

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES PELA BACTÉRIA *Chryseobacterium* sp.
LINHAGEM KR6 UTILIZANDO FARINHA DE PENAS COMO SUBSTRATO.**

SABRINE GEMELLI

(Licenciatura em Química – PUCRS)

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do grau de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Abril, 2011.

CIP - Catalogação na Publicação

Gemelli, Sabrine
PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES PELA BACTÉRIA
Chryseobacterium sp. LINHAGEM KR6 UTILIZANDO FARINHA
DE PENAS COMO SUBSTRATO. / Sabrine Gemelli. -- 2011.
70 f.

Orientadora: Adriano Brandelli.
Coorientadora: Alessandro de Oliveira Rios.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. Extração de carotenóides. 2. Obtenção de
pigmentos carotenóides . 3. Bactéria Chryseobacterium
sp. 4. Resíduos agroindustriais como substratos . I.
Brandelli, Adriano , orient. II. Rios, Alessandro de
Oliveira, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

A minha família em especial a minha querida e superamada filha Maria Luiza que soube suportar minha angustia e esperar com sacrifícios sua gestação ser completada. Obrigada pelo apoio, paciência, coragem, força; por acreditarem em mim e sempre estarem presentes com todo seu amor.

Ao marido Marco pelo seu amor, paciência e estar sempre ao meu lado.

Ao professor Dr. Adriano Brandelli pela oportunidade, confiança e orientação.

Ao professor Dr. Alessandro de Oliveira Rios que em todos os momentos me incentivou e por sua indispensável colaboração neste trabalho.

A minha colega e amiga Silvana Silveira, pelos teus ensinamentos, pelo carinho, amizade, compreensão e paciência...por acreditar que eu era capaz! Por sua valiosa colaboração neste trabalho, Muito obrigada!!!

A professora e colega Dra. Cássia R. Nespolo por ter me indicado o caminho.

Aos meus colegas e amigos de laboratório 218 por fazerem do laboratório um lugar ótimo de se trabalhar.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pelos ensinamentos aqui adquiridos.

Aos professores e funcionários do Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos, pelo uso dos laboratórios e seus equipamentos.

Ao Jéferson Segalin, por sua contribuição na caracterização pigmentos de carotenóides.

A CAPES pela ajuda financeira nos últimos quatro meses.

PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES PELA BACTÉRIA *Chryseobacterium* sp. LINHAGEM KR6 UTILIZANDO FARINHA DE PENAS COMO SUBSTRATO¹

Autor: Sabrine Gemelli

Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli

Co-Orientador: Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios

RESUMO

A obtenção de pigmentos carotenóides a partir de microrganismos é uma alternativa com elevado potencial de aplicação biotecnológica, em virtude de possibilitar melhor controle do processo e maior produtividade. Além disso, a utilização de resíduos agroindustriais como substratos para tais cultivos possibilita a redução dos custos de produção, podendo agregar valor a subprodutos potencialmente poluentes. A bactéria *Chryseobacterium* sp. linhagem kr6 apresenta elevada capacidade de sintetizar pigmentos carotenóides. O presente trabalho teve como principal objetivo avaliar a extração dos carotenóides produzidos por *Chryseobacterium* sp. kr6, empregando farinha de penas como única fonte de carbono. As melhores condições para a produção dos carotenóides foram obtidas a 30°C, 100 rpm, durante 48 h, com 5 g/L de farinha de penas, obtendo-se 64.575 µg/g de carotenóides. A otimização das condições de extração dos pigmentos a partir da biomassa foi realizada com o auxílio das ferramentas estatísticas de planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta. As condições que proporcionaram maior extração foram aplicação de ultra-som por 30 min com solvente acetona e (1:9) g/mL de biomassa úmida. O teor médio de carotenóides obtido foi de 180.000 µg/g, com temperatura mantida a 30°C. A capacidade antioxidante dos carotenóides foi avaliada pela captura do radical DPPH[•] e produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Observou-se que o composto carotenóide apresenta atividade antioxidante por ambos os métodos. O composto de pigmentos carotenóides presentes no cultivo foi então parcialmente identificado por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), sugerindo a presença de duas moléculas pertencente ao grupo das xantofilas (carotenóides oxigenados).

1/ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia de Alimentos, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (65 p.) Abril, 2011.

PRODUCTION OF CAROTENOIDS BY *Chryseobacterium* sp. STRAIN KR6 USING FEATHER MEAL AS SUBSTRATE¹.

Autor: Sabrine Gemelli

Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli

Co-Orientador: Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios

ABSTRACT

Obtaining carotenoid pigments by microbial grown is an alternative with high potential for biotechnological application, because of the better process control and elevated productivity. Besides, the use of agro-industrial waste as substrate enables a reduction of the production cost, contributing in the treatment of potentially pollutants. The bacterium *Chryseobacterium* sp. strain kr6 shows high capacity to synthesize carotenoid pigments. The main objective of this work was to evaluate the extraction of carotenoids produced by *Chryseobacterium* sp. kr6, growing on feather meal as the sole carbon source. The best conditions for the production of the carotenoids were obtained at 30°C, 100 rpm, during 48 h, with 5 g/L of feather meal, obtaining 64.575 µg/g of carotenoids. The optimization of the pigment extraction conditions from the biomass was performed with the aid of factorial design and response surface methodology as statistical tools. The conditions that provided better extraction were ultrasound treatment for 30 min with acetone as solvent in a ratio of 1:9 (g/mL) of humid biomass. The average content of carotenoids obtained was 180,000 µg/g with temperature at 30°C. The antioxidant capacity of the carotenoids was measured by the scavenging of DPPH[•] and production of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). It was observed that the carotenoid pigments presented antioxidant activity by both methodologies. The carotenoid pigments were partially indentified by comparative thin layer chromatography (TLC), suggesting the presence of two molecules belonging to the xantophiles group (oxygenated carotenoids).

1/ Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (65 p.) Abril, 2011.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
SUMÁRIO	v
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Carotenóides	4
3.1.2 Estrutura dos carotenóides.....	6
3.1.3 A cor dos carotenóides.....	7
3.1.4 Propriedades Físicas, extração e análise.....	8
3.1.5 Carotenóides como corantes em alimentos	9
3.1.6 Carotenóides como agentes antioxidantes.....	9
3.2 Resíduos agroindustriais como substrato para produção de carotenóides.....	11
3.2.1 Resíduos da indústria avícola	12
3.4 Gênero <i>Chryseobacterium</i>	14
4 MATERIAS E MÉTODOS.....	16
4.1 Penas de frango	16
4.2 Farinha de pena	16
4.3 Microorganismos, meio de cultura e condições.....	16
4.4 Padronização do pré-inóculo para o cultivo submerso.....	17
4.5 Produção de carotenóides.....	17
4.5.1 Determinação do número de células viáveis de microrganismo nos cultivos	18
4.5.2 Varredura espectrofotométrica	18
4.6 Extração de carotenóides.....	19
4.7 Extração por diferentes solventes orgânicos.....	20

4.8 Otimização da extração dos carotenóides	20
4.9 Caracterização parcial da mistura de carotenóides	21
4.9.1 Análise por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC).....	21
4.10 Capacidade antioxidante da mistura de carotenóides.....	22
4.10.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	22
4.10.2 Capacidade antioxidante pela captura do radical DPPH [•]	23
5 RESULTADOS E DISCURSÃO.....	24
5.1 Produção de carotenóides.....	24
5.2 Extração de carotenóides.....	28
5.2.1 Extração de carotenóides por métodos físicos.....	28
5.2.2 Extração utilizando diferentes solventes.....	32
5.2.3 Otimização da extração utilizando planejamento experimental.....	36
5.3 Caracterização parcial da mistura de carotenóides.....	41
5.3.1 Análise por CCDC	41
5.4 Capacidade antioxidante da mistura de carotenóides.....	43
6 CONCLUSÕES.....	49
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
8 PERSPECTIVAS.....	51
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
10 APÊNDICES	60
APÊNDICE A: Composição centesimal do meio de cultura Ágar Farinha de Pena (AFP).....	60
APÊNDICE B – Curvas padrão para o cálculo da concentração de TBARS e do radical DPPH [•]	61
APÊNDICE C – Figuras ilustrativa da produção de carotenóides	62
APÊNDICE D – Figuras ilustrativa da extração de carotenóides	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Absorbâncias máximas de alguns carotenóides em hexano ou clorofórmio.....	7
Tabela 2: Quantidades de resíduos sólidos gerados no processamento diário de frangos.....	12
Tabela 3: Produção de carotenóides no período de 0, 24, 48 e 72h.....	25
Tabela 4: Resultado da extração de carotenóides com os solventes acetona e DMSO.....	35
Tabela 5: Níveis codificados e valores reais (entre parênteses) para um modelo fatorial completo, da otimização da extração de carotenóides.....	36
Tabela 6: Efeitos e suas interações do volume e tempo de extração sobre o rendimento da extração de carotenóides.....	38
Tabela 7: Análise da variância (ANOVA) para o modelo quadrático da extração de carotenóides.....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química β -caroteno.....	6
Figura 2: Espectrofotômetro da absorbância máxima do cultivo submerso no período de 48 horas. Varredura na faixa de 200 a 600 nm.....	27
Figura 3: Rendimento da extração de pigmentos de carotenóides utilizando diferentes técnicas de extração. Ultrasonic (□) e Agitação orbital em banho com microesferas (■).....	31
Figura 4: Gráfico comparativo com resultados obtidos para extração química realizada com diferentes solventes orgânicos e combinações destes. Coluna (□) primeira extração, coluna (■) segunda extração e coluna com linhas terceira extração.....	33
Figura 5: Superfície de resposta do rendimento de extração de carotenóides em função do volume e tempo de extração.....	40
Figura 6: Atividade antioxidante do composto de carotenóides pelo método Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	44
Figura 7: Atividade antioxidante do composto de carotenóides pelo método do radical DPPH'.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

AFP - Ágar Farinha de Pena
ANOVA - análise de variância
BHT - di-terc-butil metil fenol
CaCl₂ – Cloreto de cálcio
CCDC - Cromatografia em camada delgada comparativa
CHCl₃ – Clorofórmio
CID - *Collision induced dissociation*
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DMSO – Dimetilsulfóxido
DPPH• - 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl
ESI - Electrospray
H₂SO₄ - Ácido sulfúrico
ICTA – Instituto de Ciências e tecnologia de Alimentos
KH₂PO₄ - Dihidrogenofosfato de potássico
MDA - Malonaldeído
MeOH - Metanol
MS - Espectrometria de massas
NaCl – Cloreto de Sódio
PCA - Plate count agar
Q – Carga nominal de peptídeos
R_f - Fator de retenção
RMN - Espectroscopia de ressonância nuclear magnética
SDS - Lauril sulfato de sódio
SOD - Superóxido-dismutase
SPSS - Statistical for Social Sciences
TBA - Ácido tiobarbitúrico
TOF – Tempo de voo, do *inglês time of flight*
UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UFC - Unidades formadoras de colônias
UPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

1 INTRODUÇÃO

Carotenóides são pigmentos que ocorrem naturalmente em frutas, vegetais, plantas, algas e bactérias, sendo responsáveis pelas colorações vermelha, amarela e alaranjada destes organismos. Do ponto de vista nutricional, alguns carotenóides são precursores da vitamina A. Estes compostos precursores não são essenciais para a saúde humana, entretanto apresentam efeitos promissores como agentes terapêuticos preventivos. Estudos têm demonstrado que o consumo de compostos antioxidantes como os carotenóides reduzem o risco de doenças degenerativas, como certos tipos de câncer e doenças cardiovasculares (Rao et al., 2005).

Nos organismos fotossintéticos, os carotenóides funcionam como pigmentos secundários em absorver energia luminosa e apresentam importante papel como fotoprotetores devido à sua capacidade de inativar as espécies reativas de oxigênio formadas por exposição à luz e ao ar. Até o presente, aproximadamente 600 estruturas diferentes de carotenóides já foram caracterizadas e as suas funções permanecem sob intensa investigação (Krinsky, 1994; Britton, 1995; Fraser e Bramley, 2004).

O aumento da demanda pelos carotenóides se dá pela vasta gama de aplicações que tais compostos apresentam, dentre eles destaca-se o uso na indústria de alimentos, em cosméticos e na formulação de ração animal. Tal aumento influencia diretamente a pesquisa por novas fontes e processos alternativos para a obtenção desses compostos (Johnson e Schoeder, 1995). Uma

alternativa para a produção de carotenóides está no cultivo de microrganismos. Fungos, microalgas e algumas bactérias têm sido estudados como produtores de pigmentos.

