



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB  
*Campus* VITÓRIA DA CONQUISTA  
PROGRAMA MULTICÊNTRICO EM  
BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR –  
PMBqBM



THAMILLY MOREIRA SILVA

PRODUÇÃO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO PIGMENTO  
EXTRAÍDO A PARTIR DA *Rhodotorula minuta* E *Rhodotorula*  
*mucilaginosa*, CULTIVADAS EM CASCA DE MARACUJÁ – AMARELO  
(*Passiflora edulis*).

VITÓRIA DA CONQUISTA-BA  
DEZEMBRO - 2021

**THAMILLY MOREIRA SILVA**

**PRODUÇÃO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO PIGMENTO  
EXTRAÍDO A PARTIR DA *Rhodotorula minuta* E *Rhodotorula  
mucilaginosa*, CULTIVADAS EM CASCA DE MARACUJÁ – AMARELO  
(*Passiflora edulis*).**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup> Dra. Janaína Silva de Freitas

**VITÓRIA DA CONQUISTA-BA  
DEZEMBRO - 2021**

**Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB**  
Recredenciada pelo Decreto Estadual  
Nº 16.825, de 04.07.2016

## **DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO**

**Título: : “PRODUÇÃO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO PIGMENTO EXTRAÍDO A PARTIR DA *Rhodotorula minuta* e *Rhodotorula mucilaginosa*, CULTIVADOS EM CASCA DE MARACUJÁ - AMARELO (*Passiflora edulis*).”**

**Autor (a): Thamilly Moreira Silva**

**Orientador (a): Professora Dra. Janaína Silva De Freitas**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, pela Banca Examinadora:



**Profa. Dra. Janaína Silva De Freitas**

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia



**Profa. Dra. Luciana Amaral de Faria Silva**

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia



**Prof. Dr. Marcelo Franco**

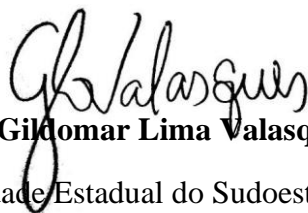
Universidade Estadual de Santa Cruz



**Prof. Dr. Nívio Batista Santana**

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

**Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB**  
Recredenciada pelo Decreto Estadual  
Nº 16.825, de 04.07.2016



**Prof. Dr. Gilvaldasques Junior**

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Data de realização: 20 de dezembro de 2021.



**AD PLENAM VITAM**

*Dedico aos meus pais Walmir e Magda,  
minha irmã Thuanny e meu esposo Diego.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por essa oportunidade única e por permitir que chegasse ao fim de mais uma caminhada com saúde e força para continuar seguindo em frente.

Aos meus pais (Walmir e Magda) e minha irmã Thuanny pelo amor, apoio e incentivo constantes, especialmente quando surgiam as dificuldades e desafios inerentes a pós-graduação;

Ao meu esposo Diego por sempre me apoiar e caminhar ao meu lado para que tudo acontecesse da melhor maneira possível, obrigada por entender minhas ausências, impaciências e cansaço.

A minha orientadora, a professora Dra. Janaína Silva de Freitas por desde o início de tudo, ainda durante a seleção dos discentes e orientadores ter acreditado na minha capacidade, frente ao desafio de atuar em uma nova área de conhecimento, suas palavras de incentivo me guiaram até aqui, bem como sua paciência, experiência, conselhos e pensamento positivo.

Aos colegas do grupo de pesquisa Abdias Batista da Silva Neto, Erlon Oliveira Xavier, Jabson Meneses Teixeira, Rennan Noronha de Franca, Thamara Louisy Santos Brito, Thaís Santos Moraes Lima e Ana Laura Santos Sirino por sempre estarem ao meu lado em algum momento da pesquisa firmes e fortes, sem a ajuda de vocês tenho certeza que não conseguiria chegar até aqui foram fundamentais para conseguir concluir o estudo.

A Ana Shara Moura de Rocha, por ter optado em fazer o estágio do último semestre da graduação comigo auxiliando na execução desse projeto, você demonstrou ser muito dedicada e seu comprometimento me ajudaram muito na execução das análises.

A minha amiga Alexandra Fernandes, por sempre estar ao meu lado com uma palavra de conforto e força, por incrível que pareça sempre tínhamos as mesmas dificuldades na pós-graduação e já tínhamos a palavra de incentivo para dizer a outra, sua colaboração foi fundamental para a conclusão desse trabalho.

As colegas do PMBqBM Pâmala Évelin Pires Cedro e Tátilla Putumujú Santana Mendes por me receberem na UESB de Jequié quando precisava fazer uma análise que não estava disponível no campus de Itapetinga.

As colegas do PMBqBM Tássia Liz e Beatriz Rabelo pelo apoio nos testes de atividades biológicas no campus da UESB em Vitória da Conquista - BA.

Aos professores Dr. Nívio Batista Santana, Dra. Kátia Iro Altidis Mota e Dra Simone Andrade Gualberto por sempre que necessário me ajudarem na execução do meu experimento, a partir de suas experiências na área prática e por disponibilizar equipamentos, reagentes e

vidrarias.

A professora Dra. Patrícia Leal, docente da Universidade Federal da Bahia – Campus IMS-UFBA por todo o conhecimento transmitido na área de bioprocessos, seus ensinamentos foram primordiais para conduzir a minha pesquisa;

A Dra. Ana Paula Gomes da Silva por me auxiliar na cromatografia líquida de alta eficiência, sem sua ajuda não conseguiria executar essa análise.

Ao professor Dr. Raphael Queiroz por sempre lutar pelo nosso programa para que consolidasse em nossa cidade oferecendo essa grande oportunidade para os discentes que não conseguiriam seguir com o programa em outro lugar. Sou grata também ao professor por ceder o espaço de seu laboratório e sua aluna de doutorado para me ajudar nos testes de atividades biológicas, suas colaborações foram essenciais para concretização da pesquisa.

A FAPESB, UESB, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro referente a pesquisa e minha bolsa de estudos;

Aos colegas do PMBqBM da UESB e professores que tanto contribuíram com a formação do meu conhecimento na área de Bioquímica e Biologia Molecular;

A comissão julgadora da minha defesa pela disponibilidade e contribuições para o estudo.

*Sonho que se sonha só  
É só um sonho que se sonha só  
Mas sonho que se sonha junto é realidade*

*Raul Seixas*



## RESUMO

Algumas espécies de leveduras conseguem gerar substâncias de interesse biotecnológico; como as do gênero *Rhodotorula*, conhecidas por produzirem carotenoides, com diferentes tonalidades entre vermelho, laranja, amarelo e rosa; como o  $\beta$ -caroteno, toruleno e torularodina. Os pigmentos naturais produzidos por microrganismos se destacam pela possibilidade de produção a baixo custo, em maior quantidade, menor tempo e dispor de atividades biológicas. O objetivo desse trabalho foi otimizar a produção e investigar as atividades biológicas de pigmento obtido por fermentação submersa de *Rhodotorula spp.*, utilizando como substrato para fermentação casca de maracujá - amarelo (*Passiflora edulis*). Para a otimização as variáveis independentes foram: casca de maracujá-amarelo (CMA), em gramas (g) como meio de cultivo, pH e tempo de fermentação, em dias. O estudo da produção do pigmento e sua otimização foi realizado através da matriz de Doehlert, as condições fixas foram 30°C e 150 rpm. As atividades biológicas investigadas foram antimicrobiana por concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC), contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli.*, larvicida contra larvas do mosquito *A. aegypti* e citotoxicidade em células tumorais HCT116 (carcinoma de colón humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), B16-F10 (melanoma murino) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano) *in vitro*. A maior quantidade de pigmentos totais e carotenoides totais produzidos pela *R. minuta* foi 28,0±0,01 mg/L e 72,8±0,026 µg/g, respectivamente; enquanto que para *R. mucilaginosa* a produção de pigmentos totais foi 37,0±0,002 mg/L e de carotenoides totais 236,8±0,013 µg/g. O ponto ótimo de produção de pigmentos totais para *R. minuta* foi 2,3g de CMA, pH 6,5 e 5 dias e para *R. mucilaginosa* 2,5g de CMA, pH 6 e 5 dias. Nas amostras de pigmentos totais foi identificada a presença 0,29mg/L de  $\beta$ -caroteno para *R. minuta* e 0,83 mg/L para *R. mucilaginosa*. Quanto a investigação das atividades biológicas o pigmento da *R.minuta* apresentou ação bactericida contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, enquanto que o pigmento produzido pela *R.mucilaginosa* foi bactericida contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e bactericida e bacteriostático contra *Klebsiella pneumoniae*. A atividade larvicida dos pigmentos foi identificada na amostra das duas espécies, com destaque para o pigmento da *R.minuta* que apresentou essa característica em menor tempo de exposição das larvas. Não foi identificado efeito citotóxico dos pigmentos contra as células tumorais. Dessa forma, foi possível otimizar a produção de carotenoides por *Rhodotorula spp* e concluir que a casca de maracujá-amarelo pode ser utilizada como fonte de nutriente para crescimento das *Rhodotorula spp* e produção de pigmento com carotenoides totais e  $\beta$ -caroteno em sua composição. Esses pigmentos apresentaram atividades biológicas promissoras que podem estimular novas pesquisas e uma aplicabilidade dentro do contexto da indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica e de rações.

**Palavras-chave:** Bioprocessos;  $\beta$ -caroteno; Larvicida; Antimicrobiano, Citotoxicidade.

## ABSTRACT

Some yeast species manage to generate substances of biotechnological interest; such as those of the genus *Rhodotorula*, known for producing carotenoids, with different shades of red, orange, yellow and pink; such as  $\beta$ -carotene, torulene and torularodine. The natural pigments produced by microorganisms stand out for the possibility of production at low cost, in greater quantity, less time and having biological activities. The objective of this work was to optimize the production and investigate the biological activities of pigment obtained by submerged fermentation of *Rhodotorula spp.*, using yellow passion fruit peel (*Passiflora edulis*) as a substrate for fermentation. For the optimization, the independent variables were: yellow passion fruit peel (CMA), in grams (g) as a culture medium, pH and fermentation time, in days. The study of the pigment production and its optimization was carried out through the Doehlert matrix, the fixed conditions were 30°C and 150 rpm. The biological activities investigated were antimicrobial by minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC), against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, larvicidal against *A. aegypti* mosquito larvae and cytotoxicity in tumor cells HCT116 (human colon carcinoma), HepG2 (human hepatocellular carcinoma), B16-F10 (murine melanoma) and MRC-5 (human lung fibroblast) *in vitro*. The highest amount of total pigments and total carotenoids produced by *R. minuta* was 28.0±0.01 mg/L and 72.8±0.026  $\mu$ g/g, respectively; while for *R. mucilaginosa* the production of total pigments was 37.0±0.002 mg/L and of total carotenoids 236.8±0.013  $\mu$ g/g. The optimum point of production of total pigments for *R. minuta* was 2.3g of CMA, pH 6.5 and 5 days and for *R. mucilaginosa* 2.5g of CMA, pH 6 and 5 days. In the samples of total pigments, the presence of 0.29mg/L of  $\beta$ -carotene was identified for *R. minuta* and 0.83 mg/L for *R. mucilaginosa*. As for the investigation of biological activities, the *R.minuta* pigment showed bactericidal action against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, while the pigment produced by *R.mucilaginosa* was bactericidal against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and bactericidal and bacteriostatic against *Klebsiella pneumoniae*. The larvicidal activity of the pigments was identified in the sample of both species, with emphasis on the *R.minuta* pigment, which showed this characteristic in a shorter time of exposure of the larvae. No cytotoxic effect of the pigments against tumor cells was identified. Thus, it was possible to optimize the production of carotenoids by *Rhodotorula spp* and to conclude that the yellow passion fruit peel can be used as a source of nutrient for the growth of *Rhodotorula spp* and pigment production with total carotenoids and  $\beta$ -carotene in its composition. These pigments showed promising biological activities that can stimulate new research and applicability within the context of the food, cosmetic, pharmaceutical and feed industries.

**Keyword:** Bioprocesses;  $\beta$ -carotene; Larvicidal; Antimicrobial, Cytotoxicity.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>20</b>
<b>3. DESENVOLVIMENTO.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 CAPITULO 1: Produção de carotenoides pelo gênero <i>Rhodotorula</i> utilizando</b>	<b>21</b>
<b>resíduos agroindustriais:.....</b>	
<b>Resumo.....</b>	<b>23</b>
<b>1 Introdução.....</b>	<b>23</b>
<b>2 Materiais e métodos.....</b>	<b>24</b>
<b>3 Resultados e Discussão.....</b>	<b>24</b>
<b>Leveduras do gênero <i>Rhodotorula</i>.....</b>	<b>24</b>
<b>Bioprocessos: Tipos de Fermentação.....</b>	<b>25</b>
<b>Pigmentos naturais produzidos por <i>Rhodotorula spp</i>.....</b>	<b>27</b>
<b>Produção de carotenoides por <i>Rhodotorula spp</i> utilizando resíduos</b>	<b>29</b>
<b>agroindustriais.....</b>	
<b>4. Conclusões.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2 CAPITULO 2: Otimização da produção de pigmentos por <i>Rhodotorula</i></b>	<b>33</b>
<b><i>minuta</i> URM 5197 e <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> URM7409 utilizando casca de</b>	
<b>maracujá-amarelo (<i>Passiflora edulis</i>).....</b>	
<b>Resumo.....</b>	<b>35</b>
<b>1 Introdução.....</b>	<b>35</b>
<b>2 Metodologia.....</b>	<b>36</b>
<b>2.1 Coleta e Preparo do resíduo.....</b>	<b>36</b>
<b>2.2 Composição centesimal do Resíduo de Casca de Maracujá-Amarelo (<i>Passiflora</i></b>	<b>36</b>
<b><i>edulis</i>).....</b>	
<b>2.3 Obtenção dos Microrganismos e Técnicas de Manutenção.....</b>	<b>36</b>
<b>2.4 Planejamento Experimental: Matriz de Doehlert.....</b>	<b>37</b>
<b>2.5 Preparo do Inóculo, Meio de Cultura e Padronização do pH.....</b>	<b>37</b>
<b>2.6 Extração de pigmentos.....</b>	<b>37</b>
<b>2.7 Métodos Analíticos.....</b>	<b>38</b>

2.7.1 Determinação de carotenoides totais.....	38
2.7.2 Identificação e quantificação do $\beta$ -caroteno por Cromatografia Líquida	38
de Alta Eficiência (CLAE).....	
2.8 Análise Estatística.....	38
3. Resultados e Discussão.....	38
4. Considerações finais.....	48
Agradecimentos.....	48
Referências.....	48
3.3 CAPITULO 3: Avaliação de atividades biológicas de pigmentos produzidos	51
por <i>Rhodotorula minuta</i> URM 5197 e <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> URM 7409.....	
Resumo.....	55
Introdução.....	56
Materiais e Métodos.....	57
Obtenção do Microrganismo.....	57
Preparação do inóculo e da fermentação submersa.....	57
Extração do pigmento com solventes orgânicos.....	57
Determinação da Atividade Antimicrobiana.....	57
Atividade Larvívora dos pigmentos contra larvas de <i>A. aegypti</i> .....	58
Diluições das amostras.....	58
Manutenção das Larvas.....	59
Ensaio Biológico.....	60
Análises Estatísticas.....	60
Determinação de citotoxicidade em linhagens de células tumorais <i>in vitro</i> .....	60
Preparo das amostras e células.....	60
Ensaio de citotoxicidade.....	61
Resultados e Discussão.....	62
Agradecimentos .....	68
Contribuições dos Autores.....	68
4. CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS.....	71
INTRODUÇÃO.....	71
CAPITULO 1.....	74
CAPITULO 3.....	80

<b>ANEXOS.....</b>	<b>86</b>
<b>Anexo 1 - Guia para elaboração de trabalhos acadêmicos (com base na ABNT – NBR 14724 e Regimento Geral do PMBqBM.....</b>	<b>8</b>
<b>Anexo 2 - Guia para autores da Revista Research, Society and Development.....</b>	<b>100</b>
<b>Anexo 3 - Guia para autores da Revista Anais da Academia Brasileira de Ciências.....</b>	<b>104</b>

## LISTA DE FIGURAS

### CAPITULO 1

<b>Figura 1</b> - Biossíntese de carotenoides em leveduras.....	<b>28</b>
---	-----------

### CAPITULO 2

<b>Figura 1</b> - Diagrama de Pareto para produção de pigmentos totais (mg/L) para <i>R.minuta</i> (a) e <i>R.mucilaginosa</i> (b).	<b>42</b>
<b>Figura 2</b> - Gráficos de superfície de resposta para produção de pigmentos totais por <i>R.minuta</i> , mostrando os efeitos das interações de (a) pH e casca de maracujá - amarelo, (b) tempo (dias) e casca de maracujá - amarelo, (c) tempo (dias) e pH.....	<b>44</b>
<b>Figura 3</b> - Gráficos de superfície de resposta para produção de pigmentos totais por <i>R.mucilaginosa</i> , mostrando os efeitos das interações de (a) pH e casca de maracujá - amarelo, (b) tempo (dias) e casca de maracujá - amarelo, (c) tempo (dias) e pH.....	<b>45</b>
<b>Figura 4</b> - Cromatogramas obtidos por CLAE considerando a resposta do detector (mV) x tempo (min), para $\beta$ -caroteno obtido por <i>R.minuta</i> (a) e <i>R. mucilaginosa</i> (b).....	<b>47</b>

