 1998. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 557-583.
- Davoli, P., Mierau, V., Weber, R.W.S. 2004. Carotenoids and fatty acids in red yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis*. *Applied Biochemistry and Microbiology* 40: 392 – 397.
- Delgado-Vargas, F., Jimenez, A.R., Paredes-Lopez, O. 2000. Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and Betalains – Characteristics, Biosynthesis, Processing and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40: 173-289.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamiton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.
- Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S.M., Blanc, P., Murthy, K.N.C., Ravishankar, G.A. 2005. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Science and Technology* 16: 389-406.
- Eonseon, J., Lee, C.G., Polle, J.E.W. 2006. Secondary Carotenoid Accumulation in *Haematococcus* (Chlorophyceae): Biosynthesis, Regulation, Biotechnology. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 16: 821-831.
- Ernst, H. 2002. Recent advances in industrial carotenoid synthesis. *Pure Applied Chemistry*. 74: 1369-1382.
- Fonseca, R. A. S., Rafael, R.S., Kalil, S.J., Burkert, A.V., Burkert, J. F.M. 2011. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. *African Journal of Biotechnology* 10: 1165-1171.
- Fontana, J. D., Mendes, S. V., Persike, D. S., Peracetta, L. F., PASSOS, M. 2000. Carotenóides Cores Atraentes e Ação Biológica 13: 40-45.
- Felix, C.R; Noronha., E.F; Marco, J.L de. 2004. Proteases – características e aplicações industriais. In: Said, S., Pietro, R. C. L. R. Enzimas como agentes biotecnológicos. *Legis Summa* 327-347.
- Fraser, P. D; Ruiz-Hidalgo, M. J; Lopez-Matas, M. A. 1996. Carotenoid biosynthesis in wild type and mutant strains of *Mucor circinelloides*. *Biochemical et Biophysical Acta* 1289: 203-208.
- Fraser, P. D., Bramley, P. M. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research* 43: 228-265.
- Frengova, G., Simova, E., Beshkova, D. 1995. Effect of temperature changes on the production of yeast pigments cocultivated with lacto-acid bacteria in whey ultra filtrate. *Biotechnology Letters* 17: 1001 – 1006.
- Guerin, M., Huntley, M.E., Olaizola, M. 2003. *Haematococcus* astaxanthin: application for human health and nutrition. *Trends Biotechnology* 21: 210-216.

- Johnson, E.A., An, G.H. 1991. Astaxanthin from microbial sources. *Critical Reviews in Biotechnology* 11: 297-326.
- Haard, N. F. 1988. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. *Biotechnology Letters* 10: 609-614.
- Hayman, E. P., Yokoyama, H., Chichester., C.O., Simpson., K. 1974. Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. *Journal of Bacteriology* 120: 1339-1343.
- Hesseltine, C. W., Anderson, R. F. 1957. Microbiological Production of Carotenoids I. Zygospor and Carotene Produced by Intraspecific and Interspecific Crosses of Choanephoraceae in Liquid Media. *Mycology* 49: 449-452.
- Hibbett DS., Binder M., Bischoff JF., Blackwell M., Cannon PF., Eriksson O., Huhndorf S., James T., Kirk PM., Lücking R., Lumbsch T., Lutzoni F., Matheny PB., McLaughlin DJ., Powell MJ., Redhead S., Schoch CL., Spatafora JW., Stalpers JA., Vilgalys R., Aime MC., Aptroot A., Bauer R., Begerow D., Benny GL., Castlebury LA., Crous PW., Dai Y-C., Gams W., Geiser DM., Griffith GW., Gueidan C., Hawksworth DL., Hestmark G., Hosaka K., Humber RA., Hyde K., Köljalb U., Kurtzman CP., Larsson K-H., Lichtwardt R., Longcore J., Miadlikowska J., Miller A., Moncalvo J-M., Mozley-Standridge S., Oberwinkler F., Parmasto R., Reeb V., Rogers JD., Roux C., Ryvarden L., Sampaio JP., Schuessler A., Sugiyama J., Thorn RG., Tibell L., Untereiner WA., Walker C., Wang A., Weir A., Weiss M., White M., Winka K., Yao Y-J., Zhang N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111: 509-547.
- Hu, Z-C., Zheng Y-G., Zhao, W., Shen, Y.C. 2006. pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 586-590.
- Jiang, L., Wang, J., Liang, S., Wang, X., Cen, P., Xu, Z. 2009. Butyric acid fermentation in a fibrous bed bioreactor with immobilized *Clostridium tyrobutyricum* from cane molasses. *Bioresource Technology* 100: 3403–3409.
- Jin Liu., Junchao Huang., Yue Jiang., Feng Chen. 2012. Molasses-based growth and production of oil and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource Technology* 107: 393–398
- Johnson, E. A., Schroeder W. A. 1995. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 18374 – 18379.
- Katsuda, T., Lababpour, A., Shimahara, K., Katoh, S. 2004. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. *Enzyme and Microbial Technology* 35: 81-86.
- Kim, Z. H., Kim, S. H., Lee, H. S., Lee, C. G. 2006. Enhanced production of astaxanthin by flashing light using *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 414-419.
- Lababpour, A; Keishi, H; Shimahara, K; Katsuda, T; Katoh, S. 2004. Effects of nutrient supply methods and illumination with blue light emitting diodes (LEDs) on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 98: 452-456.