A produção de carotenóides através do cultivo microbiano apresenta as vantagens de não sofrer efeito com variações climáticas, maior produtividade quando comparados a extração a partir de animais e vegetais, e obtenção de compostos diferenciados através da manipulação genética (Maldonado et al., 2008). No entanto, a obtenção de compostos via biotecnológica muitas vezes é inviabilizada devido ao elevado custo de produção. Por isso, é interessante o uso de substratos que permitam a redução dos custos operacionais.

No cultivo de microrganismos a utilização de subprodutos agroindustriais para a obtenção de bioprodutos com maior valor agregado é interessante. Outra questão que deve ser considerada é o desenvolvimento de tecnologias que visem à mitigação de resíduos ou aproveitamento de subprodutos gerados pelas indústrias. A indústria avícola gera, entre outros subprodutos, as penas, que atinge milhões de toneladas por ano (Williams et al., 1991). Conforme o exposto, este estudo teve como objetivo estabelecer as condições ótimas para a produção e extração dos carotenóides pela bactéria *Chryseobacterium* sp. kr6 utilizando a farinha de pena como substrato e a caracterização parcial dos carotenóides obtidos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Produção e extração de carotenóides pela bactéria *Chryseobacterium* sp. linhagem kr6 utilizando farinha de penas como substrato.

2.2 Objetivos específicos

- Produção de carotenóides pela bactéria *Chryseobacterium* sp. linhagem kr6 utilizando farinha de penas como substrato;
- Avaliar métodos físicos para a extração dos carotenóides produzidos pela bactéria *Chryseobacterium* sp. linhagem kr6;
- Otimizar as condições de extração;
- Investigar a atividade antioxidante do composto de carotenóides obtido;
- Caracterizar parcialmente o composto de carotenóides produzido nas condições ótimas estabelecidas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Carotenóides

Os carotenóides são pigmentos naturais sintetizados por plantas e microrganismos, sendo componentes essenciais dos alimentos, responsáveis pelas colorações vermelha, amarela e alaranjada (Sthal e Sies, 2003). Tais substâncias têm como função primária absorver luz durante a fotossíntese em plantas, ou ainda atuar como pigmento fotoprotetor de microrganismos. Sua estrutura química é composta por ligações duplas conjugadas, que são responsáveis por sua cor e por algumas de suas funções biológicas (Moreira e Shame, 2004). Juntamente com as vitaminas, são as substâncias mais investigadas como agentes quimiopreventivos, funcionando como antioxidantes em sistemas biológicos (Moreira e Shami, 2004). Algumas das principais fontes de carotenóides são a cenoura e abóboras (α e β -caroteno), tomates e produtos derivados, como extratos, polpa e molhos (licopeno), espinafre (luteína), laranja (β -criptoxantina) (Silva e Naves, 2001) e algumas espécies de salmão e crustáceos, que acumulam astaxantina produzidas por algas.

Alguns carotenóides, entre eles a luteína, violaxantina, neoxantina, β -caroteno, estão amplamente distribuídos na natureza, enquanto outros, como o licopeno, capsantina, bixina, existem em grandes quantidades apenas em algumas plantas.

Os carotenóides mais comumente encontrados nos vegetais são o β -caroteno (*Daucus carota* - cenoura), licopeno (*Lycopersicon esculentum* – tomate), e várias xantofilas. Astaxantina, um dos carotenóides vermelhos mais recorrentes em animais aquáticos, possui além da função de pigmentação outros aspectos benéficos como a desativação de radicais livres e de oxigênio singlete (Mião et al., 2006).

β -caroteno de *Dunaliella salina* é produzido, em escala comercial, na Austrália, Israel e Estados Unidos (Dufossé e Pinteá, 2005). Dentre as leveduras produtoras de carotenóides destacam-se *Rhodotorula*, *Phaffia rhodozyma*, *Kocuria rhizophila*, as bactérias *Flavobacterium* sp., *Lactobacillus helveticus* e o fungo *Blakeslea trispora* (Frengova et al. 1994; Kovás et al., 1999; Pasamontes et al., 1997; Tinoi et al., 2005; Liu, Wu e Ho, 2006). Muitos estudos estão direcionados a encontrar alternativas que possam induzir a síntese de carotenóides e aumentar a eficiência destes sistemas biológicos de forma que eles possam ser utilizados comercialmente (Ausich, 1997; Bhosale, 2004). São inúmeras as variáveis envolvidas nos processos biotecnológicos que podem ser manipuladas a fim de otimizar a produção destes pigmentos por microrganismos (Aksu e Eren, 2005).

Bactérias, fungos, leveduras e algas são capazes de sintetizar carotenóides de interesse industrial, mas para que a produção destes pigmentos por processos fermentativos seja industrialmente viável é necessário que os custos sejam minimizados. As microalgas *Dunaliella salina* e *Haematococcus*, o fungo *Blakeslea trispora* e a levedura *Phaffia rhopdozyma* produzem consideráveis concentrações

de carotenóides e por isso são os únicos utilizados em escala industrial (Cerdá-Olmedo, 1989, Borowitzka e Borowitzka, 1989 e López-Nieto et al., 2004).

3.1.2 Estrutura dos carotenóides

Quimicamente os carotenóides são substâncias tetraterpênicas, formadas por oito unidades de isoprenos, de tal modo que a ligação isoprênica sofre reversão na parte central da molécula, e dessa maneira os dois grupos metílicos centrais ficam separados por carbonos (Omoni e Aluko, 2005).

A estrutura do β -caroteno (Figura 1), é considerada a estrutura fundamental dos carotenóides, da qual podem ser derivadas outras estruturas por reação de hidrogenação, ciclização, oxidação ou combinação destes métodos. São também considerados carotenóides alguns compostos formados por rearranjos ou degradação do caroteno.

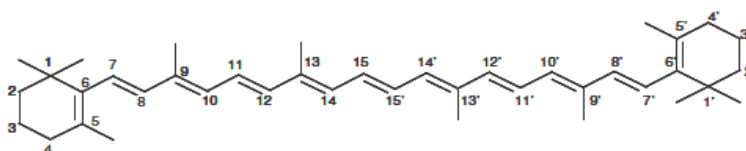


Figura 1 – Estrutura química do β -caroteno.

Cada ligação dupla pode ocorrer nas confirmações *cis* e *trans* embora na natureza sejam encontrados mais freqüentemente compostos em que todas as duplas ligações estejam na configuração *trans*.

3.1.3 A cor dos carotenóides

A cor dos carotenóides é resultado de pelo menos sete ligações duplas conjugadas e o número destas insaturações está relacionado com o aumento da tonalidade e intensidade de cor. Portanto a adição de uma dupla ligação carbono-carbono a um composto, sem outras modificações na molécula, desloca a absorvância máxima desse composto para um comprimento de onda maior (Bobbio e Bobbio, 2003). A Tabela 1 apresenta os valores dos picos do espectro eletrônico de alguns carotenóides em hexano e clorofórmio.

Tabela 1. Valores dos picos do espectro eletrônico de alguns carotenóides em hexano ou clorofórmio. Adaptado de Omoni e Aluko, 2005.

Composto	λ max (nm)	Solvente
Auroxantina	380, 400, 425	(hexano)
Bixina	443, 470, 502	(clorofórmio)
Cantaxantina	467	(hexano)
Capsantina	475, 507	(hexano)
α -caroteno	420, 442, 472	(hexano)
β -caroteno	425, 450, 477	(hexano)
β -caroteno-5,6,5',6'- diepóxido	417, 440, 468	(hexano)
β -caroteno- 5,6-epóxido	423, 444, 473	(hexano)
α -caroteno	437, 462, 492	(hexano)
Crocetina	400, 420, 445	(hexano)
α -criptoxantina	421, 446, 475	(hexano)
β -criptoxantina	425, 446, 475	(hexano)
Flucoxantina	427, 450, 476	(hexano)
Luteína	420, 445, 475	(hexano)
Licopeno	448, 473, 504	(hexano)
Neoxantina	415, 435, 462	(hexano)
Violaxantina	443, 472	(hexano)
Zeaxantina	426, 450, 480	(hexano)

3.1.4 Propriedades físicas, extração e análise

Os carotenóides (carotenos e xantofilas oxigenadas) são compostos lipofílicos, portanto, solúveis em óleos e solventes orgânicos. A maioria dos carotenóides são termolábeis, principalmente as xantofilas. A luz solar direta ou luz ultravioleta podem causar a fotoisomerização *cis-trans*, podendo inclusive, em condições mais energéticas, causar a decomposição desses pigmentos. Tais compostos são facilmente oxidados por peróxidos e mesmo pelo oxigênio do ar, dependendo da luz, calor e presença de pró-oxidantes. Dependendo do sistema, os carotenóides podem agir como pró-oxidantes ou antioxidantes.

Devido à natureza complexa e a diversidade de carotenóides presentes nas plantas às técnicas cromatográficas são as mais adequadas quando se deseja separá-los (Schwartz, 1994). Os procedimentos de extração separação de carotenóides a partir de tecidos utilizam solventes orgânicos, que têm a função de abrir a matriz hidrofílica, disponibilizando os carotenóides. Além dos solventes orgânicos ou até mesmo mistura destes solventes, é necessário em grande parte à utilização de tratamentos especiais para alcançar uma separação satisfatória de carotenóides.

3.1.5 Carotenóides como corantes em alimentos

Extratos naturais contendo carotenóides extraídos de urucum, açafreão, páprica, tomate têm sido utilizado como corantes em alimentos. No entanto, a quantidade de destes pigmentos existentes na natureza está longe de suprir a demanda industrial, a fim de serem utilizados para substituir os corantes sintéticos, que muitas vezes podem ter ação tóxica em alimentos. Vários carotenóides de estrutura química idêntica aos produtos naturais foram sintetizados nos últimos anos, e obtidos na forma pura. São eles β -caroteno, zeaxantina, cantaxantina e astaxantina (Bobbio e Bobbio, 2003).

3.1.6 Carotenóides como agentes antioxidantes

Atualmente existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo. A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. De acordo com Halliwell (2000):

“Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”.

O sistema de defesa antioxidante é formado por compostos enzimáticos e não-enzimáticos, estando presentes tanto no organismo (localizados dentro das células ou na circulação sanguínea) como nos alimentos ingeridos (Montero, 1996).

Dos componentes não-enzimáticos da defesa antioxidante destacam-se alguns minerais (cobre, manganês, zinco, selênio e ferro), vitaminas (ácido ascórbico, vitamina E, vitamina A), carotenóides (β -caroteno, licopeno e luteína), bioflavonóides (genisteína, quercetina) e taninos (catequinas) (Papas, 1999).

Os antioxidantes naturais não são tão eficientes na desativação de radicais livres, quanto os sintéticos como o BHT (di-terc-butil metil fenol) segundo Raymundo et al. (2004), o que reafirma a necessidade da constante busca por antioxidantes naturais mais efetivos, especialmente para fins industriais.

Os carotenóides reagem com os radicais livres, notavelmente, com o radical peróxido e com o oxigênio molecular, sendo à base de sua ação antioxidante. Carotenóides como o β -caroteno, licopeno, zeaxantina e luteína, exercem funções antioxidantes em fases lipídicas, bloqueando os radicais livres que danificam as membranas lipoprotéicas (Sies e Stahl, 1995).

Os carotenóides formam um tipo incomum de agentes redutores biológicos, pois reduzem melhor os produtos de oxidação a baixos níveis de oxigênio. Altos níveis de oxigênio levam à destruição dos carotenóides. Os carotenóides agem *in vivo* como desativadores do oxigênio singlete ou como seqüestradores dos

radicais peroxila, reduzindo a oxidação do DNA e lipídios, que está associada a doenças degenerativas, como câncer e doenças cardíacas (Burri, 1997).

A ação seqüestrante de radicais é proporcional ao número de ligações duplas conjugadas, presentes nas moléculas dos carotenóides. O mecanismo pelo qual os carotenóides protegem os sistemas biológicos dos radicais depende da transferência de energia do oxigênio excitado para a molécula do carotenóide, em que a energia é dissipada por meio de rotações e vibrações da molécula do carotenóide no meio solvente (Sies e Stahl, 1995).

3.2 Resíduos agroindustriais como substrato para produção de carotenóides

O Brasil vem passando por transformações significativas que se aumentaram no final do século passado. Cada vez mais existe a necessidade de utilizar matérias primas renováveis, bem como destinar um uso adequado para a utilização de resíduos agroindustriais. Grandes quantidades destes recursos renováveis possuem matéria prima de baixo custo para o processo. Por sua vez, para não entrarem em processo de decomposição, precisam ter um destino adequado, que não polua o meio ambiente e que esteja de acordo com a legislação que regula o destino final desses resíduos agroindustriais.