**LISTA DE ANEXOS**

<b>Anexo 1</b> - Guia para elaboração de trabalhos acadêmicos (com base na ABNT – NBR 14724 e Regimento Geral do PMBqM.....	<b>85</b>
<b>Anexo 2</b> - Guia para autores da Revista Research, Society and Development.....	<b>99</b>
<b>Anexo 3</b> - Guia para autores da Revista Anais da Academia Brasileira de Ciências.....	<b>103</b>

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO 1

<b>Tabela 1.</b> Produção de pigmentos por <i>Rhodotorula spp</i> utilizando resíduos agroindustriais como substratos.....	<b>30</b>
--	-----------

### CAPITULO 2

<b>Tabela 1.</b> Produção de pigmentos totais e carotenoides totais de acordo com matriz de Doehlert para <i>R.minuta</i> e <i>R.mucilaginoso</i> .....	<b>39</b>
<b>Tabela 2.</b> Análise de Variância (ANOVA) para a produção de pigmentos totais por <i>R.minuta</i> e <i>R.mucilaginoso</i> pela matriz de Doehlert.....	<b>41</b>

### CAPITULO 3

<b>Tabela I.</b> Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (MBC) para pigmento produzido por <i>R.minuta</i> URM 5197 e <i>R.mucilaginoso</i> URM 7409.....	<b>62</b>
<b>Tabela II.</b> Atividade larvicida dos pigmentos de <i>Rhodotorula minuta</i> URM 5197 e <i>Rhodotorula mucilaginoso</i> URM 7409.....	<b>65</b>
<b>Tabela III.</b> Valores de IC <sub>50</sub> para a atividade citotóxica em linhagens de células tumorais <i>versus</i> não tumorais.....	<b>67</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>Aedes aegypti</i>	<i>A. aegypti</i>
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina Trifosfato
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
B16-F10	Melanoma murinho
BHI	Caldo Cérebro Coração
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMA	Casca de maracujá-amarelo ( <i>Passiflora edulis</i> )
CT RMI	Carotenoides Totais <i>R.minuta</i>
CT RMU	Carotenoides Totais <i>R.mucilaginoso</i>
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DMAPP	Dimetilalil pirofosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
DQO	Demanda química de oxigênio
F	Teste de Fisher
FDA	Fibra detergente ácida
FDN	Fibra detergente neutro
FES	Fermentação em Estado Sólido
FPP	Farnesil-pirofosfato
FS	Fermentação Submersa
GGPP	Eranilgeranil-pirofosfato
GL	Grau de Liberdade
GPP	Geranil-pirofosfato
HCT116	Carcinoma de colón humano
HepG2	Carcinoma hepatocelular humano
HMG-CoA	3-Hidroximetil-3-glutaril-CoA
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória média
MBC	Concentração Bactericida Mínima
MIC	Concentração Inibitória Mínima

<b>MRC-5</b>	Fibroblasto de pulmão humano
<b>MVA</b>	Ácido Mevalônico
<b>MVP</b>	Mevalonato-fosfato
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>Nm</b>	Nanometros
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>PR RMU</b>	Pigmentos Totais <i>R.mucilaginosa</i>
<b>PT RMI</b>	Pigmentos Totais <i>R.minuta</i>
<b>QM</b>	Quadrado Médio
<b><i>R. araucariae</i></b>	<i>Rhodotorula araucariae</i>
<b><i>R. babjevae</i></b>	<i>Rhodotorula babjevae</i>
<b><i>R. gracilis</i></b>	<i>Rhodotorula gracilis</i>
<b><i>R. lactosa</i></b>	<i>Rhodotorula lactosa</i>
<b><i>R. minuta</i></b>	<i>Rhodotorula minuta</i>
<b><i>R. mucilaginosa</i></b>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
<b><i>R. rubra</i></b>	<i>Rhodotorula rubra</i>
<b><i>R. toruloides</i></b>	<i>Rhodotorula toruloides</i>
<b><i>R.glutinis</i></b>	<i>Rhodotorula glutinis</i>
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficiente de Determinação
<b><i>Rhodotorula spp</i></b>	Espécies de <i>Rhodotorula</i>
<b>Rpm</b>	Rotações por minuto
<b>Scielo</b>	<i>Scientific Eletronic Library Online</i>
<b>SQ</b>	Soma dos quadrados
<b>T</b>	Tempo
<b>UFC</b>	Unidade formadora de Colônia
<b>UFPE</b>	Universidade Federal de Pernambuco
<b>URM</b>	Micoteca UFPE
<b>YM</b>	(Meio de cultura composto de 1% glicose, 0.5% peptona, 0.3% extrato de malte, 0.3% extrato de leveduras)

## INTRODUÇÃO

Os pigmentos naturais podem ser produzidos por plantas, insetos e microrganismos (MAPARI et al., 2005). Existe uma demanda pela substituição de pigmentos sintéticos por naturais, já que se encontra consolidado a existência de efeitos nocivos dos pigmentos sintéticos quando consumidos pelo ser humano, as fontes alternativas, como a via microbiológica são uma alternativa promissora (ROSTAMI et al., 2016; PARASAR et al., 2020).

Dentro desse contexto, as espécies de leveduras produtoras de pigmentos do gênero *Rhodotorula* são conhecidas pela capacidade de produzirem carotenoides e por serem viáveis para produção desse pigmento através de fermentação, possuem tempo de ciclo curto e baixo custo para serem cultivadas (TANG et al., 2019) e apresentam potencial para produção em escala industrial (LAU et al., 2018).

Nesse sentido, estudos têm sido realizados nessa vertente com o intuito de ampliar a produção de carotenoides pelo gênero *Rhodotorula* voltados para melhorar rendimento, otimização de meios e condições de cultivo (TANG et al., 2019). Quanto a otimização do cultivo para aumentar a produção de pigmento, sabe-se que *Rhodotorula spp* tem a produção de carotenoides influenciada pelo estresse osmótico (sais), físico por luz ultravioleta (UV) e de luz com fotoperíodos diferentes (GARCIA-CORTES et al., 2021). Ainda sobre otimizar a produção de pigmento por combinações de variáveis, fonte de carbono, nitrogênio, tempo de incubação (ZOHARI et al., 2021), temperatura e pH (SILVA et al., 2020) também são variáveis que interferem na produção, a aeração e intensidade de irradiação da luz devem ser consideradas para formação de células e produção de carotenoides (VARMIRA et al., 2017).

Diante da necessidade de encontrar alternativas que diminuam o custo e ampliem a produção de pigmentos, o uso de resíduos agroindustriais para constituir meio de cultivo é uma alternativa, agrega valor ao produto e minimiza os danos causados ao meio ambiente pelo descarte desse resíduo (PANESAR et al., 2015, VENIL et al., 2017, MISHRA et al., 2019). Até porque os resíduos agroindustriais são produzidos em grande quantidade, trata-se de resíduos e subprodutos oriundos das etapas de processamento dos produtos (RODRIGUES et al., 2014), na literatura a produção de pigmento por *Rhodotorula spp* foi verificada utilizando diferentes resíduos como: bagaço de mandioca (MANIMALA e MURUGESAN, 2017), bagaço de laranja (*Citrus sinensis*) com melão de cana de açúcar (MACHADO et al., 2019), água residual de batata e fração de glicerol (KOT et al., 2019), caldo de cana (LOBO et al., 2021).

Ressalta-se que leveduras do gênero *Rhodotorula* podem produzir mais de um tipo de carotenoide, dentre eles:  $\beta$ -caroteno, fitoeno, toruleno e torularodina (SHARMA e GHOSHAL, 2020). Os carotenoides se destacam em relação aos outros pigmentos, pois além da possibilidade de colorir, apresentam diversas finalidades em relação ao uso, podem ser utilizados na indústria de alimentos, cosméticos, farmacêutica e como aditivos em rações (TANG et al., 2019).

Os carotenoides são precursores da vitamina A e auxiliam na melhora de algumas funções biológicas, fortalecendo o sistema imunológico, diminuindo o risco de doenças degenerativas, especialmente relacionadas à visão; como degeneração macular e catarata (SILVA, 2004; MESQUITA et al., 2017). Há estudos que destacam atividade antioxidante (GERELMAA et al., 2018), antimicrobiana (YOLMEH e KHOMEIRI, 2017), antitumoral (SHARMA e GHOSAL, 2020) e antiinflamatória de carotenoides produzidos por *Rhodotorula spp* (ROSTAMI et al., 2016).

O objetivo desse estudo foi otimizar a produção e investigar as atividades biológicas de pigmento obtido por fermentação submersa de *Rhodotorula minuta* e *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando como substrato a casca de maracujá – amarelo (*Passiflora edulis*).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar a produção e investigar as atividades biológicas de pigmento obtido por fermentação submersa de *Rhodotorula minuta* e *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando como substrato a casca de maracujá – amarelo (*Passiflora edulis*).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adquirir resíduo da casca de maracujá - amarelo (*Passiflora edulis*) e realizar análise da composição centesimal;
- Obter as espécies *Rhodotorula minuta* URM 5197 e *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409 e realizar manutenção das leveduras;
- Otimizar a produção de pigmento através da utilização da casca de maracujá - amarelo (*Passiflora edulis*) como substrato, por meio de matriz de Doehlert com variação da quantidade de substrato (gramas), pH e tempo (dias);
- Identificar as condições e o ponto ótimo de produção do pigmento pela metodologia de superfície de resposta, considerando os resultados encontrados pela matriz de Doehlert para produção do pigmento;
- Verificar qual das duas espécies de *Rhodotorula* (*Rhodotorula minuta* URM 5197 e *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409) melhor produz pigmentos com a casca de maracujá – amarelo (*Passiflora edulis*);
- Quantificar  $\beta$ -caroteno no extrato do pigmento através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Avaliar as atividades biológicas do pigmento produzido pela *R. minuta* e *R.mucilaginosa*.

### **3. DESENVOLVIMENTO**

#### **CAPITULO 1**

##### **ARTIGO DE REVISÃO**

**Revista escolhida para publicação:** Research, Society and Development (A3)

**Link do guia ao autor da revista:** <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/about/submissions>

**Lista de Autores****Thamilly Moreira Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1612-6954>

State University of Southwest Bahia, Brazil

E-mail: [thamillynutri@yahoo.com.br](mailto:thamillynutri@yahoo.com.br)

**Janaína Silva de Freitas**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7691-4701>

State University of Southwest Bahia, Brazil

E-mail: [janainafreitas@uesb.edu.br](mailto:janainafreitas@uesb.edu.br)

## Produção de carotenoides pelo gênero *Rhodotorula* utilizando resíduos agroindustriais

### Resumo

Algumas espécies de leveduras conseguem gerar substâncias de interesse biotecnológico, como as do gênero *Rhodotorula*, conhecidas por produzirem carotenoides intracelulares, dentre eles: o  $\beta$ -caroteno, toruleno e torularodina. Os carotenoides são metabólitos secundários que despertam o interesse de diferentes setores como a indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética e avícola, pois além de possuírem propriedades colorantes, são precursores da vitamina A e podem apresentarem atividades biológicas atrativas para o mercado. Essas leveduras também são reconhecidas por se adaptarem a diversos meios de cultivo, como os resíduos agroindústrias e crescerem em uma ampla faixa de temperatura entre 25 e 37°C. Por estarem presentes naturalmente em diferentes ambientes como água, solo, trato gastrointestinal, bem como ambientes extremos dentre eles o mar Morto ou em elevadas altitudes como na Patagônia, conseguem se ajustar a diferentes condições de cultivo. Nesse sentido, o objetivo dessa revisão foi demonstrar os principais avanços quanto à produção de pigmentos por diferentes espécies desse gênero utilizando resíduos agroindustriais como substrato para crescer.

**Palavras-chave:** Bioprocesso; Fermentação; Pigmentos

### 1. Introdução

Os pigmentos naturais podem ser obtidos por meio de plantas, animais e microrganismos (Heer & Sharma, 2017). Este último grupo tem despertado interesse, pois conseguem disponibilizar o pigmento de maneira mais rápida, não depende de um momento temporal específico e ainda existe a possibilidade de expansão da produção, utilizando menor espaço físico e substratos alternativos, como os resíduos agroindustriais (Venil et al., 2013; Sen et. al., 2019; Manimala & Murugesan, 2017). Se as condições ideais de cultivo forem encontradas, está pode ser uma opção mais viável financeiramente quando comparada a produção de pigmentos por outras fontes (Sharma & Ghoshal, 2020).

Os resíduos agroindustriais surgem durante a colheita, beneficiamento e produção agroindustrial, podem se apresentar em diferentes estados físicos, o que gera uma grande demanda quanto ao custo para coletar, descartar e tratar esses substratos. Dentro desse cenário ocasiona-se perda de matérias-primas, visto que as mesmas estão disponíveis em grande quantidade e possuem compostos com possibilidade de serem empregados em outros processos, indicando a perspectiva de um reaproveitamento de resíduos, o que desperta interesse do econômico e ambiental (Panesar, Kaur & Panesar, 2015).

Considerando os microrganismos produtores de pigmentos, as leveduras se sobressaem e apresentam um elevado potencial de produção, como as do gênero *Rhodotorula sp* e *Sporidiobolus sp* e as espécies *Phaffia rhodozyma* e *Sporobolomyces roseus* (Malik et al., 2012, Rodrigues et al., 2019; Machado & Burket, 2014).

Os processos fermentativos se destacam dentro desse panorama por proporcionar condições de cultivo de microrganismos e produção de metabólitos de interesse industrial. Inicialmente a escolha do agente biológico adequado é definidor; seguido com a transformação da matéria-prima, em condições que podem exigir esterilização, aeração e controle das variáveis do processo como pH e temperatura, sendo finalizado com a



separação e purificação do produto final (Malajovich, 2004).

*Rhodotorula* é um gênero de leveduras que consegue crescer e produzir carotenoides em meios de cultivo alternativos como: bagaço de mandioca (Manimala & Murugesan, 2017), glicerina residual da produção de biodiesel (Silva et al, 2020) e caldo de cana (Lobo, Brandão & Assis, 2021). Nessa perspectiva os carotenoides se destacam em relação aos outros pigmentos, pois apresentam diversas finalidades em relação ao uso, podem ser utilizados na indústria de alimentos, cosméticos, farmacêutica e ração. Além desses pigmentos servirem para colorir, podem também enriquecer os alimentos, por serem precursores da vitamina A e auxiliam na melhora de algumas funções biológicas fortalecendo o sistema imunológico, diminuindo o risco de doenças degenerativas, especialmente relacionadas à visão; como degeneração macular e catarata (Tuli et al., 2014; Mesquita et al., 2017; Aruldas et al., 2018).

Diante da importância dos carotenoides e as perspectivas biotecnológicas que estão inseridos referente a sua produção através de bioprocessos e aplicabilidade em diferentes setores da indústria, o objetivo dessa revisão foi demonstrar os principais avanços quanto à produção de pigmentos por diferentes espécies desse gênero utilizando resíduos agroindustriais como substrato para crescer.

## 2. Materiais e Métodos

Este trabalho é uma revisão narrativa da literatura. Os estudos citados foram identificados por meio de pesquisas eletrônicas na Scientific Electronic Library Online (SCIELO), Science Direct e Google Scholar, os descritores utilizados foram: pigments, microbial pigments, submerged fermentation, *Rhodotorula*, yeast and pigments, agroindustrial wastes, microbial carotenoids,  $\beta$ -carotene, torularhodin, torulene, bioprocess, natural pigments, carotenoid production e *Rhodotorula mucilaginosa*. Para essa revisão foram selecionados trabalhos científicos, cuja temática envolvia fermentação, espécies do gênero *Rhodotorula* e a produção do pigmento com o uso de resíduo agroindustrial como meio de cultivo disponíveis nas bases de dados citadas. Para a comparação entre os diferentes trabalhos foram excluídos estudos que abordavam a produção de pigmento por outras leveduras, fungos e bactérias.

## 3. Resultados e Discussão

### Leveduras do gênero *Rhodotorula*

De forma geral, as leveduras são unicelulares, de cor branca ou avermelhada, seu tamanho varia de 1 a 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 5 a 30  $\mu\text{m}$  de comprimento; quanto à forma podem apresentar-se esféricas, elípticas ou quase filamentosas. Possuem uma membrana citoplasmática formada por lipídeos e proteínas que regula as trocas com o meio externo e uma parede celular rígida. As leveduras são células eucarióticas, pois apresentam o núcleo separado do citoplasma, envolvido por uma membrana chamada carioteca. A reprodução pode ser sexuada, com formação de esporos ou assexuada, por brotamento, divisão binária ou formação de artroconídios (Hoog et al., 2000).

*Rhodotorula* são leveduras germinativas, assexuadas, consideradas basidiomicetos anamórficos, pertencentes a dois subfilos. A Pucciniomycotina, com 43 espécies, das quais 29 pertencentes a classe

Microbotryomycetes e as 14 restantes, a classe Cystobasidiomycetes. O outro subfilo é o *Ustilagomycotina*, constituído por três espécies (Coelho et al., 2011; Sampaio, 2011).

Quanto ao formato, as *Rhodotorula spp* possuem forma polifilética, podem ser subglobosas, ovoides, elipsoidais e alongadas (Tang et al., 2019). Esse gênero apresenta capacidade fermentativa baixa, não formam esporos, e em algumas situações podem formar pseudomicelios rudimentares, se reproduzindo por gemação multipolar. São leveduras que produzem pigmentos de diferentes tonalidades, entre vermelho, laranja, amarelo e rosa. Por conta da coloração característica, podem ser identificadas visualmente entre 24 a 48 horas após incubação, seu aspecto pode ser liso ou mucoso e conseguem crescer em um intervalo de temperatura de 25 a 37°C (Fell et al., 2000; Gan et al., 2017; Hoog et al., 2000; Kwon-Chung e Bennett, 1992).