- Lababpour, A., Shimahara, K., Hada, K., Kyoui, Y., Katsuda, T., Katoh, S. 2005. Fed-batch culture under illumination within blue light emitting diodes (LEDs) for astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100: 339-342.
- Laufenberg, G., Kunz, B., Nyztroem, M. 2003. Transformation of vegetable waste into value added products (A) the upgrading concept; practical implementations. *Bioresource Technology* 87: 167-198.
- Lee, P. C., Schmidt-Dannert, C. 2002. Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. *Applied Microbiology Biotechnology* 60: 1-11.
- Lim, G., Lee, S., Lee, E., Haam, S., Kim, W. 2002. Separation of astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide carbon. *Biochemical Engineering Journal* 11: 181-187.
- Liu, Y. S., Wu, J.Y., Ho, K.P. 2006. Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. *Biochemical Engineering Journal* 27: 331 – 335.
- Liu, Y. S., Wu, J. Y. 2007. Optimization of cell growth and carotenoid production of *Xanthophyllomyces dendrorhous* through statistical experiment design. *Biochemical Engineering Journal* 36: 182 – 189.
- Margalith, P. Z. Production of ketocarotenoids by microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51: 431-438.
- Massadeh, M., Yusoff, W., Omar, O., Kader, J. 2001. Synergism of cellulase enzymes in mixed culture solid substrate fermentation. *Biotechnology Letters* 23: 1771-1774.
- Mc Laughlin, J. L., Saizarbitoria, T.C., Anderson, J. E., 1985. Tres bioensayos simples para químicos de productos naturales. *Revista de la Sociedad Venezolana de Química* 18: 13-18.
- McNulty, H.P., Byun, J., Lockwood, F.S., Jacob, R.F., Mason, R.P. 2007. Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane interactions: X-ray diffraction analysis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1768: 167-174.
- Meyer, P. S., Du Preez, J. C. 1993. Effect of acetic acid on astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnology Letters* 15: 919-924.
- Miki, W. Biological function and activities of animal carotenoids. 1991. *Pure and Applied Chemistry* 63: 141-146.
- Milledge J. 2010. Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Rev Environmental Science Biotechnology* 2010:1-11
- Moren, M., Naess, T., Hamre, K. 2002. Conversion of β -carotene, canthaxanthin and astaxanthin to vitamin A in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry* 27: 71-80.