Dentre os estudos realizados no setor, Pedrozo e Francisco (2004) destacam que a avicultura, atualmente, é um setor da economia brasileira de suma importância por gerar um expressivo número de empregos. Os autores mencionam que apenas no Estado do Rio Grande do Sul o setor é responsável por 820 mil empregos diretos e indiretos, contando com oito mil produtores

integrados, que se classificam em mini e pequenos produtores, com uma média de 10 ha por propriedade.

3.2.1 Resíduos da indústria avícola

Dentre os diferentes resíduos sólidos gerados diariamente na indústria avícola destacam-se as penas, que representam 5 a 7% do peso corpóreo do animal conforme mostrado na Tabela 2. O volume de produção de penas de frangos no mundo atinge milhões de toneladas por ano (Williams et al., 1991). O acúmulo destes resíduos agroindustriais gera implicações ambientais, devido à contaminação de solos ou nascentes de rios. Alguns trabalhos têm relatado a importância da busca de processos alternativos para o tratamento dos resíduos gerados durante o processamento de frangos, em especial as penas (Onifade et al., 1998; Bertsch e Coello, 2005).

Tabela 2: Quantidades de resíduos sólidos gerados no processamento diário de frangos no Brasil. Adaptado Padilha et al., 2006.

Tipo	Quantidades (kg)
Penas	18.500
Vísceras cruas	26.000
Cabeças	7.000
Pés	1.500
Peles	1.500
Gorduras	300
Ossos	6.000
Resíduos de cama de aviário	1.000
Restos de carcaças (resíduos)	18.200

A utilização do produto gerado a partir do tratamento enzimático das penas não se resume apenas na produção de ração animal, mas também possibilidades de uso como fertilizantes, filmes biodegradáveis, peptídeos e aminoácidos de elevado valor agregado, entre outros (Brandelli et al., 2010).

Considerando o custo termo-energético do tratamento convencional dado as penas de frango e a limitada melhora nutricional que este processo oferece, a investigação de tecnologias alternativas que visem a bioconversão desse substrato queratinoso através de processos não poluentes torna-se justificável (Kim et al., 2001; Riffel et al., 2003). O constituinte principal das penas é a queratina, uma proteína estrutural, que em virtude da sua estrutura e da grande quantidade de aminoácidos sulfurados, é insolúvel e de difícil digestão por humanos e animais.

Atualmente as enzimas proteolíticas têm despertado interesse dos pesquisadores devido a sua poderosa ação sobre a queratina. As queratinases desempenham um importante papel nos processos biotecnológicos envolvendo a bioconversão de resíduos contendo queratina, entre eles os da indústria de frango e couro e no tratamento de efluentes. Várias espécies de microrganismos têm sido citadas por produzirem enzimas queratinolíticas, entre elas estão as bactérias do gênero *Bacillus* (Williams et al., 1991), *Streptomyces* (Letourneau et al., 1998) e os fungos *Doratomyces microsporus* e *Aspergillus oryzae* (Farag e Hassan, 2004).

3.4 Gênero *Chryseobacterium*

O gênero *Chryseobacterium* possui 12 espécies e foi criado para acomodar algumas espécies do gênero *Flavobacterium*. Este gênero de bactérias apresenta-se na forma de bastonetes Gram-negativos, não móveis, não formadoras de esporos, colônias de forma circular, bordos inteiros, translúcidas, consistência mucóide, superfície lisa e pigmentação amarelada.

Normalmente as células possuem 0,5 um de largura e 1-3 um de comprimento, são aeróbias e quimiorganotróficas. Todas as cepas crescem a 30°C, a maioria das cepas cresce a 37°C. O crescimento em meios sólidos é normalmente pigmentado (amarela-laranja), positivo para catalase, oxidase, e atividades de fosfatase. Vários carboidratos, incluindo glicerol e trealose, são oxidados (Vandamme et al., 1994).

A bactéria *Chryseobacterium* sp. linhagem kr6 utilizada neste estudo foi isolada a partir de resíduos produzidos pelo processamento comercial de frangos (Riffel et al., 2003). De acordo com os testes realizados pelos autores e caracterizada segundo o Manual de Bergey's de Bacteriologia Sistemática (Holmes et al., 1984), o microrganismo foi classificado como sendo uma linhagem de *Flavobacterium* sp., hoje pertencente ao gênero *Chryseobacterium* sp.

A linhagem queratinolítica *Chryseobacterium* sp. kr6, possui grande atrativo comercial, pois apresenta elevada produção de queratinases extracelulares, demonstrando potencial para bioconversão de substratos constituídos por queratina (Silveira et al., 2008).

Resultados neste estudo mostram que a bactéria *Chryseobacterium* sp. linhagem Kr6 é capaz de sintetizar carotenóides quando submetida ao crescimento em meio de cultivo contendo substratos agroindustriais como fonte de carbono.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Penas de frango

As penas de frango utilizadas como componente de meio de cultura foram cedidas pela empresa Avipal (RS, Brasil). As mesmas foram submetidas à lavagem em água corrente para a retirada de impurezas como unhas, sangue e resto de pele.

4.2 Farinha de pena

A farinha de pena utilizada como substrato para produção de pigmentos de carotenóides como meio de cultura foi obtida a partir do processamento e cocção sob pressão e moagem na empresa Santista (RS, Brasil) e fornecida em lote de 20 Kg ao Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do ICTA - UFGRS.

4.3 Microorganismos, meio de cultura e condições

A bactéria *Chryseobacterium* sp. linhagem kr6 foi isolada a partir de resíduos produzidos pelo processamento de frangos (Riffel et al., 2003), a mesma pertence à coleção do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do ICTA - UFGRS. A cultura bacteriana foi propagada e mantida em ágar triptona de soja (Accumedia, Baltimore, MD) em placas a 30°C e repicadas em intervalos semanais. O meio base utilizado para o crescimento do microorganismo que degrada pena foi caldo de meio mínimo mineral com farinha de penas:

NaCl (0,5 g/L), KH_2PO_4 (0,4 g/L), CaCl_2 (0,015 g/L) e farinha de penas (5 g/L). O pH foi ajustado para 8,0, o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 min.

4.4 Padronização do pré-inóculo para o cultivo submerso

O pré-inóculo para a produção de carotenóides foi preparado inoculando a bactéria em placas de AFP por 24 horas a 37°C. Após esse tempo, algumas colônias foram suspensas em solução salina estéril até atingirem uma leitura de absorvância de 0,5 em espectrofotômetro (600 nm). O meio de cultura foi inoculado com 1 mL do pré-inóculo com absorvância de 0,5 (600 nm) para cada 50 mL de meio de cultura.

4.5 Produção de carotenóides

A produção de carotenóides foi conduzida em frasco Erlenmeyer de 250 mL (50 mL volume de trabalho), incubadas em um agitador orbital a 30°C e 100 rpm. Nos respectivos tempos 0, 24, 48 e 72 h, as amostras do cultivo foram centrifugadas a 4°C e 10.000 x g por 20 min para obter a massa celular úmida contendo os carotenóides. A biomassa úmida foi recolhida e lavada por duas vezes com água destilada, em seguida utilizada para extração.

4.5.1 Determinação do número de células viáveis de microrganismo nos cultivos

Foi utilizado o método da diluição seriada para determinar o número de unidades arbitrárias por mL (UFC/mL) nos tempos de cultivo 0, 24, 48 e 72h. Alíquotas de 100 μ L do cultivo foram coletadas e diluídas de 10^0 a 10^{10} em tubo estéril contendo 900 μ L de solução salina 0,85%. Após homogeneização em vortex foram aplicadas três alíquotas de 10 μ L em placa de Petri estéril com Plate Count Agar (PCA), as mesmas foram incubadas em estufa a 30°C por 24 horas. Realizou-se a contagem na diluição com o número de colônias entre 15 a 100. O número de colônias contadas foi multiplicado pela recíproca da diluição e o resultado expresso como unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

4.5.2 Varredura espectrofotométrica

Visando determinar o comprimento de onda de máxima absorção do extrato rico em carotenóides, realizou-se uma varredura na faixa de comprimento de onda de 200 a 600 nm. O extrato utilizado para a varredura espectrofotométrica foi obtido após cultivo conforme descrito nos itens 4.5 e 4.6. O espectro eletrônico foi obtido no equipamento da marca Shimadzu-UV-mini 1240, com intervalos de 5 nm, tendo o solvente puro como branco.

4.6 Extração de carotenóides

As melhores condições de extração dos carotenóides foram investigadas comparando-se o método de ultrassonicação e agitação orbital, em diferentes intervalos de tempo (10, 20, 30, 60 e 90 min).

Para a extração pelo método de ultrassonicação, manteve-se uma potência fixa de 500 W, relação de biomassa: solvente de 3:1, 28°C. Após cada intervalo, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g, por 5 min, coletando-se o sobrenadante rico em extrato de carotenóides.

Para a extração utilizando agitação orbital na presença de pérolas de vidro ($\phi = 2$ mm), manteve-se uma relação de biomassa: solvente de 6:1, uma velocidade de 100 rpm, em banho-maria a 28°C, em Erlenmeyer de 250 mL. Após cada intervalo, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g, por 5 min, coletando-se o sobrenadante rico em extrato de carotenóides.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Foram considerados diferentes aqueles resultados que apresentaram uma diferença significativa em um intervalo de confiança de 95%.

O rendimento de carotenóides foi expresso conforme equação 1 (Zhenxin, et al. (2008)):

$$\text{Carotenóides Totais } (\mu\text{g/g biomassa úmida}) = \frac{1000\text{ADV}}{0,16\text{W}}$$

$$0,16\text{W}$$

Sendo:

A = valor da absorbância a 450 nm

D = fator de diluição

V = volume do solvente

0,16 = coeficiente de extinção de carotenóides

W = é a massa da amostra

4.7 Extração por diferentes solventes orgânicos

Cinco solventes foram avaliados quanto a sua capacidade de solubilizar uma maior quantidade dos carotenóides produzidos pela bactéria *Chryseobacterium* sp. linhagem kr6. Os solventes foram: acetona, clorofórmio, DMSO, éter de petróleo e hexano.

A extração dos carotenóides ocorreu conforme descrito no item 4.6 utilizando o método de ultrassonicação, realizando-se leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de máxima absorção.

4.8 Otimização da extração dos carotenóides

A otimização das condições de extração foi realizada com o auxílio das ferramentas estatísticas de planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta. Foram estabelecidos dois fatores ou variáveis independentes (relação biomassa:solvente e tempo de extração) e uma resposta ou variável dependente (rendimento dos carotenóides). Os resultados obtidos foram analisados com o

auxílio do programa estatístico *Statistica 7.0* (Statsoft Inc., U.S.A.).

4. 9 Caracterização parcial da mistura de carotenóides

4.9.1 Análise por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)

A separação dos compostos constituintes da mistura de carotenóides foi realizada por cromatografia em camada delgada comparativa em sílica gel. Numa primeira etapa a amostra obtida por extração conforme descrito no item 4.6.1 foi colocada em evaporador rotativo a 30°C para evaporação de todo o solvente. A CCDC foi desenvolvida em escala analítica utilizando cuba de vidro e sílica gel 60, leito 0,20 mm com indicador de fluorescência UV 254 (Merck - ALUGRAM @ SIL G/UV 254) como fase estacionária. Na placa de sílica gel (4 cm x 10 cm), a amostra foi aplicada aproximadamente 1 cm da base inferior da placa, com ajuda de um capilar. Após a aplicação da amostra sobre a placa, a mesma foi colocada 10 min no escuro e em seguida introduzida na cuba contendo como eluentes hexano-acetato de etila (4:1) e clorofórmio-metanol (4,5:0,5) dos respectivos solventes orgânicos. A placa foi colocada na cuba até que o solvente, por capilaridade, atingisse aproximadamente 0,5 cm da extremidade superior. Após desenvolvimento, calculou-se os valores de R_f , para em seguida submeter a placa a vapores de H_2SO_4 concentrado em um cuba de saturação, visando detectar a presença de carotenóides.

4.10 Capacidade antioxidante da mistura de carotenóides

Devido à enorme preocupação com a ação dos antioxidantes e a sua relação com os radicais livres se tornou essencial a busca de novas fontes de antioxidantes. A capacidade antioxidante da mistura de carotenóides produzidos pela bactéria *Chryseobacterium* sp. linhagem Kr6 foi avaliada e medida por dois métodos.