No que diz respeito ao local onde são encontradas, as *Rhodotorula spp* normalmente estão distribuídas na natureza, tanto em ambientes com água, no próprio solo, como no trato gastrointestinal do ser humano (Costa, 1992). Podem também ser encontradas em ambientes extremos, como nos níveis mais profundos do mar, a exemplo o mar Morto, conhecido pela grande quantidade de sal dissolvido em suas águas, em elevadas altitudes como na Patagônia; no solo e vegetação, presente na Antártida (Querol e Fleet, 2006; Wirth & Goldani, 2012).

Além dos ambientes citados, existe relato da presença do gênero *Rhodotorula* em infecções hospitalares, especialmente por infecção da corrente sanguínea em imunodeprimidos (Loss et al., 2013). Os relatos de infecções hospitalares decorrentes desse gênero passaram a ser relatadas depois de 1985, provavelmente porque após esse ano houve uma ampliação de tratamentos intensivos e uso do cateter central nos hospitais (Miceli, Díaz & Lee, 2011). Além do uso de cateter central (Ioannou, Vamvoukaki & Samonis, 2018), existem outros fatores de risco para desenvolvimento de infecção por *Rhodotorula spp* como imunossupressão, exposição a antifúngicos e a presença de câncer sólido ou hematológico (Potenza et al., 2018).

Apesar de existirem algumas espécies patogênicas, sabe-se que a espécie *R. mucilaginosa* se destaca por produzir carotenoides em maior quantidade se comparada a outras espécies do mesmo gênero, isso indica a possibilidade de seu uso para este fim (Gan et al., 2017). Esse grupo de leveduras também tem a capacidade de produzir outras substâncias como: lipídeos por *R. toruloides* (Lopes et al., 2020), *R. glutinis* R4 (Maza et al., 2020), *R. glutinis* LOCKR13, *R. mucilaginosa* ATCC 66034 e *R. gracilis* ATCC 10788 (Kot et al., 2019); biosurfactante por *R. babjevae* YS3 (Sen et al., 2017); e polissacarídeo extracelular por *R. mucilaginosa* YL-1 (Li et al., 2020) e *R. minuta* ATCC 10658 (Samadlouie, Jahanbin & Jalali, 2020).

É possível notar que o gênero *Rhodotorula* está presente em diversos ambientes e apresenta potencial para produção de diferentes metabólitos em distintas condições de cultivo, com possibilidade de aplicação em vários segmentos da indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. Esse panorama influencia pesquisadores a estudarem bioprocessos com o intuito de otimizar a produção de biomoléculas, bem como obter a substância desejada com o menor custo possível, visando uma produção em escala industrial.

### **Bioprocessos: Tipos de Fermentação**

Bioprocesso se refere a um conjunto de etapas envolvidas na obtenção de determinado produto, sintetizado por células vivas inteiras de animais, plantas, microrganismos ou enzimas, em condições previamente estabelecidas e controladas, onde ocorre a biotransformação de matéria-prima em produto; o qual é separado e purificado finalizando o processo (Aquarone et al., 2001; Pereira, Bon & Ferrara, 2008).

Os bioprocessos relacionados ao uso de microrganismos ocorrem através da fermentação. Essa técnica é uma via de degradação anaeróbia da glicose, bem como de outros nutrientes orgânicos, com a finalidade de obter energia, conservada na forma de adenosina trifostato (ATP); já que a molécula de glicose ou mesmo outro tipo de substrato que tenha carboidrato, seja quebrado para gerar o piruvato. Durante o processo de evolução, a sequência de reações químicas dessa via foi conservada, há similaridade entre as enzimas glicolíticas em diferentes seres vivos, apesar de haver algumas diferenças em relação a regulação e o destino metabólico do piruvato que se forma (Nelson & Cox, 2014).

Existem dois tipos principais de cultivo: fermentação em estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FS). A FES pode ser definida como uma técnica onde o crescimento dos microrganismos acontece no interior de partículas porosas úmidas, no qual o líquido contido na matriz sólida deve ser mantido em valores de atividade de água, que assegure o crescimento e metabolismo celular; desde que não ultrapasse a capacidade máxima de retenção de água na matriz (Pandey, 2003). Já a FS é uma técnica na qual um microrganismo é introduzido em um meio líquido na forma de inóculo, geralmente permanecem em fermentadores com agitação e aeração controlados, correção de pH e temperatura, propiciando maior acessibilidade dos nutrientes por parte dos microrganismos, por serem inseridos em um meio de cultivo homogêneo (Malajovich, 2004; Wanderley, Neves & Andrade, 2011).

Os sistemas de FES e FS oferecem vantagens e desvantagens. Comparando a FES com a FS, as principais vantagens são a alta produtividade e concentração dos produtos facilitando a sua extração, menor requerimento de espaço e energia, além da possibilidade de utilizar meio de cultivo simples que pode ser similar as condições de crescimento do microrganismo na natureza, risco de contaminação menor por utilizar quantidade reduzida de água e necessita de menor investimento financeiro. Apesar dessas vantagens existem algumas desvantagens que devem ser consideradas como a dificuldade para controle de algumas variáveis dentre elas pH, temperatura, umidade e crescimento celular, além de necessitar de grandes volumes de inóculo (Pandey, 2003; Leite et al., 2021).

Dentre as vantagens do processo da FS comparado a FES se destaca a facilidade para manipular maior volume de meio de cultura, submersão total da massa de microrganismo no meio uniformemente, melhor absorção dos nutrientes pelo microrganismo e excreção de metabólitos de forma mais eficiente, diminuindo o tempo de fermentação e influenciando a produtividade (Pereira Jr, Bon & Ferrara, 2008). Entretanto, apesar das vantagens descritas, a FS apresenta algumas desvantagens, especialmente o fato de ser mais susceptível a contaminação, porque tem uma maior quantidade de água livre. Outro fator que deve ser considerado é a viabilidade econômica, pois ao ser comparada com a FES, a FS apresenta um maior custo para ser realizada, isso em algumas situações, pode ser um fator inviabilizador do processo (Pinheiro, 2006).

Nesse sentido, considerando que todo processo tem vantagens e desvantagens, cabe ao pesquisador avaliar qual técnica melhor se adequa ao seu experimento considerando o microrganismo e o que pretende obter através do processo fermentativo. A maioria dos estudos envolvendo a produção de pigmento pelo gênero *Rhodotorula* utiliza a fermentação submersa como meio de cultivo (Manimala & Murugesan, 2017; Rodrigues et al., 2019; Machado et al., 2019; Kot et al., 2020; Sharma & Ghoshal, 2020; Lobo, Brandão & Assis, 2021).

Além de verificar a possibilidade da levedura crescer em diferentes substratos e produzir o pigmento, também ocorrem abordagens de otimização nas condições de cultivo que envolvem a escolha do substrato para

crescimento e combinação de variáveis como: regulação da luz, temperatura, adição de íons metálicos e pH que podem interagir e ocasionar uma melhor produção do pigmento (Silva et al., 2020; Tang et al., 2019).

### **Pigmentos naturais produzidos por *Rhodotorula spp***

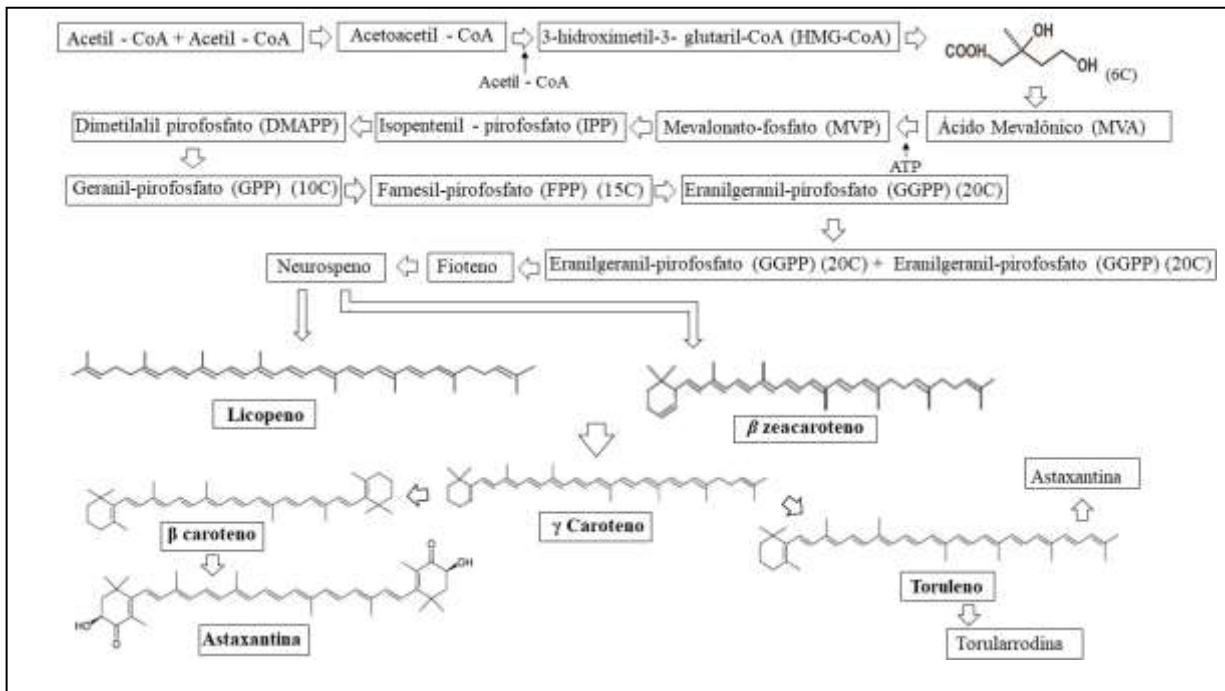
Os pigmentos naturais são oriundos de plantas, insetos ou microrganismos e tem maior aceitabilidade quando comparados aos pigmentos sintéticos, pois são mais estáveis, seguros e apresentam maior rendimento (Mapari et al., 2005). Dessa maneira, a produção de pigmentos naturais, a partir de bioprocessos tem se tornado uma área promissora, especialmente pela possibilidade de produzir em escala industrial. Nesse sentido, para produção de substâncias aliadas a processos biotecnológicos se faz necessário conhecer as condições de cultivo adequadas, pois as mesmas afetam o crescimento celular e a produção do pigmento (Liu & Wu, 2007).

Considerando as fases do crescimento de um microrganismo, o gênero *Rhodotorula* é formado por leveduras aeróbicas estritas que conseguem produzir glicogênio durante a fase de crescimento e grande quantidade de lipídios e carotenóides na fase estacionária (Dworecka-Kaszak & Kizerwetter-Swida, 2011; Hernández-Almanza et al., 2014), diante disso, esse grupo de leveduras é conhecido pela biossíntese intracelular de carotenoides (Tang et al., 2019).

Os carotenoides são isoprenóides, mais especificamente tetraterpenos com quarenta carbonos, formados por oito unidades de isoprenos (5C), com um sistema de duplas ligações conjugadas organizadas em um padrão de união cabeça-cauda. A ordem da dupla ligação invertida apenas na parte central da molécula influencia suas propriedades químicas, físicas e bioquímicas, sendo possível que as cadeias apresentem grupos terminais cíclicos, com a presença do oxigênio (Gómez-Garcia e Ochoa-Alejo, 2013). As duplas ligações conjugadas na molécula, são o cromóforo que permite a absorção da luz e conseqüentemente dão cor ao composto (Uenojo, Maróstica Junior & Pastore, 2007).

O processo biossintético de produção de carotenoides em leveduras é dividido em três momentos: o caminho do mevalonato, a biossíntese de isopreno e o caminho carotenogênico (Frengova & Beshkova, 2009; Mizioro, 2011; Hernández-Almanza et al., 2014). Na figura 1 ocorre a representação dessa via biossintética da produção de carotenoides por leveduras.

**Figura 1** - Biossíntese de carotenoides em leveduras.



Fonte: Adaptado de Frengova & Beshova (2009).

Na primeira etapa duas moléculas de Acetil-CoA se unem e formam o Acetoacetil-CoA, que se une a mais uma molécula de Acetil-CoA originando o 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Esse composto forma posteriormente o Ácido Mevalônico (MVA), com seis carbonos, que se transforma em Mevalonato-fosfato (MVP), iniciando a segunda etapa da síntese de carotenoides por leveduras. A biossíntese de isopreno ocorre a partir da transformação do MVA em MVP. Ao fim da sequência de reações ocorre a formação do Isopentenil – pirofosfato (IPP) e subsequentemente em Dimetilalil pirofosfato (DMAPP). O que se sabe, é que a adição em sequência de moléculas de IPP, à DMAPP formam o Geranyl-pirofosfato (GPP) com dez carbonos, o Farnesil-pirofosfato (FPP) com quinze carbonos e ao fim, o Eranilgeranyl-pirofosfato (GGPP), com 20 carbonos. A terceira e última fase se inicia quando ocorre a condensação de duas moléculas de GGPP originando o fioteno que é o primeiro caroteno com 40 carbonos, esse sofre dessaturação para formar para formar o neurospeno, que se transforma em licopeno ou β-zeacaroteno. Ambos formam o γ-caroteno, que se subdivide e pode formar o β – caroteno, que se continuar as reações origina a astaxantina ou toruleno; que pode gerar torularrodina ou seguir outra via, formando também a astaxantina (Frengova & Beshkova, 2009; Mizioro, 2011; Hernández-Almanza et al., 2014).

De forma geral os carotenoides principais produzidos por diferentes espécies de *Rhodotorula* (*R. glutinis*, *R. rubra*, *R. araucariae*, *R. lactosa*, *R. minuta*) são torularrodina, toruleno, γ-caroteno e β-caroteno (Squina & Mercadante, 2003). Sabe-se que diferentes espécies de *Rhodotorula* produzem carotenoides, variando o subtipo entre as espécies. A *R. glutinis* e a *R. mucilaginoso* produzem em maior quantidade torularrodina, β-caroteno e toruleno, enquanto que a *R. graminis* apenas toruleno. A *R. rubra* produz o β - caroteno (Valduga et al., 2009).

A depender das condições de cultivo *Rhodotorula spp* podem sintetizar os pigmentos em proporções

diferentes. A *Rhodotorula mucilaginosa* em pH 5 e temperatura de 25°C produz 28,8% de  $\beta$ -caroteno, 48% de toruleno e 23,2% de torularodina (Cheng & Yang, 2016). Enquanto que no estudo de Kot et al. (2019) houve um aumento significativo na proporção de  $\beta$ -caroteno quando a levedura foi submetida a baixa temperatura e estresse osmótico. Os mesmos autores identificaram que ao serem submetidas a um estresse oxidativo as leveduras do gênero *Rhodotorula* produzem mais toruleno do que nas condições controles. Por fim a irradiação promoveu uma maior produção de torularodina para *R. glutinis* e *R. mucilaginosa* e toruleno para *R. gracilis*.

Nota-se que o gênero *Rhodotorula* consegue se adaptar, crescer e produzir carotenoides em diferentes condições de temperatura, sob estresse e ainda em diferentes meios de cultivo, isso demonstra a versatilidade desse microrganismo.

### **Produção de carotenóides por *Rhodotorula spp* utilizando resíduos agroindustriais**

De acordo com a norma brasileira NBR 10004/2004, os resíduos agroindustriais podem ser sólidos ou semissólidos, oriundos da indústria, domicílios, ambiente hospitalar, comércios e atividade agrícola (ABNT, 2004). Dentro desse contexto, o resíduo é algo decorrente de um processamento e a priori não se tem uma aplicação.

As agroindústrias apresentam relevância econômica no planeta, mas existe um contraponto que se refere à produção em grande escala de resíduos e subprodutos que advém das etapas que envolvem o processamento dos produtos (Rodrigues et al., 2014). Por não apresentarem valor financeiro, os resíduos são vistos apenas como sobras de um processamento, podem passar por tratamento e são descartados pelas indústrias. Já os subprodutos se diferem dos resíduos, pelo fato de serem sobras que podem ter uma aplicação posterior referente a elaboração de outros produtos. Apesar dessa diferença, também não apresentam valor comercial considerável (Biff & Silva, 2016).

Em relação à composição, tanto os resíduos como os subprodutos são constituídos basicamente por carbono, nitrogênio e alguns minerais oriundos da matéria-prima utilizada (Xue et al., 2010). De forma geral, resíduos agrícolas e subprodutos possuem muita matéria orgânica e por consequência elevado teor de demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO), o que requer tratamento antes do descarte no meio ambiente, gerando custos para as empresas. Entretanto, o que ocorre na maioria das vezes é um descarte inadequado gerando diversos impactos ambientais (Markou & Georgakakis, 2011).

As degradações e impactos ambientais advém em algumas situações do descarte inadequado de resíduos gerados por diferentes setores, e se faz necessário encontrar maneiras para reverter esse cenário. Para tanto, alternativas são estudadas para que seja possível o aproveitamento econômico de forma sustentável (Menezes et al., 2012).

Diversos resíduos agroindustriais têm sido utilizados como substratos para produção de metabolitos com alto valor agregado, sendo esses: proteínas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e pigmentos (Sanchés, 2009). As leveduras conseguem crescer a partir de diversos resíduos agroindustriais como substrato, sendo o mesmo de baixo custo e grande disponibilidade, como exemplo: o caldo ou melaço de cana-de-açúcar, soro do leite, mosto de uva, farinha de feijão hidrolisada, extratos de soja, farinha de milho e salmoura de rabanete (Schneider et al., 2013).