- Naguib, Y. M. A. 2000. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 48: 1150-1154.
- Ni, H., He, G., Ruan, H., Chen, Q., Chen, F. 2005. Application of derivative ratio spectrophotometry for determination of beta-carotene and astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* extract. *Journal of Zhejiang University Science*. 6: 514-522.
- Ni, H., Chen, Q., He, G., Wu, G., Yang, Y. 2008. Optimization of acidic extraction of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *Journal of Zhejiang* 9: 51-59.
- Nunes, I. L., Mercadante, A. Z. 2004. Obtenção de cristais de licopeno a partir de descarte de tomate. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 24: 440-447.
- Papp, T; Velayos, A; Bartók, T; Eslava, A.P; Vágvolgvi, C; Iturriaga, E.A. 2006. Heterologous expression of astaxanthin biosynthesis genes in *Mucor circinelloides*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69: 526-531.
- Pietta, P.G. Flavonoids as antioxidants. 2000. *Journal of Natural Products* 63: 1.035-1.042.
- Priamo, W.L., Cezaro, A.M., Ferreira, S.R.S., Oliveira, J.V. 2010. Precipitation and encapsulation of β -carotene in PHBV using carbon dioxide as anti-solvent. *Journal of Supercritical Fluids*. 54: 103–109.
- Ramírez, J., Gutierrez, H., Gschaedler, A. 2001. Optimization of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through factorial design and response surface methodology. *Journal of Biotechnology* 88: 259 – 268.
- Razavi, S.H., March, I. 2006. Effect of temperature and pH on the growth kinetics and carotenoid production by *Sporobolomyces ruberrimus* H110 using technical glycerol as carbon source. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering* 23: 59 – 64.
- Reddy, G.V. 2003. Utilization of banana waste for the production of lygnolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). *Process Biochemistry* 38: 1457-1462.
- Rice-evans, C., Miller, N.J., Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicinal Journal* 20: 933-956.
- Soares, S.E. 2002. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição* 15: 71-81.
- Shibata, A., Kiba, Y., Nobuyasu, A., Fukuzawa, K., Terada, H. 2001. Molecular characteristics of astaxanthin and β -carotene in the phospholipids monolayer and their distributions in the phospholipids bilayer. *Chemistry and Physics of Lipids* 113: 11-22.
- Shih, C. T., Hang, Y. D. 1996. Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* from Sauerkraut brine. *Lebensmittel Wissenschaft and Technology* 29: 570-572.
- Sutherland, F. C. W., Meyer, P. S., Du Preez, J. C. 1996. Transport-limited sucrose utilization and neokestose production by *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnology Letters* 18: 975-980.

Tada, M., Shiroish, M. 1982. Mechanism of photoregulated carotenogenesis in *Rhodotorula minuta* V. Photoinduction of 3-hydroxy-3-methyl Glutaryl coenzyme A reductase. *Plant & Cell Physiology* 23: 615-621.

Tada, M., Tsubouchi, M., Takimoro, H., Kimura, Y., Takagi, S. 1990. Mechanism of photoregulated carotenogenesis in *Rhodotorula minuta* III. Effect of mevinolin on photoinduced carotenogenesis. *Plant Cell Physiology* 31: 319-323.

Tinoi, J., Rakariyatham, N., Deming, R.L. 2005. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. *Process Biochemistry* 40: 2551 – 2557.

Valduga, E., Tatsch, P.O., Tiggemann, L., Treichel, H., Toniazzo, G., Zeni, J., Di Luccio, M. 2009. Produção de carotenóides: Micro-organismos como fonte de pigmentos naturais. *Química Nova*. 32: 2429-2436.

Vandenberg, L. P. S., Soccol, C. R., Pandey, A., Lebeault, J. M., 2000. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* 34: 175-178.

Verdoes, J. C; Sandmann, G, Visser, H; Diaz, M; Mossel, M; Ooyen, A. 2003. Metabolic engineering of the carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3728-3738.