4.10.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A reação ao ácido tiobarbitúrico foi realizada de acordo com a metodologia de Ohkawa et al. (1979). Tubos de ensaio contendo água Milli-Q, azeite extravirgem de oliva foram submetidas à oxidação com 100 mM de sulfato ferroso e incubadas em banho-maria a 80°C, por 10 min. Posteriormente, foi adicionado à amostra composta pelo pigmento de carotenóides, 81 mg mL⁻¹ lauril sulfato de sódio (SDS), tampão de ácido acético pH 3,44 e 6 mg mL⁻¹ de ácido tiobarbitúrico (TBA). A mistura de reação foi ainda incubada em banho-maria a 100°C por 1 hora. Para comparações foram realizados três controles, controle padrão sem amostra, controle padrão só com o solvente puro e o branco. A absorbância da mistura foi determinada pela medida em espectrofotômetro a 532 nm.

A concentração de TBARS foi calculada utilizando uma curva padrão desenvolvida com concentrações conhecidas de 1,1,3,3- tetrametoxipropano e os resultados foram expressos em nmol de malonaldeído (MDA)/mL de amostra. O padrão foi de 0,03 mmol/L MDA, SDS 8,1%, tampão de ácido acético pH 3,44 e

0,6% TBA em água destilada e incubada em banho-maria a 100 ° C por 1 hora. O experimento foi realizado em triplicata.

4.10.2 Capacidade antioxidante pela captura do radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrylhydrazyl)

O método do radical DPPH[•] utilizado foi descrito por Brand-Williams et al. (1995) com algumas modificações, baseada na captura do radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrylhydrazyl) para os antioxidantes, produzindo uma diminuição na absorbância a 515 nm. Foi usada uma concentração de 60 mol/L do radical DPPH[•], dissolvido em álcool metílico. A solução foi homogeneizada e transferida para um frasco de vidro escuro. A solução preparada foi utilizada apenas no dia da análise. No escuro, alíquotas de 0,1 mL de amostra do extrato de carotenóides foram transferidas para tubos de ensaio com 3,9 mL de radical DPPH[•] (60 mol/L de solução de DPPH[•]) e homogeneizado por agitação. Como branco foi utilizado álcool metílico. A concentração do radical DPPH[•] foi determinada com curva padrão do radical DPPH[•] no intervalo de 0-60 mol L⁻¹ e os resultados foram expressos uM de DPPH/mL de amostra que é a concentração de antioxidantes mínima necessária para reduzir 50% do radical DPPH[•] inicial da reação a partir do momento do extrato atingido a estabilidade. O experimento foi realizado em triplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção de carotenóides

Muitos estudos estão sendo direcionados a encontrar alternativas que possam induzir a síntese de carotenóides e aumentar a eficiência destes sistemas biológicos de forma que eles possam ser utilizados comercialmente (Ausich, 1997; Bhosale, 2004).

Neste estudo, observou-se que a bactéria *Chryseobacterium* sp. linhagem kr6 foi capaz de se desenvolver, bem como sintetizar carotenóides em meio de cultivo contendo farinha de pena como única fonte de carbono.

A produção de carotenóides totais, acompanhada durante os intervalos de 0, 24, 48 e 72 h de cultivo submerso, apresentou associação ao crescimento celular. A máxima concentração de pigmentos carotenóides ocorreu no momento em que o crescimento celular se encontrava na fase estacionária, observando-se a seguir um declínio na produção desses carotenóides. A Tabela 3 ilustra o acompanhamento do crescimento celular, bem como da produção de carotenóides ao longo do tempo.

Tabela 3. Produção de carotenóides no período de 0, 24, 48 e 72h.

Índice	Tempo	0	24	48	72
Absorbância 450 nm		0,105	1,172	1,722	1,284
UFC/mL		3,0x10 ⁵	3,7x10 ⁵	8,7x10 ⁵	1,4x10 ⁵
Rendimento de carotenóides (ug/g)		19.687	43.950	64.575	48.150

O melhor rendimento foi observado em 48h de cultivo e o nível de significância ($p < 0,05$) do teste de Tukey foi nos períodos anteriores e posterior do cultivo.

O período em que se observou maior produção de carotenóides foi após 48 h de cultivo, obtendo-se um rendimento de carotenóides de 64.575 ug/g. Tal rendimento diferiu significativamente ($p < 0,05$) do rendimento obtido nos períodos anterior e posterior do cultivo.

Tinoi et al., (2005) também verificaram que a produção de carotenóides por *Rhodotorula glutinis* em meio contendo resíduos agroindustriais (bagaço de cana) foi paralela ao crescimento celular, porém a produção máxima de células (10,3 g/L) e a concentração máxima de pigmentos de carotenóides (3,5 mg/L) ocorreram simultaneamente.

O rendimento de carotenóides totais foi expresso conforme equação descrita no item 4.6 (Zhenxin, et al. 2008). Utilizou-se biomassa úmida para estimar a concentração de carotenóides total, devido a presença de resíduos de queratina associados na biomassa produzida. A queratina que não foi totalmente degradada pela bactéria forma um biofilme com a biomassa produzida quando seca a vácuo a baixa temperatura, tornando assim a separação dos carotenóides inviável por sua complexidade.

A biomassa rica em carotenóides produzida pela bactéria *Chryseobacterium* sp. kr6 foi solubilizada em volume reduzido de acetona e submetida a varredura espectrofotométrica na faixa de 200 a 600 nm. O espectro eletrônico obtido está ilustrado na (Figura 2).

Observa-se um pico máximo na região de 200 nm característico de grupo aromático. Outro pico de absorção ocorre por volta do comprimento onda de 450 nm, sendo este comprimento típico dos pigmentos carotenóides. Este comprimento é característico do beta-caroteno, fucoxantina e zeaxantina extraído em hexano ou clorofórmio (Omoni e Aluko, 2005).

Os espectros de absorção dos carotenóides têm um perfil característico entre 400 e 500 nm, com λ_{max} por volta de 450 nm e normalmente duas bandas menos intensas de cada lado. A posição exata dos máximos de absorção varia de carotenóide para carotenóide e é suficientemente diferente para a identificação de cada carotenóide (Zeraik e Yariwake, 2008). Neste estudo verificou-se maior absorbância no cultivo de 48 h, com comprimento de onda 450 nm.

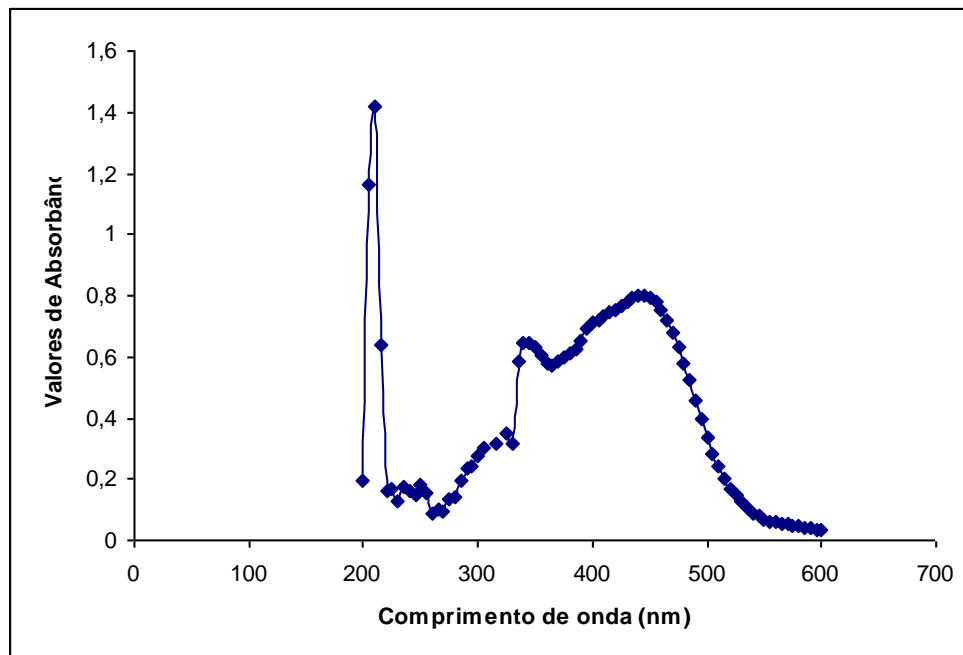


FIGURA 2: Espectro eletrônico do extrato de carotenóides, em acetona, no intervalo de 200 a 600 nm.

Alguns parâmetros físico-químicos, tais como o efeito da luz, temperatura, pH e oxidação, devem ser levados em consideração na bioprodução para não ocorrer degradação dos carotenóides. Neste estudo a temperatura foi fixada em 30°C, pois nos ensaios conduzidos nesta condição ocorreu grande produção de carotenóides totais e o processo seria prejudicado em relação aos custos de produção se a temperatura tivesse que ser menor que a temperatura ambiente. Aksu e Eren (2005) observaram que temperaturas superiores a 30°C resultavam na diminuição da produção de carotenóides e no crescimento celular.

Conforme citado por Uenojo et al. (2007), o beta-caroteno sofre rápida degradação sob efeito da luz, portanto experimentos conduzidos em temperatura ambiente e na ausência da luz, a velocidade de degradação dos carotenóides

torna-se muito mais lenta. Porém na medida em que há aumento na temperatura, há também um aumento na velocidade de degradação.

Assim como a temperatura, o pH é um parâmetro a ser observado para a produção de carotenóides, visto que ocorre um aumento do pH do meio de cultivo quando se utiliza farinha de pena para crescimento da linhagem kr6 (Riffel et AL. 2003). Neste estudo o pH se manteve aproximadamente constante e igual a 8,0 a 8,5. Possivelmente, isto esteja relacionado à proteólise efetuada pelo microrganismo, fenômeno natural que ocorre quando a linhagem não utiliza outra fonte de carbono. Como consequência da degradação de aminoácidos, há formação de amônia e esta pode ser responsável pela elevação no pH (Valduga, 2005).

5.2 Extração dos pigmentos de carotenóides

5.2.1 Extração dos pigmentos de carotenóides por métodos físicos

A produção industrial de carotenóides naturais através do cultivo microbiano já está estabelecida e em expansão. O processo de extração é altamente limitado pelo custo elevado de produção, devido este fato à recuperação eficiente para liberação de carotenóides intracelulares tem atraído considerável atenção nos últimos tempos (Park et al., 2007).

O rompimento das células microbianas é feito através de técnicas mecânicas, como alta pressão, homogeneização e moagem com esferas. Os

métodos de rompimento celular podem ser classificados como: mecânicos (choque osmótico, congelamento e descongelamento, secagem), químicos (álcalis, solventes, detergentes e ácidos) e enzimáticos (lise enzimática ou inibição da síntese da parede celular) (Schutte e Kula, 1990).

Para se definir o processo de rompimento a ser empregado, alguns fatores são levados em consideração, como: rendimento, especificidade, necessidade de controle de temperatura, custo de operação unitária e capital investido (Schutte e Kula, 1990; Wheelwright, 1991).

Neste estudo dois métodos de extração de carotenóides produzidos pela bactéria *Chryseobacterium* sp. linhagem kr6 foram comparados, método de ultrassonicação e agitação orbital, em diferentes intervalos de tempo (10, 20, 30, 60 e 90 min). Verificou-se que o método de ultrassonicação é mais eficaz para extração dos carotenóides. O rendimento de carotenóides pela ultrassonicação foi 95.175 µg/ g, enquanto o rendimento de carotenóides pelo método de agitação mecânica com microesferas foi de 75.037 µg/g, ambos os métodos o maior rendimento foi verificado em 30 min de extração (Figura 4).

Comportamento semelhante ao obtido no presente estudo foi verificado por Zhenxin et al. (2008) onde a concentração de carotenóides totais por *Rhodobacter sphaeroides* usando também o método ultrassonicação para extração foi 46.50 µg/g.

Vários estudos têm sido reportados sobre a eficiência da ultrassonicação. Está oferece uma série de vantagens que fazem dela o método ideal para analisar um grande número de amostras. Isto inclui alta eficiência de extração, baixo custo

do equipamento e fácil operação, pouco ou nenhum preparo da amostra, baixa temperatura de extração e capacidade de processar várias amostras simultaneamente (Banjoo e Nelson, 2005).

Sabe-se também do potencial da ultrassonicação para aplicação industrial, na indústria fito-farmacêuticos para extração de grande variedade de extratos de ervas (Vilkhu et al., 2007). A ultrassonicação permitir a utilização de solventes alternativos que podem ser mais atraentes economicamente, ambientalmente e agrega benefícios de segurança a saúde.

Balachandran et al. (2006) foram capazes de demonstrar que a eficácia da ultrassonicação é adquirida pelo aumento da transferência de massa superficial e que a eficácia declinou acentuadamente após o soluto ser totalmente removido. O que foi verificado também neste estudo após 30 min de extração, conforme a Figura 3. No entanto, através da redução do tamanho das partículas do substrato (células microbianas) para liberação de carotenóides importantes ganhos de eficiência de extração e redução de tempo de extração foi alcançado.