Vale ressaltar que a composição do meio de cultivo é determinante para a produção da substância de

interesse, portanto, deve apresentar em sua composição macronutrientes assimiláveis, representados por fontes de carbono e nitrogênio, bem como micronutrientes (ferro, manganês, entre outros) e fatores de crescimento como as vitaminas (Wanderley et al., 2011).

Alguns estudos publicados em revistas científicas, sobre o crescimento de leveduras e produção de pigmentos através de meios alternativos, demonstram que diferentes fontes de carbono e nitrogênio podem ser utilizadas como substrato para crescimento do microrganismo (Tabela 1).

**Tabela 1.** Produção de pigmentos por *Rhodotorula spp* utilizando resíduos agroindustriais como substrato.

<b>Microrganismo</b>	<b>Meio de Cultivo (Substrato)</b>	<b>Pigmento Produzido</b>	<b>Autores</b>
<i>Rhodotorula glutinis</i> DBVPG 6439	Mosto de uva	Carotenoides totais	(Buzzini & Martini, 2000)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Farinha hidrolisada de resíduo feijão + extrato de batata doce	Carotenoides Totais	(Tinoi et al., 2005)
<i>Rhodotorula glutinis</i> DM28	Salmoura rabanete fermentada	$\beta$ -caroteno	(Malisorn & Suntornsuk, 2008)
<i>Rhodotorula glutinis</i> MT- 5	Peptona de penas de galinha	Carotenoides Totais	(Taskin et al., 2011)
<i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Rhodotorula aurantiaca</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Resíduos de glicerol da produção de biodiesel ou mistura de glicerol e glicose	Pigmentos Totais	(Petrik et al., 2013)
<i>Rhodotorula sp</i> RA2; <i>Rhodotorula minuta</i> RY1; <i>Rhodotorula minuta</i> RAI3; <i>Rhodotorula acheniorum</i> RC2.	Água de coco ou arroz	Pigmentos Totais	(Yadav & Prabha, 2014)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> F-1	Sobra de alimentos (ketchup, melão de cana e bebidas saudáveis).	Carotenoides Totais	(Cheng & Yang, 2016)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Bagaço de mandioca	Carotenoides Totais	(Manimala & Murugesan, 2017)
<i>Rhodotorula marina</i>	Glicerina bruta e levedura de cerveja usada.	Carotenoides Totais	(Rodrigues et al., 2019)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Bagaço de laranja ( <i>Citrus sinensis</i> ) + melão de cana de açúcar	Carotenoides Totais	(Machado et al., 2019)

<i>Rhodotorula minuta</i> URM 6693 e <i>Rhodotorula glutinis</i> URM 6695	Glicerina residual da produção de biodiesel	Carotenoides Totais e $\beta$ -caroteno	(Silva et al., 2020)
<i>Rhodotorula gracilis</i> ATCC 10788	Água residual de batata e fração de glicerol	Carotenoides Totais e $\beta$ -caroteno	(Kot et al., 2020)
<i>Rhodotorula mucilaginoso</i> (MTCC-1403)	Cascas de cebola, batata, feijão e vagens de ervilha	Carotenoides Totais	(Sharma & Ghoshal, 2020)
<i>Rhodotorula mucilaginoso</i>	Caldo de cana	Carotenoides Totais e $\beta$ -caroteno	(Lobo, Brandão & Assis, 2021)
<i>Rhodotorula minuta e</i> <i>Rhodotorula mucilaginoso</i>	Casca de maracujá - amarelo ( <i>Passiflora</i> <i>edulis</i> )	Pigmentos Totais, Carotenoides Totais e $\beta$ -caroteno	(Silva et al., 2021)

Esses estudos indicam que a possibilidade de utilizar diferentes resíduos agroindustriais como fonte de carbono e nitrogênio em bioprocessos e na produção de metabólitos. O gênero *Rhodotorula* demonstrou uma adaptabilidade considerável, pois em diferentes composições de meio, cresceu e produziu pigmentos. Além disso, o uso de meio de cultivo alternativo diminui o custo de produção e os impactos ambientais decorrentes do descarte desses resíduos, oriundos dos processos industriais. Existe ainda a possibilidade de utilizar a biomassa celular produzida através de um processo fermentativo, após retirada dos solventes, na composição de ração animal, visto que esta é constituída basicamente por proteínas e polissacarídeos (Kot et al., 2016).

Apesar desses benefícios, existem dificuldades relacionadas ao processo de extração do pigmento, uma vez que a produção dos carotenoides é intracelular. É de conhecimento geral que a estrutura da parede celular confere resistência e rigidez a célula, atuando também como uma espécie de obstáculo quando se pretende acessar os compostos produzidos. Por isso, busca-se o isolamento e purificação, dos mesmos, a partir de técnicas de ruptura celular (Squina e Mercadante, 2003; Michelin et al., 2012; Monks et al., 2013).

Dentre as metodologias de extração sobressaem a extração mecânica, química e supercrítica. Na extração mecânica há uma ruptura por abrasão da parede celular com pérolas de vidro ou mesmo com o uso do ultrassom (Medeiros et al., 2008). A extração química ocorre por meio de solventes (etanol, isopropanol, butanol e acetona) capazes de romper a parede celular do microrganismo e permitir o acesso aos biocompostos intracelulares (Monks et al., 2013) e a extração supercrítica é baseada na extração através da exposição da substância a altas temperaturas e pressões, sendo esses valores superiores ao ponto crítico, existe a formação do fluido supercrítico (Taylor, 1996).

Park et al. (2007) ao estudarem o efeito de diferentes solventes para recuperar os carotenoides, testaram vários solventes, os que apresentaram melhor resultado quanto a extração do pigmento foram o éter de petróleo, DMSO e a acetona. Dessa forma, a tentativa de se extrair o máximo de pigmentos utilizando diferentes metodologias, conduz os pesquisadores a aperfeiçoar o processo de extrações e recuperar o máximo de pigmento produzido, principalmente quando se pensa na produção biotecnológica de carotenoides a nível industrial.



#### 4. Conclusões

A produção de carotenoides intracelulares por leveduras, é de grande importância para a indústria e para pesquisadores que tem uma linha voltada para obtenção de produtos naturais por bioprocessos, uma vez que o maior interesse desse setor é a produção em grande quantidade da substância estudada, com o mínimo de recursos materiais possíveis. Nesse contexto, o gênero *Rhodotorula* tem se destacado, por produzir uma série de substâncias bioativas, ressaltando-se os carotenoides e pelo fato de se adaptarem a diversos meios de cultivo constituídos apenas por resíduos agroindustriais que conseguem atender as demandas de nitrogênio e carbono para o crescimento do microrganismo. Dentro desse gênero, a *R.glutinis* e *R.mucilaginosa* são estudadas na maioria dos trabalhos científicos atuais, pois possivelmente tem uma melhor adaptação a diferentes meios de cultivo e produzem uma maior quantidade de pigmento, então, além da produção deve ser levado em conta a quantidade produzida para que o microrganismo seja considerado adequado para estudos sobre uma produção industrial. Portanto, outra questão fundamental a ser considerada nesse processo é a forma de extração do pigmento, já que o objetivo é aproveitar o máximo possível do pigmento otimizando sua extração, a combinação entre extração mecânica e por solventes tem demonstrando melhor recuperação da substância. São necessários mais estudos com outras espécies desse gênero, para elucidar quais realmente tem um melhor potencial de produção e recuperação do pigmento através dos métodos de extração, bem como quais seriam os melhores resíduos agroindustriais para o crescimento dessas leveduras e quais seriam as atividades biológicas dos diferentes pigmentos produzidos.

## CAPITULO 2

### ARTIGO ORIGINAL

**Publicado em:** Research, Society and Development (A3)

**Link do guia ao autor da revista:** <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/about/submissions>

SILVA, T. M.; SILVA NETO, A. B. da; TEIXEIRA, J. M.; CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; GUALBERTO, S. A.; FREITAS, J. S. de. Optimization of pigment production by *Rhodotorula minuta* URM 5197 and *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409 using yellow passion fruit peel (*Passiflora edulis*). **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 17, p. e152101724311, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i17.24311. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/24311>.

**Lista de Autores****Thamilly Moreira Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1612-6954>

State University of Southwest Bahia, Brazil

E-mail: [thamillynutri@yahoo.com.br](mailto:thamillynutri@yahoo.com.br)

**Abdias Batista da Silva Neto**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0508-279X>

State University of Southwest Bahia, Brazil

E-mail: [abdiasxd@gmail.com](mailto:abdiasxd@gmail.com)

**Jabson Meneses Teixeira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4139-1699>

State University of Santa Cruz, Brazil

E-mail: [jabsonmeneses@gmail.com](mailto:jabsonmeneses@gmail.com)

**Carlos Bernard Moreno Cerqueira - Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1883-4543>

State University of Southwest Bahia, Brazil

E-mail: [csilva@uesb.edu.br](mailto:csilva@uesb.edu.br)

**Simone Andrade Gualberto**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1753-002X>

State University of Southwest Bahia, Brazil

E-mail: [sagualberto@uesb.edu.br](mailto:sagualberto@uesb.edu.br)

**Janaína Silva de Freitas**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7691-4701>

State University of Southwest Bahia, Brazil

E-mail: [janainafreitas@uesb.edu.br](mailto:janainafreitas@uesb.edu.br)

## Otimização da produção de pigmentos por *Rhodotorula minuta* URM 5197 e *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409 utilizando casca de maracujá - amarelo (*Passiflora edulis*)

### Resumo

O objetivo desse trabalho foi produzir e otimizar a produção de pigmentos por *Rhodotorula minuta* e *Rhodotorula mucilaginosa* através de fermentação submersa, utilizando a casca de maracujá - amarelo (*Passiflora edulis*), como único substrato. As variáveis independentes avaliadas em relação a otimização foram: casca de maracujá-amarelo (CMA), em gramas (g) como meio de cultivo, pH e tempo de fermentação, em dias. O estudo da produção do pigmento e sua otimização foi realizado através da matriz de Doehlert, com quinze condições experimentais, das quais treze apresentavam diferentes combinações e duas repetiam o ponto central. As variáveis fixas foram 30°C e 150 rpm. A análise dos dados foi realizada a partir do Software Statistica versão 10.0. A maior quantidade de pigmentos totais e carotenoides totais produzidos pela *R. minuta* foi 28±0.01 mg/L e 72.8±0.026 µg/g, respectivamente; enquanto que para *R. mucilaginosa* a produção de pigmentos totais foi 37±0.002 mg/L e de carotenoides totais 236.8±0.013 µg/g. O ponto ótimo de produção de pigmentos totais para *R. minuta* foi 2,3g de CMA, pH 6,5 e 5 dias e para *R. mucilaginosa* 2,5g de CMA, pH 6 e 5 dias. Nas amostras de pigmentos totais foi identificada a presença 0,29mg/L de β-caroteno para *R. minuta* e 0,83 mg/L para *R. mucilaginosa*. É possível concluir que a casca de maracujá-amarelo pode ser utilizada como fonte de nutriente para crescimento das *Rhodotorula spp* e produção de pigmento com carotenoides totais e β-caroteno em sua composição.

**Palavras-chave:** Bioprocessos; Carotenoides; Resíduos Agroindustriais; Superfície de resposta

### 1. Introdução

Os pigmentos naturais podem ser obtidos por meio de plantas, animais e microrganismos (Heer & Sharma, 2017). Esse último grupo tem despertado interesse, quando comparado com os outros, pois consegue disponibilizar o pigmento de maneira imediata, não depende da sazonalidade, viabiliza expansão da produção, utiliza menor espaço físico e pode ser cultivado em substratos alternativos, como os resíduos agroindustriais (Venil et al., 2013; Manimala & Murugesan, 2017; Sen et al., 2019).

Estes substratos, na maioria das vezes surgem do processamento de frutas destinadas a produção de polpas, e podem ser constituídos por casca, caroço, sementes e bagaço (Viana & Cruz, 2016). Sabe-se que degradações e impactos ambientais advém em algumas situações do descarte inadequado de resíduos gerados por diferentes setores, o que torna necessário encontrar alternativas viáveis para reverter esse cenário (Menezes et al., 2012).

Alguns estudos relatam, a possibilidade de reutilizar resíduos da indústria para o crescimento de microrganismos e produção dos metabólitos de interesse, onde ao mesmo tempo que esse substrato atua como fonte de carbono e nitrogênio, age na preservação e mitigação do meio ambiente (Panesar et al., 2015; Kot et al., 2016). Nesse contexto, o Brasil é um dos maiores produtores de maracujá do mundo e 95% deste produto é destinado as indústrias de sucos que geram muitos resíduos de cascas do fruto (Cavalcante & Melo, 2019).

Com relação a produção de pigmentos por microrganismos, o gênero *Rhodotorula* é conhecido por produzir pigmentos naturais denominados carotenoides que podem apresentar-se em tonalidade amarela, laranja e vermelha; e são utilizados na indústria farmacêutica, química, alimentícia e de rações, pois além de colorir, atuam como precursores da vitamina A e podem apresentar atividades biológicas (Guzman et al., 2010; Mata-Gómez et al., 2014; Mussagy et al., 2018; Aruldas et al., 2018; Manimala & Murugesan, 2018; Nabi et al., 2020).

Nesse contexto, os carotenoides são considerados isoprenóides, mais especificamente tetraterpenos com quarenta carbonos, constituídos por oito unidades de isoprenos (5C); com um sistema de duplas ligações conjugadas, que seguem um determinado padrão de união cabeça-cauda (Delgado-Vargas & Peredes-López, 2002). A ordem da dupla ligação invertida apenas na parte central da molécula, interfere diretamente em suas propriedades químicas, físicas e bioquímicas, sendo possível que as cadeias apresentem grupos terminais cíclicos, com a presença do oxigênio (Gómez-Garcia & Ochoa-Alejo, 2013). As duplas ligações conjugadas na molécula, são o cromóforo que permite a absorção da luz e por consequência, dão cor ao composto, sendo essa facilmente visualizada (Weedon & Moss, 1995).

Dessa maneira, esse estudo avaliou a possibilidade de produzir e otimizar a produção de pigmentos totais por *R. minuta* e *R. mucilaginosa* através de fermentação submersa, utilizando a casca de maracujá - amarelo (*Passiflora edulis*) como único substrato.

## **2. Metodologia**

### **2.1 Coleta e Preparo do Resíduo**

A matéria-prima utilizada foi a casca de maracujá - amarelo (*Passiflora edulis*), resíduo gerado durante processamento para produção de sorvetes. O resíduo foi obtido na cidade de Itapetinga, BA, Latitude: 15° 15' 23" Sul, Longitude: 40° 15' 27" Oeste. Após higienização foi reduzido a partes menores e seco (72 horas, 50°C) em estufa (SOLAB – SL 102). Posteriormente foi triturado em moinho de facas Willey (ACB LABOR), com granulometria de 2 mm.

### **2.2 Composição Centesimal do Resíduo de Casca de Maracujá - Amarelo (*Passiflora edulis*)**

A análise da composição centesimal do resíduo foi realizada pelo Laboratório de Forragicultura, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus de Itapetinga-BA. Foi utilizada a metodologia de Van Soest et al. (1991) e AOAC (2016).

### **2.3 Obtenção dos Microrganismos e Técnicas de Manutenção**

As leveduras *R. minuta* (isolada da ração da bandeja do recinto de psitacídeos) e *R. mucilaginosa* (isolada do solo) foram adquiridas da Coleção de Cultura de Microrganismos da Universidade Federal de Pernambuco - Micoteca URM – UFPE. Para garantir a viabilidade das espécies foram utilizadas quatro técnicas de manutenção: repicagem contínua - (método de curto prazo), óleo mineral - (método de médio prazo), água

esterilizada - (método de médio prazo) e congelamento comum - (método de médio prazo) (Sola et al., 2012).

#### **2.4 Planejamento Experimental: Matriz de Doehlert**

No planejamento experimental, os efeitos avaliados em relação a produção de pigmentos pelas leveduras foram: Casca de maracujá-amarelo (g) como meio de cultivo, pH e tempo de fermentação, em dias. O estudo da produção do pigmento e sua otimização foi realizado através da matriz de Doehlert, com quinze condições experimentais, das quais treze apresentaram diferentes combinações e duas repetições no ponto central. As variáveis fixas foram 30°C e 150 rpm. As quinze condições experimentais foram determinadas a partir de testes preliminares e realizadas em triplicata. A análise dos dados foi realizada a partir do Software Statistica versão 10.0.

#### **2.5 Preparo do Inóculo, Meio de Cultura e Padronização do pH**

A obtenção do inóculo ocorreu através do cultivo da *R.minuta* e da *R.mucilaginosa*, em Erlenmeyers (250 mL), com 100 mL do caldo YM; sob agitação de 150 rpm, a 30°C, por 48 horas. Os inóculos foram transferidos para o meio de cultura (total 100ml), a uma concentração de 10% (v/v) e uma biomassa inicial estimada de 10<sup>8</sup> UFC/ml (Silva et al., 2020). Para cultivo das leveduras foi utilizado meio de cultivo composto apenas por casca de maracujá - amarelo (*Passiflora edulis*), de acordo com as combinações propostas pela matriz de Doehlert. O pH do meio de cultivo de todos os ensaios foi padronizado com ácido sulfúrico (2M) ou hidróxido de sódio (2M).