Wisniewska, A., Wdomska, J., Subczynski, W. 2006. Carotenoid-membrane interactions in liposomes: effect of dipolar, monopolar, and nonpolar carotenoids. *Acta Biochimica Polonica* 55: 475-484.

Yan, D., Lu, Y., Chen, Y.-F., Wu, Q., 2011. Waste molasses alone displaces glucose based medium for microalgal fermentation towards cost-saving biodiesel production. *Bioresource of Technology* 102: 6487–6493.

Yuan, J.P., Chen, F. 2000. Purification of *trans*-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Food Chemistry Journal* 68: 443-448.

Zeb, A., Mehmood, S. 2004. Carotenoids contents from various sources and their potential health applications. *Pakistan Journal of Nutritional* 3: 191-204.

Livros:

Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology*. New York, John Wiley.

Damodaran, S., Parkin, K.L., Fennema, O.R. 2010. *Química dos Alimentos de Fennema*, 4ª ed. Porto Alegre, Artmed.

Pelczar, M., Chan, E. C. S., Krieg, N. R. 1997. *Microbiologia*, 2. ed. São Paulo: Makron Books do Brasil, São Paulo.

Capítulo em livro de Evento ou Resumo:

Tieghem, P. V. 1875. *Annales des Sciences Naturelles* 1: 5-175.

Manuais e outros:

Andrade, V.S. 2003. Otimização da produção de carotenóides a partir de fungos filamentosos (Mucorales). Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco.

Bonfim, T. M. B. 1999. Produção de astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) a partir de meios de cultura de baixo custo. Tese (Doutorado em Ciências) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Cabral, I.S.R. 2012. Extratos de algas marinhas como agentes antioxidantes e antimicrobianos e seus efeitos na qualidade de *Minced* de tilápia (*Oreochromis niloticus*). Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear, Universidade de São Paulo.

Maldonade, I.R. 2003. Produção de carotenóides por leveduras. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

Meinicke, R.M. 2008. Estudo da produção de pigmentos por *Monascus ruber* cct 3802 utilizando glicerol como substrato com cultivo submerso. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina.

Mano, C.M. 2008. Produção antioxidante promovida por astaxantina sobre Citocromo c, incorporado em vesículas e desafiado com SIN-1. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo.

Moriel, D.G. 2004. Otimização da produção de biomassa e astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma* utilizando processo descontínuo alimentado. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Paraná.

Rodriguez-Amaya, D. B. 2001. A guide to carotenoid analysis in foods. *OMNI Research*. 71 p.

Rodriguez-Amaya, D., B., Kimura, M. 2004. Harvestplus handbook for Carotenoid Analysis. *Harvestplus Technical Monograph 2. Washington DC and Cali: International Food Policy Research Institute (IFPRI) and International Center for Tropical Agriculture (CIAT)*. 58p.

Rombla, M.O; Prada, A.R; Coopat, T.S; Carracedo, G.B. 1999. *Manual dos derivados da cana-de-açúcar. Brasília: ABIPT 2-4:49-55.*

Sandi, M. P; Cuen, B, Rosalba, B. 2003. *Boletín Bimestral de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad* 46: 7-11.

Silva, C.E.V. 2008. Produção enzimática de frutooligossacarídeos (FOS) por leveduras a partir de melão de cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, 2008.

Silva, M.C. 2004. Alterações na biossíntese de carotenóides em leveduras induzidas por agentes químicos. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas.

Documentos eletrônicos:

BCC. 2011. <http://www.bccresearch.com/report/carotenoids-global-market-fod025d.html?tab=highlight&highlightKeyword=astaxanthin>>. Acesso em: 11 Abril 2012.

CALIBEX. 2008. *Astaxanthin - price finder*, 2008. Disponível em: <<http://www.calibex.com/astaxanthin/zcalibex2zB1z0--search-html>>. Acesso em: 01 Setembro 2012.