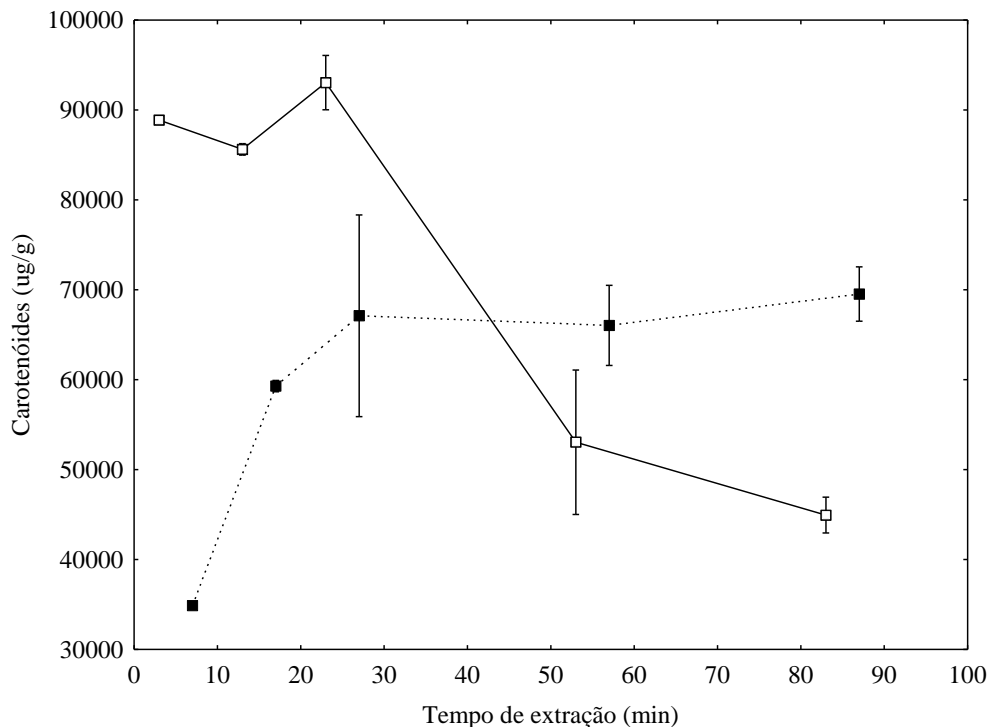


Figura 3: Rendimento da extração de pigmentos de carotenóides utilizando diferentes técnicas de extração. Ultrassonicação (□) e Agitação Orbital com microesferas (■).

O baixo rendimento de carotenóides utilizando agitação mecânica com microesferas pode ser devido à ineficiência do rompimento da parede celular microbiana, impedindo solubilização dos extratos de carotenóides no solvente. Há diferentes estruturas de paredes celulares, as células animais, por exemplo, possuem membranas frágeis e fáceis de serem rompidas, enquanto que as bactérias, leveduras e outras formas de fungos possuem paredes rígidas e que exigem elevadas tensões de cisalhamento para serem rompidas (Wheelwright, 1991).

5.2.2 Extração utilizando diferentes solventes

A escolha dos melhores solventes para extração de carotenóides depende da amostra analisada, do seu processamento e da decomposição de carotenóides. Solventes orgânicos miscíveis com água, como acetona, normalmente são empregados na extração de amostras frescas, enquanto que amostras secas ou liofilizadas podem ser extraídas com solventes imiscíveis com água, acetato de etila ou éter etílico (Mercadante et al., 1999).

Durante a extração e análise dos carotenóides os artefatos mais comumente encontrados são os isômeros geométricos formados em solução por estereoisomerização, a qual é promovida pela exposição ao calor, luz, ácidos entre outros, sendo que os carotenóides mais susceptíveis a este processo são os de cadeia alifática. A extração cuidadosa e rápida, na ausência de luz, e a baixa temperatura podem prevenir isomerizações indesejadas (Scheidt & Liaaen-Jensen, 1995).

Este trabalho investigou a extração química de carotenóides produzido pela bactéria *Chryseobacterium* sp. linhagem Kr6. Numa primeira etapa foram realizadas análises preliminares de cinco solventes: acetona, clorofórmio, DMSO, éter de petróleo e hexano, conforme a Figura 4. Os carotenóides se acumulam em lipídeos e podem, portanto serem extraídos com uma variedade de solventes orgânicos tais como acetona, éter de petróleo, hexano, DMSO, metanol, éter etílico, clorofórmio (Park et al., 2007). Alguns desses solventes foram testados visando verificar a capacidade destes em isolar carotenóides de células microbiana em uma série de investigações anteriores (Mendes-Pinto et al., 2001 e

An & Choi, 2003).

A maioria dos estudos se concentra em recuperação de carotenóides utilizando um único solvente. Uma área de estudo que tem recebido pouca atenção de investigação é a extração de carotenóides por misturas de solventes.

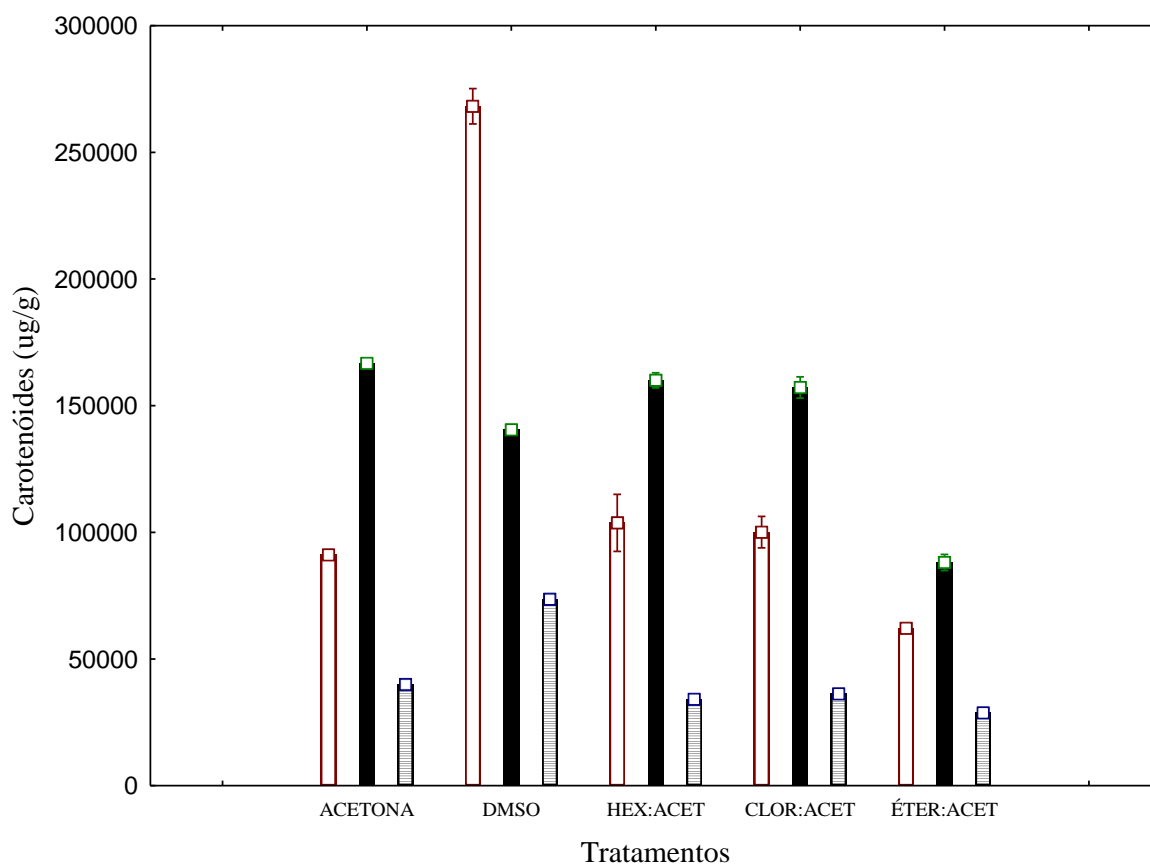


Figura 4: Resultados obtidos para extração química realizada com diferentes solventes orgânicos e combinações destes. Coluna (□) primeira extração, coluna (■) segunda extração e coluna com linhas terceira extração.

A Figura 4 ilustra os resultados obtidos para acetona, hexano:acetona (1:1), clorofórmio:acetona (1:1) e éter de petróleo:acetona (1:1) corresponderam-se da mesma maneira, na segunda extração apresentou melhor rendimento dos carotenóides, sendo que a acetona prevaleceu com o maior rendimento 166.725 µg/g. A mistura de solvente é plausível, quando usadas juntas para romper as células, podem demonstrar interações sinérgicas ou não, resultando em um incremento no rendimento de carotenóides (Park et al., 2007).

Com base nos resultados da análise preliminar, o solvente DMSO apresentou uma característica distinta dos demais solventes, o DMSO apresentou rendimento de 275.175 µg/g, na primeira etapa de extração. Tal fato pode ser atribuído à solubilidade dos carotenóides no solvente ou pela eficácia no rompimento da parede celular microbiana na primeira etapa de extração. A acetona e o DMSO, por apresentarem melhor rendimento nesta etapa preliminar foram então selecionados para avaliações futuras.

Visando investigar a influência de combinação de fatores (tipo de solvente, volume de extração, número de extrações e tempo de extração) sobre o rendimento da extração, realizou experimentos com os solventes acetona e DMSO. Com base no teste de Tukey os melhores resultados para a extração dos carotenóides foram obtidas nos ensaios 7 e 3, com rendimento 137.287 µg/g e 125.362 µg/g, respectivamente. Tais valores não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$) conforme Tabela 4. Utilizou-se acetona em ambos os experimentos, bem como o mesmo volume de extração (6 mL). Todavia, no experimento 3, foram realizadas três extrações de 20 min, enquanto que no experimento 7 foram 6

extrações de 10 min.

A condição de extração que apresentou menor valor para conteúdo de carotenóides foi a realizada conforme ensaio 1, com rendimento 15.843 ug/g, sendo que este resultado difere significativamente dos demais ($p < 0,05$).

Tabela 4: Resultado da extração de carotenóides com os solventes acetona e DMSO.

Ensaio	Solvente	Volume (mL)	Extrações	Tempo (min)	Absorbância (450 nm)	Rendimento (ug/g)
1	Acetona	3	3	10	0,422	15.843 ^a
2	DMSO	3	3	20	1,532	57.450 ^b
3	Acetona	6	3	20	1,672	125.362 ^b
4	DMSO	6	3	10	1,206	90.450 ^b
5	Acetona	3	6	20	1,880	70.500 ^b
6	DMSO	3	6	10	1,627	49.706 ^b
7	Acetona	6	6	10	1,831	137.287 ^b
8	DMSO	6	6	20	1,394	104.550 ^b

* medida seguida por letras diferentes difere significativamente dos demais ($p < 0,05$).

A partir da avaliação estatística realizada com o auxílio do teste de Tukey é possível estabelecer as melhores condições para extração dos carotenóides presentes na biomassa úmida de *Chryseobacterium* sp. linhagem kr6.

5.2.3 Otimização da extração utilizando planejamento experimental

Estabelecidas as melhores condições para a produção dos carotenóides, método físico, bem como o melhor solvente, partiu-se para a etapa de otimização da extração dos carotenóides. A otimização foi realizada com o auxílio das ferramentas estatísticas de planejamento experimental e superfície de resposta. A Tabela 5 apresenta as condições experimentais de cada ensaio e os resultados obtidos para o rendimento da extração em cada um deles.

É possível estimar sobre o efeito da extração (volume do solvente e tempo de extração) frente ao rendimento dos carotenóides no desempenho do processo, variando ambos de um nível inferior (-1) para outro superior (+1) dos fatores correspondentes. Ambos os valores obtidos t e p do teste estatístico foram utilizados para confirmar a significância dos valores estudados.

O maior rendimento da extração dos carotenóides foi verificado no experimento 6 (180.000 ug/g), que foi realizado com um volume de 9,0 mL e 30 min de extração (Tabela 3). O menor rendimento da extração dos carotenóides foi verificado no ensaio 3 e 7 (22016,25 ug/ g, 22537,5 ug/g, respectivamente), porém no ensaio 3 foi realizado com um volume de 3,8 mL e 50 min de extração e no ensaio 7 foi realizado com um volume de 6,0 mL e 0 min de extração (Tabela 3).

Tabela 5: Níveis codificados e valores reais (entre parênteses) para planejamento

fatorial completo, bem como o rendimento da extração dos carotenóides³⁷ para cada ensaio.