#### **2.6 Extração dos pigmentos**

A extração do pigmento foi realizada a partir de uma adaptação da proposta por Moliné et al. (2012), em quatro etapas. Na primeira etapa ocorre uma centrifugação (Centrífuga refrigerada - CIENTEC 6000R) do fermentado após filtração, a 3000xg, por 5 minutos. O meio de cultivo foi retirado e o “*pellet*” foi separado com água destilada estéril e o sobrenadante descartado. Na segunda etapa foi utilizado 1mL de DMSO (Dimetil sulfóxido), associado ao “*pellet*” e submetidos a agitação em vórtex (AP 56 - Phoenix Lufenco), por 1 minuto. A mistura foi incubada em banho-maria (CT - 266 - CIENTEC), por 1 hora, a 55°C. Em seguida centrifugada a 3000xg, por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e armazenado a -20°C, em tubos Falcon, com proteção contra a luz. Para terceira etapa foi adicionado 1mL de acetona P.A ao “*pellet*”, seguido de agitação em vórtex, por 1 minuto e posterior centrifugação 3000xg, por 5 minutos. A segunda e terceira etapa foram repetidas até extração exaustiva. A última etapa uniu as frações de acetona e DMSO. Em seguida foi adicionado 2 mL de éter de petróleo (35°C – 65°C) e 0,5mL de solução saturada de NaCl, a 5°C. A mistura foi agitada em vórtex, por 15 segundos e submetida a centrifugação 3000xg, por 10 minutos; a uma temperatura de 5°C. Foi coletada a fase éter de petróleo com os pigmentos e armazenada em tubos Falcon, enrolados em papel alumínio. Os tubos Falcon permaneceram em temperatura ambiente até evaporação total do éter e obtenção do extrato.

## 2.7 Métodos Analíticos

### 2.7.1 Determinação de carotenoides totais

Após obtenção do extrato de pigmentos totais, a determinação da concentração de carotenoides totais foi realizada em espectrofotômetro, a uma absorvância de 448 nm. Os resultados da concentração de carotenoides totais foram obtidos através da Equação (1), expressos em termos de seu principal carotenoide, o  $\beta$ -caroteno (absortividade específica em éter de petróleo de 2592, obtido experimentalmente) (Davies, 1976; Moriel et al., 2005).

$$TC = \frac{A \times V \times 10^6}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \times 100 \times m_{\text{amostra}}}$$

Onde: TC = carotenoides totais ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ); A = absorvância; V = volume (mL);  $m_{\text{amostra}}$  = massa celular seca (g);  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$  = absortividade específica. Para calcular os carotenoides totais ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) com os resultados da concentração específica e da concentração de biomassa, foi realizada a conversão de unidades.

### 2.7.2 Identificação e quantificação do $\beta$ - caroteno por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O  $\beta$ -caroteno foi identificado e quantificado por CLAE de acordo com adaptação da metodologia utilizada por Silva et al. (2020). Os extratos obtidos foram suspensos em 1mL de metanol e acetona HPLC (9:1) e transferidos para frascos de 2mL com tampa e embrulhados em folha de alumínio para limitar o acesso à luz e minimizar a degradação dos carotenoides. Uma alíquota de 20 $\mu$ L de cada amostra foi injetada manualmente no HPLC analítico Shimadzu, com bomba binária. A coluna utilizada foi do tipo C18 Supelco (25cm x 4,6mm x 5  $\mu$ m) e a fase móvel foi de acetonitrila/acetato de etila/metanol, pré-sonificada, numa proporção de 10:40:50 (v/v/v), mantida até o final da corrida de 25 minutos/amostra, sob um fluxo de 0,6mL/min, com comprimento de onda de 460nm, a temperatura ambiente. A curva de calibração para quantificação do  $\beta$ -caroteno foi construída com diferentes concentrações do padrão submetidas a CLAE através dessa metodologia.

## 2.8 Análise Estatística

Os valores encontrados para a produção de pigmentos foram analisados através do programa Statistica 10, por meio da análise de variância (ANOVA), diagrama de Pareto e gráfico de superfície de resposta.

## 3. Resultados e Discussão

A composição centesimal do resíduo escolhido indica que a casca de maracujá amarelo pode ser utilizada como fonte de nitrogênio e de carboidrato para o crescimento do microrganismo, pois possui 12,93% de proteína bruta, 1% de extrato etéreo, 7,35% de material mineral, 49,09% de fibra detergente neutro - FDN (8,94% lignina + 29,5% celulose + 10,65% hemicelulose), 38,44% de fibra detergente ácido - FDA (8,94% lignina + 29,50% celulose) e 0,36% cinzas.

Com essa composição, a casca de maracujá - amarelo, foi efetiva como substrato para o crescimento das

duas espécies de leveduras estudadas. Sabe-se que o resíduo com uma maior quantidade de compostos lignocelulósicos (lignina, celulose e hemicelulose) tem um maior potencial para gerar açúcares fermentáveis funcionando como substrato para o crescimento da levedura e produção dos pigmentos (Silva et al., 2020).

Estudos anteriores, demonstram que o gênero *Rhodotorula* é capaz de crescer e produzir pigmentos em diferentes meios de cultivo alternativos, dentre eles: salmoura de rabanete fermentada (Malisorn & Suntornsuk, 2008); peptona de penas de galinha (Taskin et al., 2011); resíduos de glicerol da produção de biodiesel com glicose (Petrik et al., 2013); água de coco ou arroz (Yadav & Prabha, 2014); glicerina bruta e levedura de cerveja usada (Rodrigues et al., 2019), bagaço de laranja (*Citrus sinensis*) com melaço de cana de açúcar (Machado et al., 2019) e água residual de batata e fração de glicerol (Kot et al., 2020). Isso demonstra que na presença de substratos alternativos, cuja composição apresente proteínas e carboidratos, há possibilidade da levedura do gênero *Rhodotorula* crescer e produzir o pigmento.

Os resultados obtidos para a produção de pigmentos (mg/L) e carotenoides totais pela *R. minuta* e *R. mucilaginosa*, conforme as condições propostas na matriz de Doehlert podem ser vistos na Tabela 1. Os valores da resposta dos pigmentos e carotenoides totais, são a média do valor triplicado realizado nos ensaios.

**Tabela 1.** Produção de pigmentos totais e carotenoides totais de acordo com matriz de Doehlert para *R. minuta* e *R. mucilaginosa*.

Ensaio	CMA(g)	pH	T (dias)	PT RMI (mg/L)	PT RMU (mg/L)	CT RMI (µg/g)	CT RMU (µg/g)
1 (C)*	3	6	5	26.80±0.010	31.50±0.005	69.68±0.026	201.60±0.032
2	3	4	5	21.00±0.020	15.45±0.025	54.60±0.052	98.88±0.159
3	5	6	5	13.10±0.005	11.75±0.022	34.06±0.013	75.20±0.140
4	3	8	5	26.00±0.001	27.25±0.012	67.60±0.002	174.40±0.076
5	1	6	5	23.20±0.005	24.10±0.003	60.32±0.013	154.24±0.019
6	2	5	6	23.85±0.040	24.20±0.025	62.01±0.103	154.88±0.159
7	4	5	6	12.25±0.005	6.75±0.030	31.08±0.013	43.20±0.191
8	4	7	6	7.50±0.002	4.50±0.020	19.50±0.005	28.80±0.127
9	2	7	6	25.40±0.056	26.25±0.005	66.04±0.144	168.00±0.032
10	2	5	4	22.20±0.325	17.50±0.030	57.72±0.838	112.00±0.191
11	4	5	4	19.90±0.010	14.25±0.060	51.74±0.026	91.20±0.384
12	4	7	4	20.15±0.060	15.05±0.002	52.39±0.155	96.32±0.013
13	2	7	4	24.95±0.001	2.55±0.001	64.87±0.003	16.32±0.006
14 (C)*	3	6	5	27.15±0.023	35.50±0.001	70.59±0.059	227.2±0.006
15 (C)*	3	6	5	28.00±0.010	37.00±0.002	72.80±0.026	236.8±0.013

(C)\*: Ponto Central; CMA: Casca de maracujá – amarelo (*Passiflora edulis*); T: Tempo; PT: Pigmentos Totais; RMI: *R.minuta*; RMU: *R.mucilaginosa*; CT: Carotenoides Totais. Fonte: autores.

De acordo, com os resultados apresentados na matriz de Doehlert houve diferença em relação a quantidade de pigmentos e carotenoides totais produzidos entre as diferentes espécies. A *R. minuta* produziu 28±0.01 mg/L de pigmentos totais utilizando apenas a casca de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*) como



substrato, já a *R. mucilaginosa* apresentou melhor produção de pigmentos totais obtendo  $37 \pm 0.002$  mg/L quando comparada a *R. minuta*. Em relação a produção de pigmentos totais, Buzzini & Martini (2000) utilizaram mosto de uva como substrato para produção de pigmento por *R. glutinis* DBVPG 6439 e obtiveram 5,95mg/L. Enquanto Squina et al. (2002) trabalharam com *R. rubra* e *R. glutinis* utilizando caldo de cana como substrato, extrato de levedura e peptona encontraram uma produção de pigmento de 4,4 mg/L para *R. rubra* e 6,7 mg/L para *R. glutinis*.

Nesse mesmo contexto, Tinoi et al. (2005) utilizaram farinha hidrolisada de resíduo de feijão e extrato de batata doce como substrato para a *R. glutinis* obtiveram  $3,48 \pm 0,02$  mg/L de pigmentos totais. Cheng & Yang (2016) utilizaram a *R. mucilaginosa* F-1 e como substrato para seu crescimento comida desperdiçada incluindo ketchup, melão de cana e bebidas saudáveis; os autores encontraram uma concentração de pigmentos de 2,23 mg/L quando utilizaram ketchup, 2,61 mg/L com melão de cana e 1,10 mg/L com a bebida saudável.

Apesar das espécies diferirem entre os estudos citados, pertencem ao mesmo gênero. Os valores encontrados são bem próximos entre si e inferiores aos encontrados no presente estudo. Dentre os autores estudados, apenas Taskin et al. (2011) ao utilizarem a espécie mutante *R. glutinis* MT-5 encontraram um valor superior ao do presente estudo, 92mg/L de pigmentos totais ao utilizar como substrato 8g/L de peptona de penas de galinha.

Dessa forma, o resultado encontrado para produção de pigmentos totais pelas duas espécies destaca-se por ser um valor superior ao encontrado nos estudos que utilizaram levedura sem mutações e resíduo agroindustrial como único substrato.

Quanto a produção de carotenoides totais, a *R. minuta* produziu  $72.8 \pm 0.026$  µg/g, valor inferior ao produzido pela *R. mucilaginosa* que foi  $236.8 \pm 0.013$  µg/g. Ao comparar esse resultado das duas espécies obtido no presente estudo, com o encontrado por Machado et al. (2019), identifica-se valores próximo já que os autores também utilizaram a *R. mucilaginosa* para produção de pigmentos e encontraram uma produção de carotenoides totais de 252.99 µg/g, variando a quantidade de extrato de levedura, peptona e pH inicial da fermentação.

Ainda sobre a produção de carotenoides totais Silva et al. (2020) obtiveram uma produção de carotenoides totais de 179.66 µg/g produzidos por *R. mucilaginosa*, com bagaço de sisal como substrato principal, variando suplementação do meio de cultivo, pH e temperatura. Em outro estudo ao utilizarem a *R. mucilaginosa* F-1, os autores variaram os meios de cultivo e encontraram uma produção de 315.9 µg/g quando utilizaram o meio YM (10g/L de glicose, 5g/L de peptona, 3g/L de extrato de levedura, 3g/L de extrato de levedura), 376.3 µg/g com ketchup, 268.6 µg/g com melão e 245 µg/g com bebida saudável (Cheng & Yang, 2016).

Ao utilizar outra espécie do mesmo gênero, nesse caso a *R. glutinis* R12 com diferentes meios de cultivo, a produção de carotenoides totais encontrada foi de 283.71 µg/g, entretanto os três meios de cultivo utilizados no estudo não eram constituídos por resíduo agroindustrial, eram formados por compostos que normalmente estão presentes em meios de cultivo padrão para levedura (Gerelmaa et al., 2018).

Dessa forma, ao comparar os diferentes estudos e a produção de carotenoides totais pode-se observar que os valores encontrados são bem próximos, independente do meio de cultivo ser constituído de resíduo agroindustrial ou padrão, pois em ambos a levedura consegue acessar nutrientes que permitam seu crescimento e produzir pigmentos; o que consolida a possibilidade de diminuir o custo de produção e ainda permite uma aplicação para o resíduo agroindustrial.

De acordo com Silva et al. (2020) o pH é uma variável que pode influenciar na produção de pigmentos e carotenoides totais, o que permite inferir a presença de uma resposta adaptativa em *Rhodothorula ssp.* Estudos realizados por Machado et al. (2019), destacam que o pH inicial da fermentação influencia positivamente a produção volumétrica de carotenoides; o que corrobora com outros estudos (Nahas et al., 1982; Peñalva & Arst, 2004; Freitas et al., 2007) que demonstraram o protagonismo do pH em microrganismos, ressaltando sua versatilidade fisiológica e a existência de um monitoramento extra celular que não só regula o pH homeostático como também a síntese /secreção de biomoléculas ocorram apenas em valores de pH que funcionem efetivamente (Caddick et al., 1986; Maccheroni et al., 1991).

Os valores experimentais encontrados para os pigmentos totais foram utilizados para a elaboração de ajustes estatísticos para gerar modelos significativos, conforme Tabela 2.

**Tabela 2.** Análise de Variância (ANOVA) para a produção de pigmentos totais por *R. minuta* e *R. mucilaginoso* pela matriz de Doehlert.

<i>R. minuta</i>					
Fonte de variação	SQ	GL	QM	F calculado	F tabelado
Regressão	489.3298	9	54.3699	10.50	3.31
Resíduo	25.8792	5	5.1758		
Falta de ajuste	25.1175	3	8.3725	21.98	9.16
Puro erro	0.7617	2	0.3808		
SQ total	515.2090	14			
R <sup>2</sup>	95%				
<i>R. mucilaginoso</i>					
Fonte de variação	SQ	GL	QM	F calculado	F tabelado
Regressão	1.499,586	9	166.62	5.27	3.31
Resíduo	158,153	5	31.6306		
Falta de ajuste	141.986	3	47.3285	5.86	9.16
Puro erro	16.167	2	8.0833		
SQ total	1657.739	14			
R <sup>2</sup>	90%				

SQ = Soma dos Quadrados, GL = Grau de Liberdade; QM = Quadrado Médio; F = Teste de Fisher; R<sup>2</sup> = Coeficiente de Determinação. Fonte: autores.

A ANOVA realizou uma avaliação da qualidade do ajuste dos modelos gerados por meio do teste Fisher (teste F), significância de regressão, falta de ajuste e do coeficiente de determinação múltipla. Há significância estatística para os efeitos quando o valor de p é menor do que 0,05.

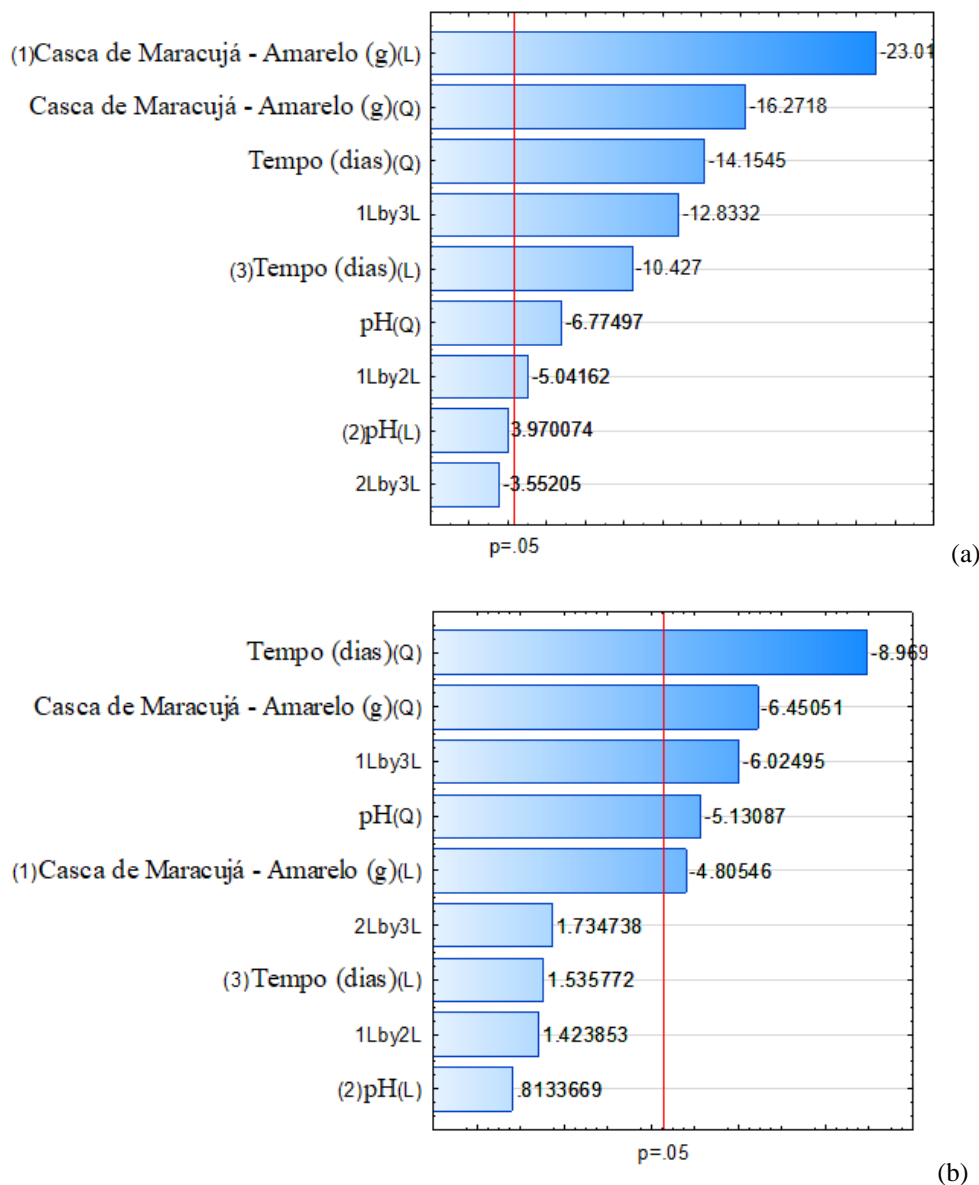
Considerando o teste de Fisher para a produção de pigmentos totais da *R. minuta* o F calculado (10,50) é maior do que o F tabelado (3,31) quando se considera a regressão, isso significa que é possível confiar nos dados obtidos. Ao analisar a falta de ajuste, o F calculado (21,98) foi maior do que o F tabelado (9,16), indicando que houve falta de ajuste, o R<sup>2</sup> foi igual a 95%, demonstrando que 95% dos resultados encontrados são explicados pelo modelo experimental.

Para a produção de pigmentos totais pela *R. mucilaginoso*, no que se refere a regressão, o F calculado

(5,27) é maior do que o F tabelado (3,31), portanto é possível confiar nos dados. Quanto a falta de ajuste o F calculado (5,86) é menor do que o F tabelado (9,16) indicando que não houve falta de ajuste, os resultados encontrados não são aleatórios, o  $R^2$  foi 90%, isso significa que 90% dos resultados encontrados são explicados pelo modelo experimental.

Na Figura 1 está apresentado o Diagrama de Pareto que demonstra a significância estatística dos termos quadráticos e lineares e sua interação no que se refere a produção de pigmentos totais pela *R. minuta* e *R. mucilaginosa*.

**Figura 1.** Diagrama de Pareto para produção de pigmentos totais (mg/L) para *R.minuta* (a) e *R. mucilaginosa* (b).



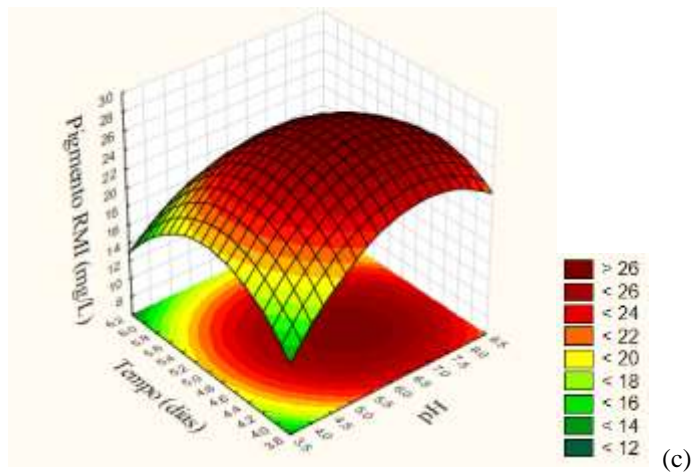
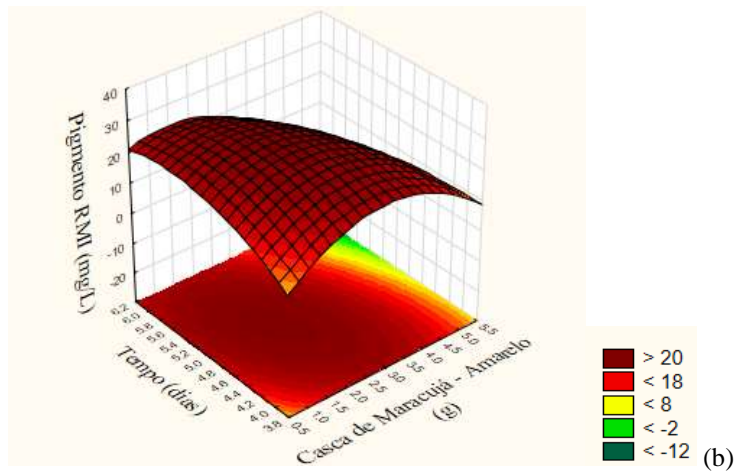
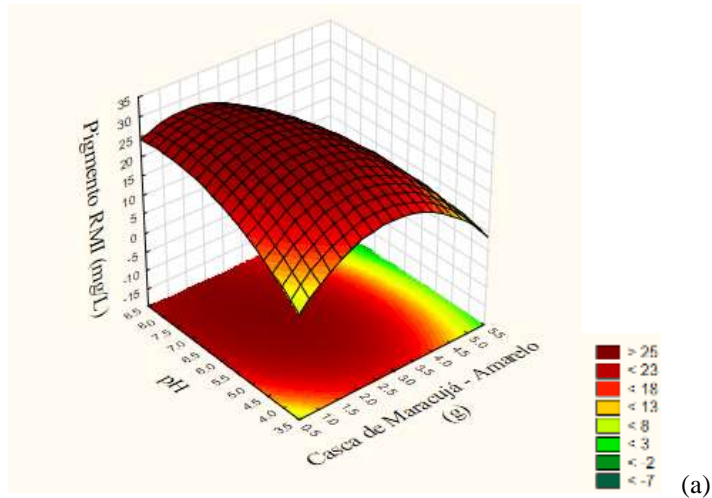
Fonte: autores.

No diagrama de Pareto para produção de pigmentos totais, as três variáveis apresentaram significância estatística ( $p$  valor  $<0,05$ ). Ao se analisar a correlação entre as variáveis, para *R. minuta* houve significância estatística para produção de pigmento a relação entre casca de maracujá – amarelo e pH ( $p$  valor 0,037) e casca

de maracujá – amarelo e tempo (p valor 0,006) (Figura 1a). Enquanto que para *R. mucilaginoso* ao se verificar as correlações entre as variáveis, houve significância estatística apenas para casca de maracujá – amarelo e tempo (p valor 0,02) (Figura 1b). É possível afirmar que a casca de maracujá-amarelo tem influência sobre a produção de pigmento; nas duas espécies existe uma correlação entre casca de maracujá- amarelo e tempo (dias) com significância estatística.

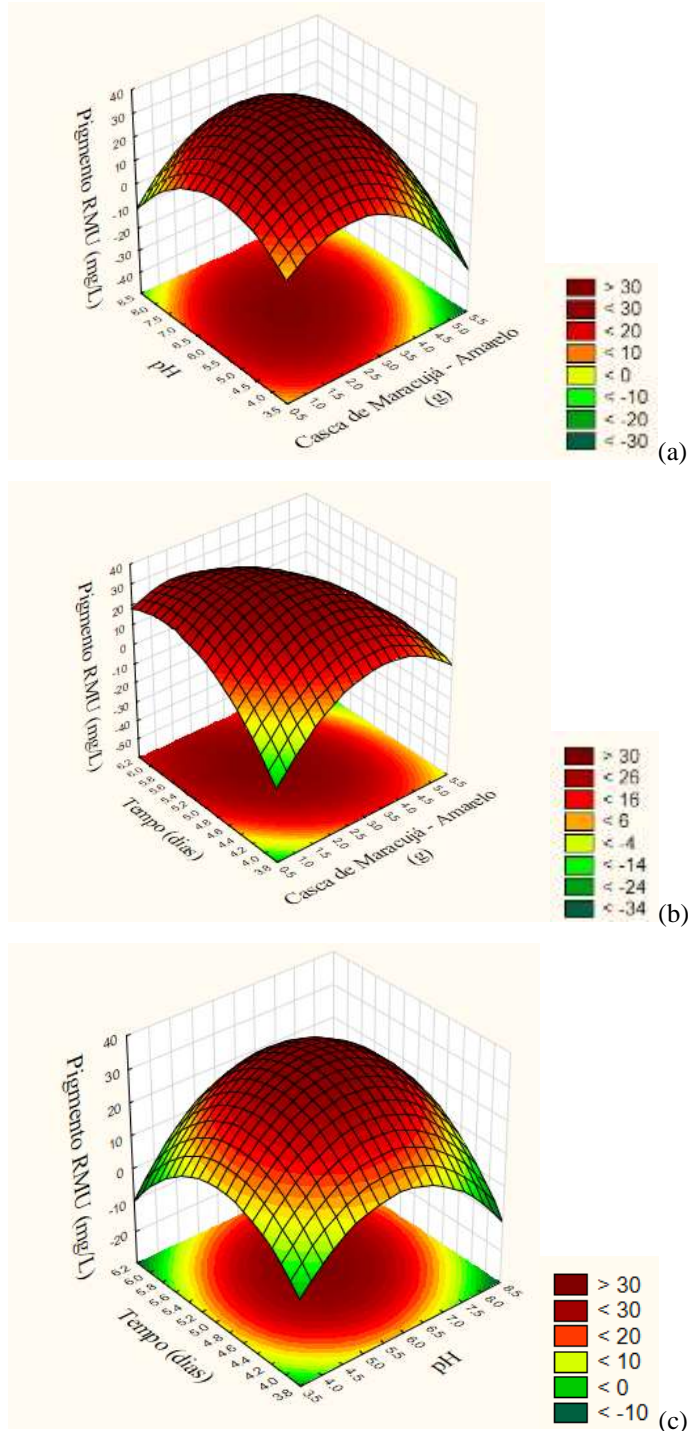
As figuras 2 e 3 apresentam a superfície de resposta indicando o ponto ótimo para produção de pigmentos totais pela *R. minuta* e *R. mucilaginoso*.

**Figura 2.** Gráficos de superfície de resposta para produção de pigmentos totais por *R. minuta*, mostrando os efeitos das interações de (a) pH e casca de maracujá - amarelo, (b) tempo (dias) e casca de maracujá - amarelo e (c) tempo (dias) e pH.



Fonte: Autores.

**Figura 3.** Gráficos de superfície de resposta para produção de pigmentos totais por *R. mucilaginosa*, mostrando os efeitos das interações de (a) pH e casca de maracujá - amarelo, (b) tempo (dias) e casca de maracujá - amarelo e (c) tempo (dias) e pH.



Fonte: Autores.

A partir dos resultados apresentados nas Figuras 2 e 3, através da superfície de resposta foi encontrado um ponto ótimo de produção de pigmentos totais para *R. minuta* (2,3g de CMA, pH 6,5 e 5 dias) e *R. mucilaginosa* (2,5g de CMA, pH 6 e 5 dias). A determinação de um ponto ótimo de produção tem como intuito

indicar as melhores condições de cultivo para produzir um quantitativo maior de pigmento. Dessa forma, observou-se na otimização da produção de pigmentos que a quantidade de substrato, pH e tempo foram próximos para ambas as espécies. A interação dessas variáveis, nessas condições específicas, contribuíram para o acesso de nutrientes pela levedura, monitoramento celular, produção e secreção de biomoléculas. Ainda pode-se observar que ambientes ácidos não são premissa para uma boa produção de pigmentos por *Rhodotorula spp.* O pH neutro, em torno de 6, demonstrou sua funcionalidade no que tange uma resposta adaptativa das leveduras a um sensoriamento celular, permitindo ponto ótimo de produção dos pigmentos totais, tanto para *R. minuta* quanto a *R. mucilaginosa*.

A equação que descreve o comportamento da resposta referente a produção de pigmentos totais (mg/L) produzido por *R. minuta* e *R. mucilaginosa* em função das variáveis, está descrita na Equação 2 e 3, respectivamente.

$$\text{Produção de Pigmentos Totais RMI (g/L)} = - 208.00 + 30.800 (\text{CMA}) - 2.292 (\text{CMA})^2 + 19.238 (\text{pH}) - 0.954 (\text{pH})^2 + 56.233 (\text{T}) - 4.546 (\text{T})^2 - 1.100 (\text{CMA}) (\text{pH}) - 2.800 (\text{CMA})(\text{T})$$

Equação 2

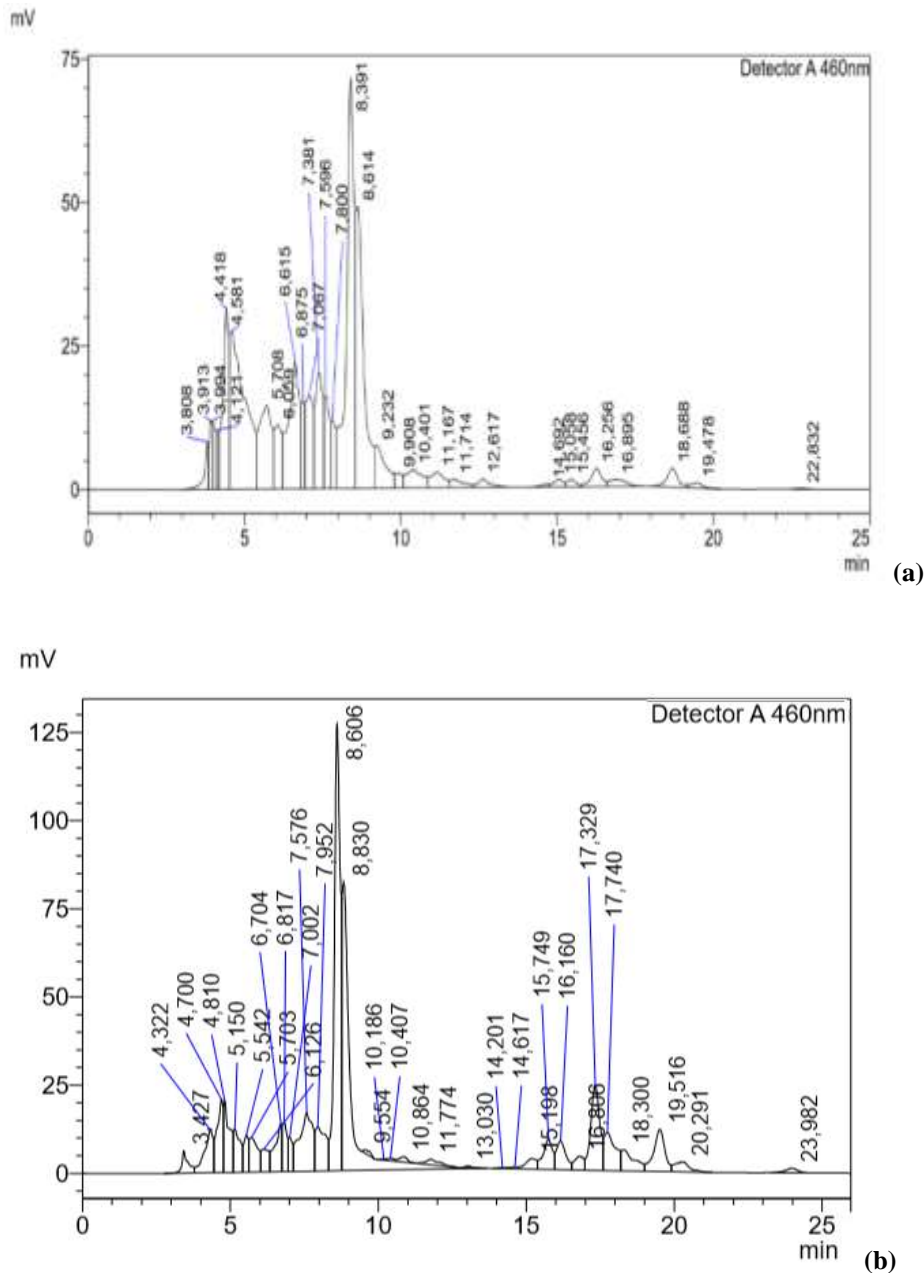
$$\text{Produção de Pigmentos Totais RMU (g/L)} = - 468.33 + 43.39 (\text{CMA}) - 4.18 (\text{CMA})^2 + 27.52 (\text{pH}) - 3.33 (\text{pH})^2 + 141.96 (\text{T}) - 13.27 (\text{T})^2 + 1.744 (\text{pH})(\text{T})$$

Equação 3

Onde: CMA: Casca de maracujá-amarelo, T: Tempo em dias, RMI: *R. minuta*, RMU: *R. mucilaginosa*

Por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) representada pelos cromatogramas (Figura 4) foi possível identificar a quantidade de  $\beta$ -caroteno presente nas amostras de pigmentos totais produzidas pela *R. minuta* (Figura 4a) e *R. mucilaginosa* (Figura 4b).

**Figura 4.** Cromatogramas obtidos por CLAE considerando a resposta do detector (mV) x tempo (min), para  $\beta$ -caroteno obtido por *R.minuta* (a) e *R.mucilaginoso* (b).



Fonte: Autores.

Em relação aos cromatogramas obtidos por CLAE, pode-se afirmar que os pigmentos totais obtidos por *R. minuta* (0,29mg de  $\beta$ -caroteno por litro) e *R. mucilaginoso* (0,83 mg de  $\beta$ -caroteno por litro) apresentam  $\beta$ -caroteno em sua composição. A quantidade de  $\beta$ -caroteno foi determinada através de equação da reta obtida pela curva de  $\beta$ -caroteno padrão em diferentes concentrações conhecidas e a área correspondente ao pico de  $\beta$ -caroteno realizada por CLAE, identificada entre 18 a 19 minutos para o pigmento produzido por *R.minuta* e 19 a 20 minutos para pigmento produzido por *R.mucilaginoso*.

Dessa forma, a equação obtida foi:  $Y_{\beta\text{-caroteno}} = 648.868X - 113.258$ . Onde: Y= Área obtida no pico de  $\beta$ -caroteno por CLAE e X= Concentração em mg/L de  $\beta$  - caroteno.



No estudo publicado por Silva et al. (2020) ao verificar a produção de  $\beta$ -caroteno pela cromatografia líquida de alta eficiência por *R.glutinis* URM 6692, *R.minuta* URM 6693 e *R.glutinis* URM 6695 utilizando glicerina residual como substrato, identificaram uma produção de 0,56mg/L, 1,02mg/L e 0,13 mg/L, respectivamente. Esses valores demonstram similaridade com os resultados encontrados no presente estudo.