Ensaio	X_1	X_2	Rendimento (ug/g)
1	-1 (3,8)	-1 (9)	25911,25
2	+1 (8,0)	-1 (9)	67100
3	-1 (3,8)	1 (50)	22016,25
4	+1 (8,0)	+1 (50)	48700
5	-1,41 (3,0)	0 (50)	47025
6	+1,41 (9,0)	0 (30)	180000
7	0 (6,0)	-1,41 (0)	22537,5
8	0 (6,0)	+1.41 (60)	36337,5
9	0 (6,0)	0 (30)	108525
10	0 (6,0)	0 (30)	111262,5
11	0 (6,0)	0 (30)	111712,5
12	0 (6,0)	0 (30)	105375

X_1 : volume de extração (mL); X_2 : tempo de extração (min)

Os efeitos das variáveis independentes sobre a resposta estão apresentados na Tabela 6. Como é possível observar, o tempo de extração apresentou um efeito negativo sobre o rendimento. A passagem do tempo de extração de 9 para 50 minutos promoveu uma redução no rendimento de, em média, 711 ug/g. Tal efeito pode ser atribuído em parte a degradação dos

carotenóides ao longo do tempo. Já o volume de extração proporcionou um efeito positivo sobre a resposta analisada. Ao passar o volume de extração de 3,8 mL para 8 mL obteve-se um aumento no rendimento de, em média, 64.032 ug/g. A interação entre as variáveis independentes não promoveu efeitos significativos, dentro do intervalo de confiança estabelecido.

Tabela 6: Efeitos e suas interações do volume e tempo de extração sobre o rendimento da extração dos carotenóides.

<i>Fator</i>	Efeito (ug/g)	Erro padrão	Valor-t	Valor-p
Média	109.308	1.462	74,76	<0,001 ^a
Volume (L)	64.032	2.070	30,92	<0,001 ^a
Volume (Q)	-11.020	2.321	-4,74	0,017 ^a
Tempo (L)	-711	2.070	-0,34	0,753
Tempo (Q)	-95.598	2.321	-41,18	<0,001 ^a
1x2	-7.252	2.924	-2,48	0,089

a = fator significativo para $p < 0.05$

Segundo Zhenxin, et al. (2008) se o tempo de duração é menor do que 40 min, a dissolução de carotenóides não irá atingir o equilíbrio e parte dos carotenóides permanece intracelular e quando a duração é maior do que 40 min, a

produção de carotenóides diminui ligeiramente. Tal fato pode ser atribuído ao tempo exposição dos carotenóides dissolvidos no solvente, luz e microorganismos no ambiente, levado a um aumento de chances de oxidação ou degradação dos carotenóides dissolvidos (Gang & Zora, 2001).

Visando gerar a superfície de resposta que prediga o rendimento de extração de carotenóides, realizou-se uma análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 7.

Tabela 7: Análise da variância (ANOVA) para o modelo de segunda ordem.

Fonte de variação	Soma de quadrados	de Graus liberdade	de Quadrado médio	F _{calc}
Regressão	22.869	3	7.623	15,5
Resíduo	3.941	8	492	

$F_{\text{tab}} = 4,07$

Como se observa na Tabela 7, o F_{tab} foi menor que o F_{cal} , dessa forma foi possível utilizar o modelo de segunda ordem para gerar a superfície de resposta que prediz o rendimento da extração em função das variáveis independentes avaliadas. A Figura 5 ilustra a superfície de resposta construída para o rendimento da extração dos carotenóides em função do volume e do tempo de extração.

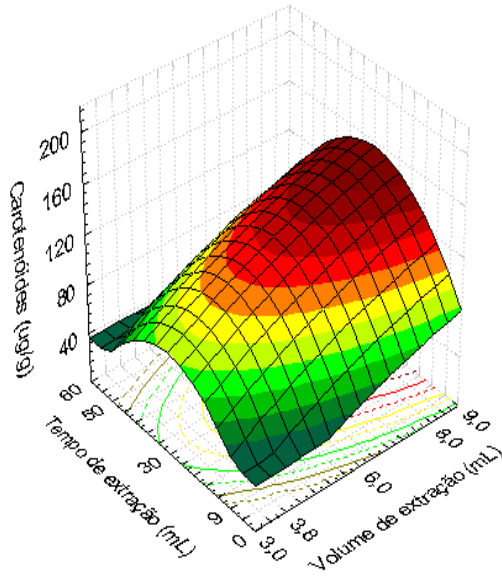


Figura 5: Superfície de resposta para o rendimento de extração (ug/g) dos pigmentos de carotenóides em função do volume e tempo de extração.

A partir da Figura 5 observa-se que os maiores rendimentos de extração de carotenóides foram obtidos com maiores volumes de solvente e com períodos de extração na faixa de 25 a 35 minutos de extração.

5.4 Caracterização parcial da mistura de carotenóides

5.4.1 Análise por CCDC

Conforme já descrito os carotenóides são pigmentos encontrados na natureza sintetizados por plantas ou microrganismos que trazem benefício à saúde. Sua estrutura química é composta por ligações duplas conjugadas, que são responsáveis por sua cor e por algumas de suas funções biológicas (Moreira e Shami, 2004).

Os carotenóides podem ser classificados de duas maneiras. A primeira considera a existência de duas grandes famílias: Os carotenos (carotenóides hidrocarbonetos) e as xantofilas (carotenóides oxigenados) (Ribeiro e Nunes, 2008).

Devido a CCDC ser um método de fácil execução, simples, versátil e de baixo custo é considerada uma técnica padrão para o acompanhamento de reações orgânicas. O parâmetro mais importante a ser considerado em CCDC é o fator de retenção (R_f), o qual é a razão entre a distância percorrida pela substância em questão e a distância percorrida pela fase móvel. Os valores ideais para R_f estão entre 0,4 e 0,6 (Degani et al. 1998).

Após extração dos carotenóides conforme descrito no item 4.6.1, realizou-se a CCDC usando como eluente hexano-acetato de etila (4:1) para a verificação da existência de constituintes menos polares na amostra, enquanto que o uso de clorofórmio-metanol (4,5:0,5) foi para eluição dos constituintes mais polares.

No primeiro cromatograma obtido observou-se que apenas uma pequena parcela do material foi eluído, resultando em uma mancha uniforme, de formato alongado, coloração amarela, com R_f de aproximadamente 0,2 e o cromatograma não apresentou mudanças de cor ao ser submetido aos vapores de H_2SO_4 concentrado. Pode-se sugerir que o composto de pigmentos de carotenóides apresenta uma maior quantidade de carotenóides mais polares.

Segundo Costa e Chaves (2004) este resultado permite deduzir que carotenóides menos polares, tipo beta-caroteno, devem estar presentes em pequenas quantidades, uma vez que não se observou manchas com características deste tipo de substâncias. Os carotenos, como o beta-caroteno, são hidrocarbonetos apolares, nos quais prevalecem interações do tipo forças de London (forças de atração entre dipolos temporários). Tais compostos também têm, pouca afinidade com a fase estacionária e maior afinidade com a fase móvel, o que não ocorreu neste cromatograma (Ribeiro e Nunes 2008).

No segundo cromatograma mostrou que grande parte do material foi eluído, originando manchas de formato alongado, coloração amarelada, distribuídas por toda a placa, ficando a zona de maior concentração com R_f de aproximadamente 0,6.

O tratamento deste cromatograma da mistura de carotenóides com vapores de H_2SO_4 concentrado resultou no desenvolvimento de uma coloração azul esverdeada, característica da presença de carotenóides (Shuhama et al., 2003). Segundo Rodriguez –Amaya (2001), ocorre mudança de cor do amarelo para azul esverdeado quando compostos são submetidos a vapores de ácidos

concentrados, significa que a mistura em análise apresenta em sua estrutura radial epóxido.

Pode-se sugerir que o extrato de carotenóides apresenta uma maior quantidade e carotenóides mais polares e com radical epóxido. As xantofilas apresentam grupos substituintes com oxigênio, como hidroxilas, grupos ceto e epóxi (Rodrigues-Amaya, 2001; Fraser & Bramley, 2004).

5.5 Capacidade antioxidante da mistura de carotenóides

Vários métodos têm sido desenvolvidos para avaliar a atividade antioxidante, incluindo a quantificação dos produtos formados durante a peroxidação lipídica resultantes da reação com o Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e o método de seqüestro de radicais livres (DPPH[•]) (Sanchez-Moreno, 1998, Frankel & Meyer 2000 e Aruoma, 2003). O primeiro está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do TBARS induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico (Vogt, 1995 e Balir, 2001).

O método de radicais livres está baseado no descoramento de uma solução composta por radicais estáveis DPPH[•] de cor violeta quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio (Larson, 1997 e Finkel, 2000). Entretanto, o primeiro método determina a atividade de uma amostra ou composto de proteger um substrato lipídico da oxidação, enquanto que o método de inibição de radicais DPPH[•] baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante.

Uma das técnicas mais utilizadas para se avaliar a oxidação de lipídeos é o teste do malondialdeído (MDA). A sua condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) forma produtos, que podem ser determinados por absorção no visível (532 nm) ou por fluorescência ($\lambda_{exc} = 515 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 553 \text{ nm}$). Consiste na medida de um cromógeno róseo formado pela reação do MDA com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico, em meio ácido e alta temperatura (Lima e Abdalla, 2001).

O termo “antioxidante” será utilizado para referir-se a ambas atividades: o efeito anti-radical (atividade de seqüestrar radicais livres) e a ação antioxidante (atividade de prevenir ou retardar a oxidação lipídica).

Neste estudo foi utilizado como substrato o azeite de oliva (monoinsaturados) e sulfato ferroso como uma pró-oxidante, uma vez que pode dividir hidroperóxidos lipídicos. A oxidação do azeite foi inibida pela adição da amostra de carotenóides, pois, uma diminuição da absorbância foi observada na Figura 6 resultante da inibição da peroxidação lipídica (atividade antioxidante). O nível de significância do teste de Tukey foi ($p < 0,05$) ou 95% de confiança.

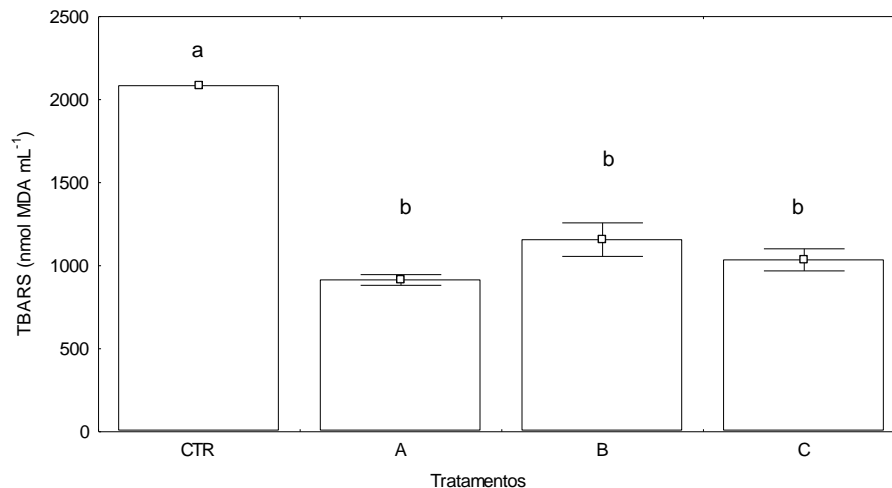


Figura 6: Atividade antioxidante do composto de pigmentos de carotenóides pelo método Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Letras iguais significam que os tratamentos não diferem significativamente em um intervalo de confiança de 95%.

Embora o método TBARS ser amplamente aceito, outros métodos para a avaliação da atividade antioxidante, como método do radical DPPH[•] pode ser usado. O resultado de seqüestro de radical livre pelo composto de pigmentos de carotenóides da amostra em estudo pelo método do DPPH está mensurado na Figura 7. O nível de significância do teste de Tukey foi ($p < 0,05$) ou 95% de confiança.