Diante dos ensaios realizados, observa-se e destaca-se a *R. mucilaginoso* por apresentar um maior quantitativo de carotenoides totais e  $\beta$ -caroteno nas amostras de pigmentos totais, quando comparada a *R. minuta*. Dessa forma a *R. mucilaginoso* se apresenta como uma espécie promissora no que tange a adaptabilidade celular frente a *R. minuta* para produção de pigmentos. Apresentar e produzir de forma diferenciada esse tipo de substância, é relevante, pois os carotenoides se sobressaem em relação aos outros pigmentos, por apresentarem diversas finalidades, em relação ao uso que atendem as demandas de diferentes setores da indústria; podendo ser definidor em um momento de escolha no início de uma produção em larga escala.

#### 4. Considerações finais

Os resultados deste estudo indicam que a casca de maracujá-amarelo pode ser utilizada como substrato para crescimento das *Rhodotorula spp* e produção de pigmento com carotenoides totais e  $\beta$ -caroteno, em sua composição. Com a otimização das condições de cultivo, as quais as espécies foram submetidas, foi possível determinar as condições ótimas para a produção de pigmentos totais. Isso demonstra a versatilidade das leveduras que utilizam resíduos como substratos para produção de biomoléculas relevantes, como os pigmentos.

A presença de carotenoides nesses pigmentos fomenta e direciona estudos posteriores para purificação e verificação das possíveis atividades biológicas (antimicrobiana, antioxidante, citotóxica, toxicidade, antifúngica), com o intuito do uso do pigmento não apenas com a finalidade de colorir alguma substância, mas para utilização na indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética.

#### Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB, Brasil) pelo apoio financeiro concedido e à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) pela assessoria financeira, técnica e administrativa.

#### Referências

- Aruldas, C.A., Dufossé, L., Ahmad, W.A. (2018). Current perspective of yellowish – Orange pigments from microorganisms – a review. *Journal of Cleaner Production*, 180, 168-182. doi: 10.1016/j.jclepro.2018.01.093.
- Association of Official Analytical Chemists – AOAC (2016). Official Methods of Analysis of AOAC International. 20 th ed. Rockville, Maryland: AOAC International.
- Buzzini, P. & Martini, A. (2000). Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. *Bioresource Technology*, 71, 41- 44. doi:10.1016/S0960-8524(99)00056-5.
- Caddick, M. X., Brownlee, A. G. & Arst, H. N. Jr (1986). Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and General Genetics*. 203, 346-353.
- Cavalcante, T.Q. & Melo, M. de O. (2019). Utilização de biomassa de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) in natura como bioadsorvente para remoção de íons de Cd e Pb em meio aquoso. In: *XXIII Seminário de Iniciação Científica da UEFS. Semana Nacional de Científica e Tecnológica - 2019*, 23. doi:10.13102/semic.v0i23.6380.

- Cheng, Y-T. & Yang, C-F. (2016). Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 61, 270 - 275. doi:10.1016/j.jtice.2015.12.027.
- Davies, B.H. (1976). *Chemical Biochemistry Plant Pigments*. Academic press, New York, USA.
- Delgado-Vargas, F., Peredes-López, O. (2002). *Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses*, CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 1-344.
- Freitas, J.S, Silva, E.M, Rossi, A. (2007). Identification of nutrient-dependent changes in extracellular pH and acid phosphatase secretion in *Aspergillus nidulans*. *Genetics and Molecular Research*, 6 (3), 721-729.
- Gerelmaa, Z., Zultsetseg, Ch., Batjargal B., Rentsenkhand, Ts. (2018). Selection of culture media for the production of carotenoids with antioxidant activity by *Rhodotorula glutinis*. *Proceedings of the Mongolian Academy of Sciences*, 58 (4), 31-38. doi:10.5564/pmas.v58i4.1047.
- Gómez-García, M.R. & Ochoa-Alejo, N. (2013). Biochemistry and molecular biology of carotenoid biosynthesis in chili peppers (*Capsicum spp.*). *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (9), 19025 - 19053. doi:10.3390/ijms140919025.
- Guzman, I., Hamby, S., Romero, J., Bosland, P.W., O'Connell, M. (2010). Variability of carotenoid biosynthesis in Orange colored *Capsicum spp.* *Plant Science*, 179 (1-2), 49 - 59. doi:10.1016/j.plantsci.2010.04.014.
- Heer, K. & Sharma, S. (2017). Microbial pigments as a natural color: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 8 (5), 1913-1922.
- Kot, A.M., Blazejak, S., Kieliszek, M., Gientka, I., Piwowarek, K. & Brzezińska, R. (2020). Production of lipids and carotenoids by *Rhodotorula gracilis* ATCC 10788 yeast in a bioreactor using low - cost wastes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 26, 1-8. doi: 10.1016/j.bcab.2020.101634.
- Kot, A.M., Blazejak, S. & Kurez, A. (2016). *Rhodotorula glutinis* – potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (14), 6103-6117. doi: 10.1007/s00253-016-7611-8.
- Maccheroni, W. Jr., Pombeiro, S.R.C., Martinez-Rossi, N.M., Rossi, A. (1991). pH and acid phosphatase determinations after growth of *Aspergillus nidulans* on solid medium. *Fungal Genetics Reports*, 38 (8), 78-79. doi:10.4148/1941-4765.1454.
- Machado, W.R.C., Soares, B.V. & Del Bianchi, V.L. (2019). Produção de carotenoides por meio de fermentação em estado sólido com *Rhodotorula mucilaginosa* em bagaço de laranja (*Citrus sinensis*). *Revista de Engenharia e Tecnologia*, 11(3), 48-57.
- Malisorn, C. & Suntornsuk, W. (2008). Optimization of  $\beta$ -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. *Bioresource Technology*, 99 (7), 2281 - 2287. doi:10.1016/j.biortech.2007.05.019.
- Manimala, M.R.A & Murugesan, R. (2017). Carotenoid pigment production from Yeast: Health benefits and their industrial applications. *International Journal of Chemistry*, 5, 392-395.
- Manimala, M.R.A. & Murugusan, R. (2018). Characterization of carotenoid pigment production from yeast *Sporobolomyces* sp. and their application in food products. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7 (1), 2818-2821.
- Mata-Gómez, L.C., Montañez, J.C., Méndez-Zavala, A., Aguilar, C.N. (2014). Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories*, 13 (12), 2-11.
- Menezes, J.D.S., Druzian, J.I., Padilha, F.F. & Souza, R.R. (2012). Produção Biotecnológica de goma xantana em alguns resíduos agroindustriais, caracterização e aplicações. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, 8 (8), 1761-1776.
- Moliné, M., Libkind, D. & Van Broock, M. (2012). Production of torularhodin, torulene and  $\beta$ -carotene by *Rhodotorula* yeasts. *Methods in Molecular Biology*, 898, 275 - 283. doi: 10.1007/978-1-61779-918-1\_19.
- Moriel, D.G., Chociai, M.B., Machado, I.M.P., Fontana, J.D. & Bonfim, T.M.B. (2005). Effect of feeding methods on the astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in fed-batch process. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48, 397- 401. doi:10.1590/S151689132005000300010.
- Mussagy, C.U., Winterburn, J., Santos-Ebinuma, V.C., Pereira, J.F.B. (2018). Production and extraction of carotenoids produced by microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 1095-1114. doi: 10.1007/s00253-018-9557-5.
- Nabi, F., Arain, M.A., Rajput, N., Alagawany, M., Soomro, J., Umer, M., Soomro, F., Wang, Z., Ye, R. & Liu, J. (2020). Health benefits of carotenoids and potential application in poultry industry: A review. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 104, 1809-1818. doi:10.1111/jpn.13375.
- Nahas, E., Terenzi, H.F., Rossi, A. (1982). Effect of carbon source and pH on the production and secretion of acid phosphatase (EC 3.1.3.2) and alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) in *Neurospora crassa*. *Journal of General Microbiology*, 128, 2017-2021. doi: 10.1099/00221287-128-9-2017.
- Peñalva, M.A. & Arst, H.N. Jr (2004). Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annual Review of Microbiology*, 58, 425-451. doi:10.1146/annurev.micro.58.030603.123715.
- Panesar, R., Kaur, S. & Panesar, P.S. (2015). Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review. *Current Opinion in Food Science*, 1, 70-76. doi: 10.1016/j.cofs.2014.12.002.

- Petrik, S., Marova, I., Haronikova, A., Kostovova, I. & Breierova, E. (2013). Production of biomass, carotenoid and other lipid metabolites by several red yeast strains cultivated on waste glycerol from biofuel production - a comparative screening study. *Annals of Microbiology*, 63, 1537-1551. doi: 10.1007/s13213-013-0617-x.
- Rodrigues, T.A., Schueler, T.A., da Silva, J.R., Sérvulo, E.F.C. & Oliveira, F.J.S. (2019). Valorization of solid wastes from the brewery and biodiesel industries for the bioproduction of natural dye. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 36 (1), 99 -107. doi: 10.1590/0104-6632.20190361s20170608.
- Sen, T., Barrow, C.J. & Deshmukh, S.K. (2019). Microbial Pigments in the Food Industry - Challenges and the Way Forward. *Frontiers in Nutrition*, 6 (7), 1-14. doi: 10.3389/fnut.2019.00007.
- Silva, J. da, Silva, F.L.H. da, Ribeiro, E.S., Melo, D.J.N. de, Santos, F.A., Medeiros, L.L. de. (2020). Effect of supplementation, temperature and pH on carotenoids and lipids production by *Rhodotorula mucilaginosa* on sisal bagasse hydrolyzate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 30, 1-7.
- Silva, S.R.S., Stamford, T.C.M., Albuquerque, W.W.C., Vidal, E.E. & Stamford, T.L.M. (2020). Reutilization of residual glycerin for the produce b-carotene by *Rhodotorula minuta*. *Biotechnology Letters*, 42, 437- 443.
- Squina, F.M., Yamashita, F., Pereira, J.L. & Mercadante, A.Z. (2002). Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* and *R. glutinis* in culture medium supplemented with sugar cane juice. *Food Biotechnology*, 16 (3), 227 - 235. doi: 10.1081/FBT-120016776.
- Sola, M.C., Oliveira, A.P., Feistel, J.C, Rezende, C.S.M. (2012). Manutenção de microrganismos: Conservação e Viabilidade. *Enciclopédia Biosfera. Centro Científico Conhecer*, 8 (14), 1398 - 1418.
- Taskin, M., Sisman, T., Erdal, S. & Kurbanoglu, E.B. (2011). Use of waste chicken feathers as peptone for production of carotenoids in submerged culture of *Rhodotorula glutinis* MT-5. *European Food Research and Technology*, 223, 657 - 665.
- Tinoi, J., Rakariyatham, N. & Deming, R.L. (2005). Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolysed mung bean waste flour as substrate. *Process Biochemistry*, 40 (7), 2551 - 2557.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B. & Lewis, B. A. (1991). Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74 (10), 3583-3597.
- Venil, C.K, Zakaria, Z.A. & Ahmad, W.A. (2013). Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, 48 (7), 1065-1079. doi: 10.1016/j.procbio.2013.06.006.
- Viana, L. G. & Cruz, P. S. (2016). Reaproveitamento de Resíduos Agroindustriais. In: *Congresso Baiano de Engenharia Sanitária e Ambiental*, IV COBESA. 1-3.
- Weedon, B.C.L.; Moss, G.P. (1995). Structure and Nomenclature. In *Carotenoids*; Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H.P., Eds.; Birkhäuser Verlag: Basel, Switzerland, I B: Spectroscopy, 27-70.
- Yadav, K.S. & Prabha, R. (2014). Extraction of Pigments from *Rhodotorula* Species of Dairy Environment. *Indian Journal of Science and Technology*, 7 (12), 1973-1977. doi: 10.17485/ijst/2014/v7i12.28.

### **CAPITULO 3**

#### **ARTIGO ORIGINAL**

**Revista escolhida para publicação:** Anais da Academia Brasileira de Ciências (A2)

**Link do guia ao autor da revista:** <https://www.scielo.br/journal/aabc/about/#instructions>

**1. Título:**

Avaliação de atividades biológicas de pigmentos produzidos por *Rhodotorula minuta* URM 5197 e *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409.

**2. Nomes completos de todos os autores**

THAMILLY MOREIRA SILVA<sup>1</sup>, ERLON OLIVEIRA XAVIER<sup>2</sup>, JABSON MENESES TEIXEIRA<sup>3</sup>, TASSIA LIZ ARAÚJO DOS SANTOS LESSA<sup>4</sup>, DANIEL LOBO SOUSA<sup>5</sup>, DANIEL PEREIRA BEZERRA<sup>6</sup>, RAPHAEL FERREIRA QUEIROZ<sup>7</sup>, JANAÍNA SILVA DE FREITAS<sup>8\*</sup>

**3. Endereços profissionais e ORCID de todos os autores**

<sup>1</sup> Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Doutoranda do Programa Multicêntrico de Bioquímica e Biologia Molecular, Estrada do Bem-Querer, S/N, bairro Universitário, 45031-300, Vitória da Conquista, Bahia, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1612-6954>

<sup>2</sup> Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Discente de licenciatura em Ciências Biológicas, BR 415, KM 04, S/N, 45000-700, Itapetinga, Bahia, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6099-595X>

<sup>3</sup> Universidade Estadual de Santa Cruz, Mestrando Biologia e Biotecnologia de Microrganismos, Rodovia Jorge Amado, Km 16, Salobrinho, 45662-900, Ilhéus, Bahia, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4139-1699>

<sup>4</sup> Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Doutoranda do Programa Multicêntrico de Bioquímica e Biologia Molecular, Estrada do Bem-Querer, S/N, bairro Universitário, 45031-300, Vitória da Conquista, Bahia, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2053-554X>

<sup>5</sup> Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Doutorando do Programa Multicêntrico de Bioquímica e Biologia Molecular, Estrada do Bem-Querer, S/N, bairro Universitário, 45031-300, Vitória da Conquista, Bahia, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7637-2642>

<sup>6</sup> Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia, Rua Waldemar Falcão, Candeal, n.121, 40296710, Salvador, Bahia, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6774-2063>

<sup>7</sup> Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Departamento de Ciências Naturais, Estrada do Bem-Querer, S/N, bairro Universitário, 45031-300, Vitória da Conquista, Bahia, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7757-4286>

<sup>8</sup> Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Departamento de Ciências Naturais e Exatas, BR 415, KM 04, S/N, 45000-700, Itapetinga, Bahia, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7691-4701>

#### **4. Palavras-chave:**

Carotenoides, Antimicrobiano, Citotoxicidade, Leveduras, Pigmentos Microbianos

**5. Título Corrido:**

Atividades biológicas de pigmentos microbianos

**6. Secção dos AABC:**

Microbiologia

**7. Autor para Correspondência:**

Janaína Silva de Freitas

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Departamento de Ciências Naturais e Exatas

BR 415, KM 04, S/N, CEP: 45000-700, Itapetinga, Bahia, Brasil

Telefone: 5577991004898

E-mail: [janainafreitas@uesb.edu.br](mailto:janainafreitas@uesb.edu.br)

## Resumo

Pigmentos naturais produzidos por microrganismos se destacam pela possibilidade de produção a baixo custo, em maior quantidade, menor tempo e apresentar atividades biológicas. Nesse cenário, os carotenoides produzidos pelo gênero *Rhodotorula* sobressaem. O objetivo desse estudo foi investigar as atividades biológicas (antimicrobiana, larvicida e citotóxica) dos pigmentos produzidos por *R.minuta* e *R. mucilaginoso*. A atividade antimicrobiana foi verificada por concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC), contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. A atividade larvicida dos pigmentos foi estudada contra larvas de *A. aegypti*. O efeito citotóxico foi realizado contra linhagens de células tumorais HCT116 (carcinoma de colón humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), B16-F10 (melanoma murino) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano). O pigmento da *R.minuta* apresentou ação bactericida contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, enquanto que o pigmento produzido pela *R.mucilaginoso* foi bactericida contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e bactericida e bacteriostático contra *Klebsiella pneumoniae*. O potencial larvicida foi observado para o pigmento das duas espécies, com destaque para o pigmento produzido pela *R.minuta*. Não foi identificado efeito citotóxico dos pigmentos contra as células tumorais nas concentrações avaliadas. Dessa forma, os pigmentos apresentaram atividades biológicas promissoras diferentes, esses resultados podem estimular novas pesquisas relacionadas as atividades biológicas encontradas.



## Introdução

Os pigmentos naturais são coloridos, insolúveis em água, sólidos, com aspecto de pó, disponíveis em diversas cores e não apresentam efeitos tóxicos quando ingeridos pelo ser humano (Dawoud, 2020). Esses pigmentos podem ser obtidos através de plantas, algas, insetos e microrganismos. Há destaque para sua produção por microrganismos, devido à facilidade de cultivo, alta taxa de crescimento, possibilidade de crescimento em meio de cultura de baixo custo, por ser tolerante a interferências climáticas e dispor de uma ampla variedade de cores (Mesquita et al. 2017).

Quando comparados aos pigmentos sintéticos que comprovadamente causam alergias e toxicidade (Lopez e Ligabue-Braun, 2021), os pigmentos naturais sobressaem, pois não possuem essas características, e além de colorirem como os sintéticos, podem apresentar atividades biológicas - potencial antimicrobiano, anticâncer, antioxidante e antiproliferativo (Lagashetti et al. 2019), o que agrega valor ao produto final, no qual essa substância pode ser inserida.