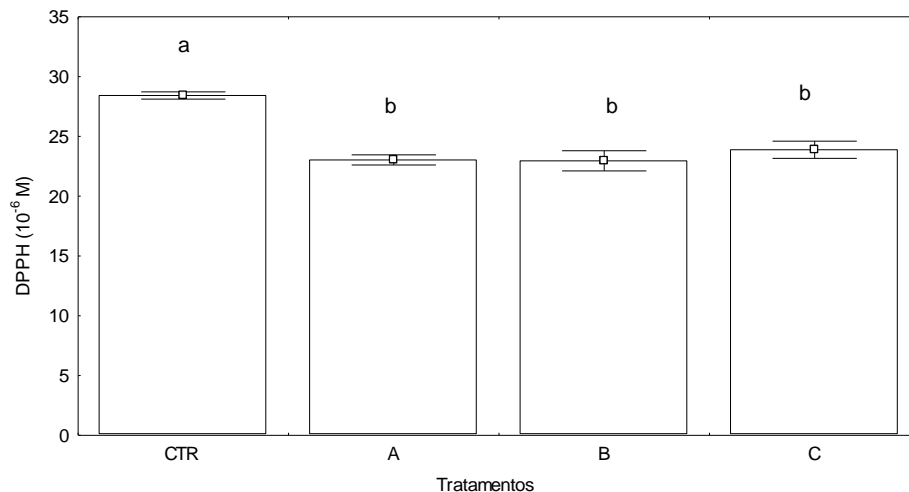


Figura 7: Atividade antioxidante do composto de pigmentos de carotenóides pelo método do radical DPPH'. Letras iguais significam que os tratamentos não diferem significativamente em um intervalo de confiança de 95%.

Os resultados deste estudo sugerem que a mistura de carotenóides apresentaram atividade antioxidante em ambos os métodos. Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, presente em baixas concentrações, quando comparada a um substrato oxidável, retarda ou inibe a oxidação desse substrato de maneira eficaz (Sies e Stahl; 1995; Aust et. al., 2001; Handelman; 2001). Porém, não existe um método universal para avaliar a atividade antioxidante. Assim, é necessário utilizar diferentes métodos para avaliar adequadamente a capacidade antioxidante (Huang, 2005).

6 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

- A bactéria *Chryseobacterium* sp. linhagem Kr6 é capaz de sintetizar carotenóides quando submetida ao crescimento em meio de cultivo contendo farinha de penas como fonte de carbono.
- Dois métodos físicos de extração de carotenóides produzidos pela bactéria *Chryseobacterium* sp. linhagem kr6 foram comparados, método de ultrassonicação e agitação orbital. Verificou-se que o método de ultrassonicação é mais eficaz para extração dos carotenóides, com rendimento de 95.175 µg/g, enquanto o rendimento de carotenóides pelo método de agitação mecânica com microesferas foi de 75.037 µg/g.
- A otimização foi desenvolvida através de planejamento experimental fatorial para extração de carotenóides constituído de extrações ultrassônica de 30 min com solvente acetona e a relação massa/ volume de (1:9). O teor médio de carotenóides obtido foi de 180.000 ug/g, com temperatura mantida a 30°C.

- Os carotenóides produzidos pela bactéria *Chryseobacterium* sp. linhagem kr6 apresentaram atividade antioxidante em ambos os métodos, quantificação dos produtos formados durante a peroxidação lipídica resultante da reação com o Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e o método de seqüestro de radicais livres (DPPH[•]), com confiança de 95%.
- A caracterização parcial dos carotenóides pela análise CCDC demonstrou que podemos sugerir que são carotenóides oxigenados do grupo das xantofilas, pois na presença de H₂SO₄ concentrado ocorreu mudança de coloração do amarelo para azul esverdeado indicando a presença do radical epóxido, que devem ser analisada e detalhada com novos experimentos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Brasil tem um ecossistema diversificado e original que pode fornecer diferentes substratos com potencial biotecnológico para produção de carotenóides. Praticamente todos os países com grau de desenvolvimento estão procurando adaptar-se a essa realidade, buscando adequar os processos produtivos no sentido de minimizar desperdícios, desenvolvendo tecnologias para reaproveitamento de recursos que até então eram ignorados.

Neste trabalho buscou-se utilizar resíduos de penas de frango para produção de carotenóides por ser um resíduo agroindustrial que não necessita de um tratamento químico para ser utilizado, fácil acondicionamento e relacionando a indústria avícola, representativa no estado do Rio Grande do Sul.

Os ensaios fermentativos para a produção de carotenóides mostraram que a bactéria *Chryseobacterium* sp. Linhagem Kr6 é capaz de sintetizar pigmentos de carotenóides quando submetida ao crescimento em meio de cultivo contendo farinha de penas como fonte de carbono.

No presente estudo, um método simples foi desenvolvido e otimizado através de planejamento experimental fatorial para extração dos pigmentos de carotenóides constituído de extrações ultrassônica de 30 min com solvente acetona e a relação massa/volume de (1:9). O teor médio de carotenóides obtido foi de 180000 ug/g, com temperatura mantida a 30°C.

A caracterização parcial dos carotenóides pela análise CCDC demonstrou

que podemos sugerir que são carotenóides oxigenados do grupo das 50 xantofilas,

pois na presença de H_2SO_4 concentrado ocorreu mudança de coloração do amarelo para azul esverdeado indicando a presença do radical epóxido, que devem ser analisada e detalhada com novos experimentos.

A atividade antioxidante do extrato de carotenóides avaliada neste estudo, incluindo a quantificação dos produtos formados durante a peroxidação lipídica resultante da reação com o Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e o método de seqüestro de radicais livres (DPPH[•]), apresentaram atividade antioxidante em ambos os métodos com confiança de 95%.

7 PERSPECTIVAS

Este estudo demonstrou que a linhagem kr6 do microrganismo *Chryseobacterium* sp. possui capacidade de produzir pigmentos de carotenóides utilizando aproveitamento de resíduos agroindustriais, constituindo assim uma possível alternativa, de grande agregação de valor, para aplicação em processos biotecnológicos. Sendo o primeiro estudo desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do ICTA, deixando os seguintes assuntos que devem ser analisados e detalhados com novos experimentos.

Dentre os assuntos que podem ser melhor explorados estão:

- Caracterizar os possíveis carotenóides composto no pigmento através de técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE – DAD), associado a técnicas de espectroscopia de massas (MS) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton (RMN).
- Determinar a capacidade antioxidante dos possíveis carotenóides encontrados.
- Determinar a atividades antiinflamatória dos possíveis carotenóides encontrados.
- Determinar a toxicidade dos possíveis carotenóides encontrados.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKSU, Z., & EREN, A. T. Carotenoid production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as carbon source. **Proc. Biochem.**, v. 4, p. 2985 - 2991, 2005.

AN, G. H.; CHOI, E. S.; Preparation of the red yeast, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, as feed additive with increased availability of astaxanthin, **Biotechnol. Lett.**, v. 25, p. 767–771, 2003.

ARUOMA, O. I., Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutat. Res.**, p. 523 – 20, 2003.

ASSUNÇÃO, R. B.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) - variety and geographic effects. **Food Chem.**, v. 81, p. 495 - 502, 2003.

AQUINO NETO, F.R. e NUNES, D.S.S. Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.

AUSICH, R. L. Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. **Pure e Appl. Chem.**, v. 69, p. 2169 – 2173, 1997.

AUST, O.; SIES, H.; STAHL, W.; POLIDORI, M. C., Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: tocopherols and carotenoids. **J. Chromatogr.**, v. 936, p. 83 - 93, 2001.

BLAIR, I. A.; Lipid hydroperoxide-mediated DNA damage. **Exp. Gerontol.**, v. 36, p. 1473 – 81, 2001.

BALACHANDRAN, S.; KENTISH, E.; MAWSON, R.; ASHOKKUMAR, M. Ultrasonic enhancement of the supercritical extraction from ginger. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 13, p. 471–479, 2006.

BANJOO, D. R.; NELSON, P. K. Improved ultrasonic extraction procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1066, n. 1-2, p. 9-18, 2005.

BERTSCH, A. e COELLO, N., A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient. **Biores. Technol.**, (article in press), 2005.

BHOSALE, P., Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 63, p. 351 – 361, 2004.

BOBBIO, F. O. e BOBBIO, P. A. Introdução a Química de Alimentos. São Paulo: Livraria Varela, 2003.

BOROWITZKA, L. J.; BOROWITZKA, M. A., β – Carotene Production with Algae. In: Vandamme, J. E. (ed.). *Biotechnology of Vitamins, Pigmentns and Growth Factors*. **Elsevier Applied Science.**, p. 15 – 26, 1989.

BRAND - WILLIAMS, W., CUVELIVER, M. E., BERSET, C., Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. Wiss. Technol.**, v. 28, p. 25 - 30, 1995.

BRITTON, G., Structure and properties of carotenoids in relation to function. **The FASEB J.**, v. 9, p. 1551 – 1558, 1995.

BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. Carotenoids Today and Challenges for the Future. In: **Carotenoids, Isolat. Analy**, G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander (eds.)..,v. 1A, p. 13 - 26, 1995.

BURRI, B.J. Beta-carotene and human health: a review of current research. **Nutr. Res.**, New York, v. 17, n. 3, p. 547-580, 1997.

CERDÁ – OLMEDO, E. Production of carotenoids with fungi. In: Vandamme, J. E. (ed.). *Biotechnology of Vitamins, Pigmentns and Growth Factors*. **Elsevier Applied Science.**, p. 27 – 42, 1989.

DAVIES, B. H. Carotenoids. In: Goodwin T. W. (Ed.) **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments**. London: Academic Press, v. 2, cap. 19, p. 38 – 165, 1976.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola.**, N° 7, Maio 1998.

DUFOSSÉ L.; PINTEA A. Trends in Food Science & Technology, v. 16, p. 368 –

ERDMAN, J. R. J. W. Variable bioavailability of carotenoids from vegetables. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 70, p. 179 - 80, 1999.

FANG, T. J.; CHIOU, T. Y., Optimization of cultivation and astaxanthin production by a mutant of red yeast. **J. Ferm. Bioeng.**, v. 75, p. 466 – 469, 1993.

FARAG, A. M. e HASSAN, M. A., Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme and Microbial Technol.**, v. 34, p. 85 – 93, 2004.

FRANKEL, E. N., MEYER, A. S., The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **J. Sci. Food Agric.**, v. 80, p. 1925 – 1941, 2000.

FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M., The Biosynthesis and Nutritional Uses of Carotenoids. **Prog. Lipid Res.**, v. 43, p. 228 – 265, 2004.

FRENGOVA, G.; SIMOVA, E.; PAVLOVA, K.; BESHKOVA; GRIGROVA, D., Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. **Biotech. Bioeng.**, v. 44, p. 888 – 894, 1994.

FINKEL, T.; Holbrook, Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. N. J.; **Nature**, v. 408, p. 239 – 247, 2000.

GANG, C., & ZORA, D. Carotenoids are degraded by free radicals but do not affect lipid peroxidation in unilamellar liposomes under different oxygen tensions. **FEBS Letters**, v. 505, p. 151 – 154, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, JMC. Free radical, other reactive species and disease. In: **Free radicals in biology and medicine**. 3rd Oxford: Clarenton Press., p. 617 - 783, 1999.

HALLIWELL, B.; The antioxidant paradox. **The Lancet.**, v 355, p.1179 – 1180, 2000.

HANDELMAN, G. L., The evolving role of carotenoids in human biochemistry. **Nutrition.**, v. 17, p. 818 – 22, 2001.

HUANG, D., OU, B., PRIOR, R.L., The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J. Agric. Food Chem.**, 53, 1841 - 1856, 2005.

HOLMES, B.; OWEN, R. J. Genus *Flavobacterium*. In: Krigg, N.R. (ed.) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, v. 1, p. 353 – 361, 1984.

JOHNSON, E. A.; SCHROEDER, W. A., Microbial carotenoids. Advances in Biochemical. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 53, p. 119 – 178, 1995.

KIM, J.M., LIM, W.J., SUH, H.J., 2001. Feather degrading *Bacillus* species from poultry waste. **Proc. Biochem.**, 37, 287-291

KRINSKY, N. I. The Biological Properties of Carotenoids. **Pure Appl. Chem.**, v. 66, p. 1003 – 1010, 1994.

KOVÁS, G.; BURGHARDT, J.; PRADELLA, S.; SCHUMANN, P.; STACKEBRANDT, E.; MARIALIGET, K., *Kocuria palustris* sp. Nov. and *Kocuria rhizophila* sp. Nov., Isolated From The Rhizoplane of the Narrow-Leaved Cattail (*Tipha angustifolia*). **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 49, p. 167 - 173, 1999.

LARSON, R. A.; Naturally Occurring Antioxidants, Lewis Publishers: **New York**, p. 7, 1997.

LETOURNEAU, F., SOUSSOTTE, V., BRESSOLLIER, P., BRANLAND, P., VERNEUIL, B., Keratinolytic activity of *Streptomyces* sp. S.K₁₋₀₂: a new isolated strain. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 77 – 80, 1998.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P.; Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.**, v. 37, n. 3, set./dez., 2001

LIU, Y.S., WU, J.Y., and HO, K. P. Use of n-hexadecane as an oxygen vector to improve *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. **J. of Appl. Microbiol.**, v. 101 (5) , p. 1033 – 1038, 2006.

LÓPEZ-NIETO, M. J.; COSTA, J.; PEIRO, E.; MÉNDEZ, E.; RODRÍGUEZ-SÁIZ, M.; FUENTE, J. L.; CABRI, W.; BARRETO, J. L. Biotechnological lycopene production by mated fermentation of *Blakeslea trispora*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 66, p. 153 – 159, 2004.

YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA H.; MATOBA T.; TERAJO J. HPLC method for evaluation of the free radical scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Biosc, Biotechnol.. Biochem.**, v. 62, p. 1201-1204, 1998.

MALDONADE, R. I.; RODRIQUEZ A.D. B.; SCAMPARINI P. R. A., Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. **Food Chem.**, v. 107, p. 145-150, 2008.

MENDES-PINTO, M.M.; RAPOSO, M.F.J.; BOWEN, J.; YOUNG, A.J.; MORAIS,

R.; Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*: effects on astaxanthin recovery and implications, **J. Appl. Phycol.** v.13, p. 19–24, 2001.

MYERS, R.H.; MONTGOMERY, D. C. Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments, 2nd ed., Wiley, New York, 2002.

MERCADANTE, A. Z.; BRITTON, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoids from yellow passion fruti (*Passiflora edulis*). **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, p. 4102 - 4106, 1998.

MERCADANTE, A. Z.; STECK. A.; PFANDER, H. Carotenoids from guava (*Psidium guajava* L.): Isolation and strusture elucidation. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, n.1 p. 145 – 151, 1999.

MIÃO F., LU D., LI Y., ZEN M. Characterization of astaxanthin esters in *Haematococcus pluvialis* by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization. **Analyt. Biochem.**, v. 352, p. 176 - 181, 2006.

MONTERO, M. Los radicales libres y las defensas antioxidantes: revisión. **Ann. Fac. Med.**, v. 57, p. 278 – 81, 1996.

MONTENEGRO, M. A.; RIOS, A. de O.; MERCADANTE, A. Z.; NAZARENO, M. A.; BORSARELLI, C. D. Model studies on the photosensitized isomerization of bixin. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 367 - 373, 2004.

MOREIRA, E. A. M.; SHAMI, N. J. I. E. Licopeno como agente antioxidante. **Rev. Nutr.**, v. 17, p. 227 – 236, 2004.

NAGESWARA, R. R.; Naseeruddin, A. S.; Nageswara B. R. **J. of Chromatogr. A.**, v. 1076, p. 189 – 192, 2005.

NUNES, I. L.; MERCADANTE, A. Z. Obtenção de cristais de licopeno a partir de descarte de tomate. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, p. 440 - 447, 2004.

OHKAWA, H., OHISHI, H., YAGI, K., Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem.**, v. 95, p. 351 – 358, 1979.

OLSON, JA. Carotenoids and human health. **Arch Latinoam Nutr.**, v. 49(3 Suppl 1), p. 7 -11, 1999.

OMONI, A. O.; ALUKO, R.O. The anti-carcinogenic and anti-atherogenic effects of Lycopene: a review. **Trends Food Sci Tech.**, v. 16, p. 344 – 350, 2005.

ONIFADE, A. A., AL-SANE, N. A., AL-MUSALLAM, A. A., AL-ZARBAN, S., A review: Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. **Biores. Technol.**, v. 66, p. 1 - 11, 1998.

PAPAS, AM. Diet and antioxidant status. **Food Chem Toxicol.**, v. 37, p. 999 - 1007, 1999.

PARK, P.K.; KIM, E.Y.; CHU, K.H. Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments. **Sep. Purif. Technol.**, v. 53, p. 148-152, 2007.

PASAMONTES, L.; HUG, D.; TESSIER, M.; HOHMANN, H. P.; SCHIERLE, J.; ADOLPHUS, P.G.M., Isolation and characterization of the carotenoid biosynthesis genes of *Flavobacterium* sp. Strain R1534. **Gene**, v. 185, p. 35-41, 1997.

PEDROZO, E. A.; FRANCISCO, D. C., A importância da gestão da informação entre os elos da cadeia produtiva de frangos. In: **Congresso Brasileiro de Economia e Sociologia Rural, XLII**. Cuiabá – MG, Anais Dinâmicas Setoriais e Desenvolvimento Regional, 2004.

RAO, R. N.; ALVI, S. N.; RAO, B. N. Preparative isolation and characterization of some minor impurities of astaxanthin by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr A.**, v. 1076(1-2), p. 189 – 192, 2005.

RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANALA, A., YANG, M., RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine.**, v. 26, p. 1231 – 1237, 1998.

RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANALA, A., YANG, M., et al., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 26, p. 1231 – 1237, 1999.

RIBEIRO, N. M. & NUNES, C. R., Análise de pigmentos de pimentões por cromatografia em Papel. **Química Nova na escola.**, N° 29, Agosto, 2008.

RIFFEL, A., ORTOLAN, S., BRANDELLI, A., De-hairing activity of extracellular proteases produced by keratinolytic bacteria. **J. of Chem. Tech. Biotech.**, v. 78, p. 855-859, 2003.

RIFFEL, A., BRANDELLI, A., Isolation and characterization of a feather-degrading

bacterium from the poultry processing industry. **J. of Industrial Microbiology & Biotech.**, v. 29, p. 255 – 258, 2002.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B., A guide to carotenoid analysis in foods. Washington: ILSI Press, p. 64, 2001.

ROSSINI, K., NOREÑA, C.P.Z., OLIVERA, F.C., BRANDELLI, A., Casein peptides with inhibitory activity on lipid oxidation in beef homogenates and mechanically deboned poultry meat. **LWT-Food Sci. Technol.**, v. 42, p. 862 - 867, 2009.

SAHL, W.; SIES, H. Carotenoids: occurrence, biochemical activities, and bioavailability. In: Packer L, Hiramatsu M, Yoshikawa T. Antioxidant food supplements in human health. **San Diego: Academic Press.**, p.183 - 98, 1999.

SAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of. Carotenoids. **Mol Aspects Med.**, v. 24, p. 345 – 351, 2003.

SANCHEZ - MORENO, C., LARRAURI, J. A., SAURA - CALIXO, F., A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **J. Sci. Food Agric.**, v. 76, p. 270 - 276, 1998.

SCHWARTZ, S. J., Pigment analysis, in Introduction to the Chemical Analysis of Foods. **Jones and Barthett.**, v. 83, p. 261 – 271, 1994.

SCHUTTE, H; KULA, M-R. Pilot and process-scale techniques for cell disruption. **Biotechnol. Appl Biochem.**, v. 12, p. 599 – 620, 1990.

SIES, H.; STAHL, W., Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **Am J Clin Nutr.**, V. 62(6), p. 1315 – 21, 1995.

SILVA, C. R. M. NAVES, M. M. V. Suplementação de Vitaminas na prevenção de câncer. **Rev. Nutr.**, v. 14, p. 135 – 143, 2001.

SILVEIRA, S. T., JAEGER, M. K., BRANDELLI, A. Kinetic data and substrate specificity of a keratinase from *Chryseobacterium* sp. kr6. **J. of Chem. Technol. and Biotechnol.**, 84: 361-366, 2008.

SCHIEDT, K. and LIAAEN-JENSEN, S. In Carotenoids. Vol. IA: Isolation and Analysis, (ed. G. Britton, S Ljaaen-Jensen and H. pfander), pp. 81-108, Birkhiluser, Basel,1995.

SHUHAMA, I. K.; AGUIAR, M. L.; OLIVIRA, W. P.; FREITAS, L. A. P.; Experimental production of annatto powders in spouted bed dryer. **J. Food Engin.**, v. 59, p. 93 - 97, 2003.

TINOI, J., RAKARIYATHAM, N., DEMING, R. L., Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean wastw flour as substrate. **Proc. Biochem.**, v. 40, p. 2551 - 2557, 2005.

UENOJO, M.; MARÓSTICA Jr., M. R.; PASTORE, G. M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 616-622, 2007.

VALDUGA, E. Bioprodução de compostos voláteis e carotenóides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636. Florianópolis, p 189. Tese (Doutorado Engenharia Química), UFSC, 2005.

VANDAMME, P.; BERNARDET J. F, SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HOLMES B. New Perspectives in the Classification of the Flavobacteria: Description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* norn. rev. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, p. 827 - 83, 1994.

VILKHU K.; MAWSON, R.; SIMONS, L.; Darren BATES, D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. **Innovative Food Science and Emerg. Technol.**, v. 9, p. 147-154., 2007.

VOGT, W.; Oxidation of methionyl residues in proteins: Tools, targets, and reversal. **Free Radical Biol. Med.**, v. 18, p. 93 - 105, 1995.

WHEELWRIGHT, S. M.; Protein purification: design and scale up of downstream processing. Munich, Hanser Publishers, 1991.

WILLIAMS, C.M., LEE, C.G., GARLICH, J.D., SHIH, J.C.H., Evaluation of a bacterial feather fermentation product, feather-lysate, as a feed protein. **Poultry Science**, v. 70, p. 85 – 94, 1991.

ZERAIK, M. L., & YARIWAKE, J. H., Extração de β -Caroteno de cenouras: Uma proposta para disciplinas experimentais de química. **Quim. Nova**, v. 31, No. 5, p. 1259 - 1262, 2008.

ZHENXIN, G.; DEMING, C.; YONGBIN, H.; ZHIGANG, C.; FEIRONG, G., Optimization of carotenoids extraction from *Rhodobacter sphaeroides*. **LWT – Food Sci. Technol.**, v. 41, p. 1082 - 1088, 2008.

9. APÊNDICE

APÊNDICE A: Composição centesimal do meio de cultura Ágar Farinha de Pena (AFP)

Ágar Farinha de Pena (AFP)

Componentes	g L ⁻¹
NaCl	0,5
K ₂ HPO ₄	0,3
KH ₂ PO ₄	0,4
Farinha de Pena	20,0
Ágar	15,0
Água destilada	1000mL

Obs: Autoclavar por 15 min/ 121 ° C
Ajustar a pH desejado.

APÊNDICE B – Curvas padrão para o cálculo da concentração de TBARS e do radical DPPH[•].

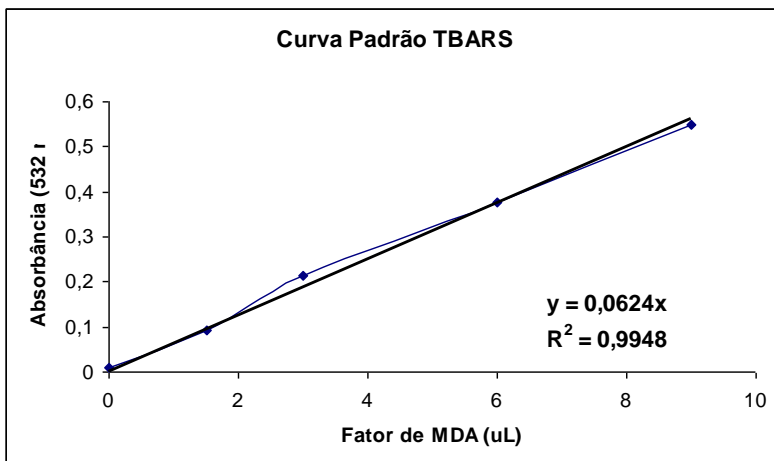


Figura 1: Curva padrão desenvolvida com concentrações conhecidas de 1,1,3,3-tetrametoxipropano.

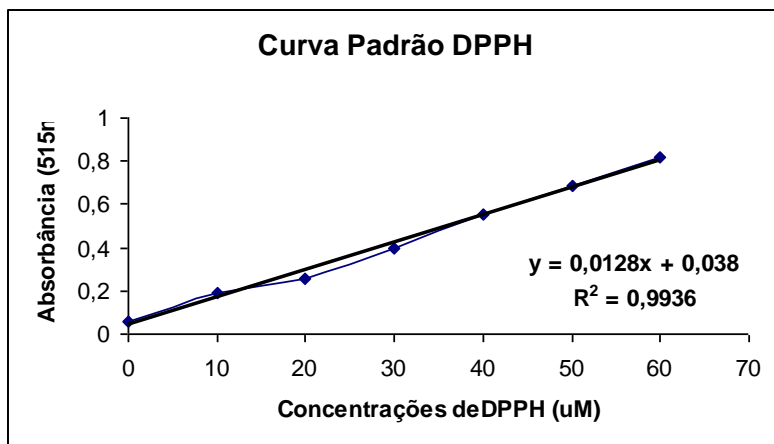


Figura 2: Curva padrão do radical DPPH[•] desenvolvida no intervalo de 0-60 mol L⁻¹.