Conderando a síntese de pigmentos por microrganismos, as espécies de leveduras do gênero *Rhodotorula* são conhecidas pela produção de pigmentos naturais conhecidos por carotenoides (Cipolatti et al. 2017). Os carotenoides são utilizados pela indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica e de rações, além de atuarem como colorantes, são precursores da vitamina A e demonstram atividades biológicas (Mesquita et al., 2017).

Dentro desse contexto, o objetivo do presente estudo foi investigar as atividades biológicas (antimicrobiana, larvicida contra *Aedes aegypti* e citotoxicidade) de pigmentos obtidos de *R. minuta* URM 5197 e *R. mucilaginoso* URM 7409, utilizando casca de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*), como substrato para crescimento dos microrganismos.

## **Materiais e Métodos**

### **Obtenção do Microrganismo**

As leveduras utilizadas no presente estudo foram cedidas pela Coleção de Cultura de Microrganismos da Universidade Federal de Pernambuco - Micoteca URM – UFPE. A *Rhodotorula minuta* URM 5197 foi isolada de ração presente na bandeja de psitacídeos, enquanto que a *R. mucilaginosa* URM 7409 foi isolada de solo.

### **Preparação do inóculo e da fermentação submersa**

Para obter o inóculo, a espécie foi cultivada em Erlenmeyers de 250 mL, com 100 mL meio de cultivo Yeast Malt – YM (1% de glicose, 0,5% de peptona, 0,3% de extrato de malte e 0,3% de extrato de levedura) por 48 horas, a 150 rpm e 30°C. O inóculo foi transferido para o meio de cultura contendo 3% de casca de maracujá - amarelo (*Passiflora edulis*) em 100 ml de água destilada estéril, com biomassa inicial estimada de 10<sup>8</sup> UFC/ml (Silva et al., 2021). As leveduras permaneceram a 150 rpm, 30°C por 5 dias.

### **Extração do pigmento com solventes orgânicos**

A extração do pigmento ocorreu conforme metodologia descrita por Silva et al. (2021) adaptada da metodologia utilizada por Moliné et al. (2012) e Silva et al. (2020).

### **Determinação da Atividade Antimicrobiana**

As cepas bacterianas utilizadas foram *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. Os microrganismos foram cedidos pelo Laboratório de microbiologia, da Universidade Federal de Alfenas – Minas Gerais. A atividade antibacteriana das amostras de pigmento foi determinada pela concentração inibitória mínima (MIC) e a concentração bactericida mínima

(MBC), de acordo com metodologia do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, 2006; Cunha et al. 2013).

As bactérias foram cultivadas em caldo cérebro coração (BHI), por 24 horas a 37°C. Posteriormente, a suspensão de bactérias foi diluída em caldo BHI estéril, até 0,5 da escala McFarland. Após obter esse valor, as bactérias foram incubadas com soluções do extrato dos pigmentos em concentrações que variaram de 25 a 1000µg/mL. As bactérias foram plaqueadas em microplacas de 96 poços. O controle negativo utilizado foi o metanol, pois foi empregado para dissolver o pigmento.

Após incubação por um período de 24 horas, a 37°C, para determinação da MIC foi considerada a menor fração do extrato do pigmento que não permitiu o crescimento visível após a incubação com 60 µL do corante resazurina, a 0,01% (Sigma-Aldrich), por 30 minutos, em temperatura ambiente. Para isso a coloração do poço deveria permanecer na cor azul. Já o MBC foi determinado cultivando 10 µL de cada poço incubado antes de adicionar a resazurina, no ágar Müller-Hinton, a 37°C, pelo período de 24 horas. Para o MBC observou-se a menor concentração de cada amostra sem crescimento visível de colônias em placas de ágar (Cunha et al., 2013).

### **Atividade larvicida dos pigmentos contra larvas de *A. aegypti***

#### *Diluição das amostras do pigmento*

O pigmento resultante da extração foi armazenado em eppendorfs, para realização do experimento foram utilizados 0,5g de cada pigmento produzido por *R. minuta* e *R. mucilaginosa*. Um dia antes dos ensaios biológicos foi realizada a diluição do pigmento em água, para diluição foi necessária a aplicação de agentes surfactantes comumente usados para experimentos com larvas do *A. aegypti*, são eles o DMSO (Dimetilsulfóxido/C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS) e TWEEN80 (Polisorbato 80/C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>26</sub>). Para a diluição do pigmento da *R. minuta* foram

utilizados 0,3ml de DMSO + 0,4ml de Tween80, enquanto que para diluição do pigmento da *R. mucilaginosa* foram utilizados 0,1ml de Tween80.

Após a diluição os pigmentos foram colocados em 2 diferentes balões volumétricos de 200ml, o qual foi completado com água deionizada até a linha do menisco. Nos dois casos o volume foi fracionado em um balão de 100ml, o volume restante no balão de 200ml foi acrescido novamente de água deionizada, esse processo foi repetido mais uma vez. Essa diluição gerou 3 graduações dos pigmentos nas concentrações de  $0,25\text{mg/ml}^{-1}$ ,  $0,125\text{mg/ml}^{-1}$  e  $0,062\text{mg/ml}^{-1}$  para cada amostra de pigmento das diferentes leveduras, ambas as concentrações com 100ml cada. Os controles foram preparados utilizando a mesma medida de soluções surfactantes que foram utilizadas na diluição da fração maior de cada pigmento, ou seja, o controle do pigmento da *R.minuta* com 0,3ml de DMSO + 0,4ml de Tween80 para cada 100ml de água e o controle do pigmento da *R.mucilaginosa* contou com 0,1ml para cada 100ml de água. O produto dessas diluições foi armazenado para realização dos ensaios no dia posterior.

#### *Manutenção das Larvas*

As larvas de *A. aegypti* para realização dos ensaios biológicos foram obtidas através da colônia estabelecida no Laboratório de Pesquisa de Inseticidas Naturais (LAPIN) na UESB de Itapetinga com ovos oriundos da linhagem Rockfeller doados pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), do Rio de Janeiro. Os ovos foram submersos em recipientes de polipropileno, aproximadamente mil ovos para cada litro de água deionizada em temperatura de aproximadamente  $26\text{ C}^{\circ}$  para eclosão, a alimentação das larvas foi pesada em um grama de ração de peixe (Alcon Basic) por vasilha. As larvas utilizadas estavam em 2º e 3º instar de desenvolvimento.

### *Ensaio Biológicos*

O ensaio biológico foi realizado utilizando 30 larvas em cada recipiente de vidro com 30ml dos tratamentos, sendo estes tratamentos: 3 concentrações para cada pigmento, 2 controles com os diluentes e controle com água, todos realizados em triplicata. As vasilhas foram reorganizadas de forma aleatória espacialmente sobre a bancada após o início do experimento. As observações foram realizadas com 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 24h após o início do experimento. O ensaio teve início às 8:00am e foram avaliadas a temperatura e umidade relativa do ar durante todo o experimento, a iluminação seguiu ciclo natural, diurno e noturno. Para avaliação da sensibilidade à luz foi utilizada iluminação direcionada sobre as larvas durante as observações, a atividade das larvas foi observada e no caso de baixa reatividade foi utilizado um bastão para promover vibrações nos recipientes com leves toques no vidro, no caso de mortalidade, as larvas mortas foram removidas do recipiente e contabilizadas.

### *Análises Estatísticas*

As análises estatísticas foram realizados no software Pacote Estatístico de Ciências Sociais IBM 21.0. As médias de mortalidade larval foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as diferenças comparadas pelo pós teste Tukey a 5% de significância ( $P < 0,05$ ). As diferenças entre as médias de mortalidade em relação aos controles foram comparadas pelo pós teste Dunnett ( $P < 0,05$ ).

### **Determinação de citotoxicidade em linhagens de células tumorais *in vitro***

#### *Preparo das amostras e células*

As amostras (extrato dos pigmentos) foram diluídas em DMSO puro estéril na concentração de 10 mg/mL, para obtenção dos extratos. Os efeitos antiproliferativos foram determinados nas linhagens de células HCT116 (carcinoma de colón humano), HepG2

(carcinoma hepatocelular humano), B16-F10 (melanoma murino) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano), obtidas da American Type Culture Collection (ATCC). Todas as linhagens de células foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm<sup>3</sup>, volume de 250 mL). Os meios utilizados foram RPMI 1640 (mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular), suplementados com 10% de soro bovino fetal. A manutenção das linhagens ocorreu em incubadoras com atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37°C. O acompanhamento do crescimento celular era realizado todos os dias, através da utilização de microscópio de inversão. A troca do meio ocorreu quando o crescimento celular atingia confluência necessária para renovação de nutrientes. Para manter as células aderidas utilizou-se tripsina (0,25%), para despregarem das paredes das garrafas. As culturas de células apresentavam negativas para microplasma, conforme avaliado pela coloração com Hoechst (Mycoplasma Stain Kit, Cat. MYC1, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA).

#### *Ensaio de citotoxicidade*

Para avaliar a citotoxicidade dos pigmentos, o ensaio do alamar blue foi realizado após 72 horas de exposição com os pigmentos. O alamar blue (O'brien et al., 2000) apresenta propriedades redox e atua como indicador fluorescente/colorimétrico. Com os sais de tetrazólio, o alamar blue reduz-se em células em proliferação. A forma oxidada é azul (não fluorescente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável). Se ocorrer redução do alamar blue houve proliferação celular, essa característica de maneira inicial foi utilizada para indicar crescimento e/ou viabilidade celular no monitoramento de proliferação de linfócitos (Ahmed et al., 1994) e atualmente apresenta várias aplicações.

Inicialmente, as linhagens de células HCT116, HepG2, B16-F10 e MRC-5 foram plaqueadas em microplacas de 96 poços (100µL/poço de uma solução de  $0,7 \times 10^5$  células/mL).

Após 24 horas de incubação, os pigmentos dissolvidos em DMSO foram adicionados em cada poço e incubados por 72 horas. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Quatro horas antes do final do período de incubação que correspondeu a 24 horas, 20 µL da solução estoque (0,312 mg/mL) de alamar blue (resazurina) foram adicionados em cada poço. As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) utilizando uma leitora de placa (Ahmed et al., 1994). O cálculo da porcentagem de inibição foi realizado registrando a porcentagem de inibição x log da concentração e determinado suas IC<sub>50</sub> realizado a partir de regressão não-linear, utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

## Resultados e Discussão

A atividade antimicrobiana dos extratos dos pigmentos obtidos por *R.minuta* URM 5197 e *R.mucilaginosa* URM 7409 foram determinadas pelos ensaios de microdiluição com hexano e metanol (8:2), no qual a Concentração Inibitória Mínima (MIC) e a Concentração Bactericida Mínima (MBC) foram apresentadas na Tabela I.

**Tabela I**

**Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (MBC) para pigmento produzido por *R.minuta* URM 5197 e *R.mucilaginosa* URM 7409.**

Cepas Bacterianas	PRMI(µg/mL)		PRMU(µg/mL)	
	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100	>1000	500	1000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Escherichia coli</i>	>1000	>1000	250	1000
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	1000	1000	500	500

PRMI = Pigmento *R.minuta* URM 5197 , PRMU= Pigmento *R. mucilaginosa* URM 7409.

De acordo com Tanaka e Silva (2005) a MIC > 1000 µg/mL indica atividade inativa,

MIC=500 a 1000 µg/mL atividade fraca, MIC = 100 a 500 µg/mL atividade moderada e MIC < 100 µg/mL atividade boa.

Quando a razão MBC/MIC para qualquer composto, está entre 1:1 e 2:1 essa substância pode ser bactericida, entretanto, se essa relação for maior ou igual 2:1 o composto pode ser bacteriostático (Faria, 2012). Observando os resultados apresentados, o extrato do pigmento da *R.minuta* URM 5197 apresentou uma proporção de 1:1 característica de um agente antibacteriano, com ação bactericida nas cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Em relação ao pigmento obtido de *R.mucilaginosa* URM 7409 foi identificada a proporção de 1:1 para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 demonstrando ação bactericida e 2:1 para *Klebsiella pneumoniae* indicando ação bactericida e bacteriostática do extrato do pigmento para essa cepa.

Yolmeh et al. (2016) ao estudarem a atividade antimicrobiana de pigmento produzido por *Rhodotorula glutinis* utilizando MIC e MBC encontram que para a MIC, considerando as concentrações do pigmento 2mg/mL a 128 mg/mL, a menor MIC ocorreu com 8mg/mL para *B.cereus* e *Streptococcus pyogenes*. De acordo com os autores isso indica ação bacteriostática. Quanto ao teste de MBC com concentrações de 8mg/mL a 128 mg/mL, o menor valor encontrado foi em 32mg/mL para *B.cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *S.pyogenes* e *Enterococcus faecalis*, sugerindo ação bactericida.

Rostami et al. (2016) testaram a atividade antimicrobiana de pigmento produzido por *Micrococcus roseus* e *Rhodotorula glutinis*. Considerando a MIC para o pigmento do *M.roseus* a menor concentração foi 16mg/mL para *B.cereus*, *S. aureus* e *S.pyogenes* e a MBC 32mg/mL para *B.cereus*, *S.aureus*, *S.pyogenes* e *E.faecalis*. Em relação ao pigmento obtido pela *Rhodotorula glutinis*, a menor MIC foi 8mg/mL para *B.cereus* e *S.pyogenes* e a MBC 32mg/mL para *B.cereus*, *S. aureus*, *L.monocytogenes*, *S.pyogenes* e *E.faecalis*.

Acredita-se que o melhor perfil antimicrobiano dos pigmentos produzidos por



leveduras é verificado quando são testados contra cepas de bactérias gram-positivas, isso porque as bactérias gram-negativas possuem lipopolissacarídeos na parede celular e isso impediria o influxo desses compostos ativos para a membrana citoplasmática das bactérias (McKeegan et al., 2002).

Entretanto, no presente estudo foi identificado potencial bacteriostático e bactericida contra bactérias gram-negativas e bactericida para bactéria gram-positiva em menores concentrações do que as realizadas em outros estudos, indicando uma possível ação antimicrobiana dos pigmentos obtida em pequenas concentrações. Esse resultado demonstra a possibilidade de aplicação do pigmento para esse fim, em pequena quantidade, o que implica em um menor custo de produção, já que nos outros estudos para ter uma atividade semelhante foi necessária uma maior concentração.

Os resultados da atividade larvicida dos pigmentos de *Rhodotorula minuta* e *Rhodotorula mucilaginosa* sobre larvas de *Aedes aegypti* estão representados na Tabela II.

Tabela II

**Atividade larvicida dos pigmentos de *Rhodotorula minuta* URM 5197 e *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409.**

		Mortalidade das larvas de <i>Aedes aegypti</i> (%)						
Concentrações (mg/mL)	1 hora		2	4	6	8	10	24
			horas	horas	horas	horas	horas	horas
<i>Rhodotorula minuta</i>	0,25	4,4 <sup>a*</sup>	13,3 <sup>a*</sup>	26,6 <sup>a*</sup>	37,7 <sup>a*</sup>	55,5 <sup>a*</sup>	73,3 <sup>a*</sup>	100 <sup>a*</sup>
	0,125	2,2 <sup>ab**</sup>	3,3 <sup>b**</sup>	9,9 <sup>b*</sup>	15,5 <sup>b*</sup>	26,6 <sup>b*</sup>	41,1 <sup>b*</sup>	95,5 <sup>a*</sup>
	0,0625	0,0 <sup>b**</sup>	0,0 <sup>b**</sup>	5,5 <sup>b*</sup>	15,5 <sup>b*</sup>	25,5 <sup>b*</sup>	27,7 <sup>b*</sup>	37,7 <sup>b*</sup>
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0,25	0,0 <sup>b**</sup>	0,0 <sup>b**</sup>	0,0 <sup>c**</sup>	2,2 <sup>c**</sup>	4,4 <sup>c**</sup>	9,9 <sup>c**</sup>	54,4 <sup>b*</sup>
	0,125	0,0 <sup>b**</sup>	0,0 <sup>b**</sup>	0,0 <sup>c**</sup>	0,0 <sup>c**</sup>	0,0 <sup>c**</sup>	6,6 <sup>c**</sup>	48,8 <sup>b*</sup>
	0,0625	0,0 <sup>b**</sup>	0,0 <sup>b**</sup>	0,0 <sup>c**</sup>	0,0 <sup>c**</sup>	0,0 <sup>c**</sup>	6,6 <sup>c**</sup>	43,3 <sup>b*</sup>
Controles								
DMSO + TWEEN 80		0,0 <sup>**</sup>	0,0 <sup>**</sup>	0,0 <sup>**</sup>	0,0 <sup>**</sup>	0,0 <sup>**</sup>	0,0 <sup>**</sup>	0,0 <sup>**</sup>
TWEEN 80		0,0 <sup>**</sup>	0,0 <sup>**</sup>	0,0 <sup>**</sup>	0,0 <sup>**</sup>	0,0 <sup>**</sup>	0,0 <sup>**</sup>	0,0 <sup>**</sup>
Água deionizada		0,0 <sup>**</sup>	0,0 <sup>**</sup>	0,0 <sup>**</sup>	0,0 <sup>**</sup>	0,0 <sup>**</sup>	0,0 <sup>**</sup>	0,0 <sup>**</sup>

Sobre larvas de *Aedes aegypti*: Médias das concentrações seguidas com letras diferentes nas colunas, diferem significativamente pelo pós teste Tuke ( $P < 0,05$ ). Para comparação com os controles, nas colunas, empregou-se o teste estatístico de Dunnett (\*  $p < 0,05$  e \*\*  $p > 0,05$ ).

Os pigmentos das leveduras *R. minuta* e *R. mucilaginosa* demonstraram atividade larvicida sobre as larvas de *Aedes aegypti*. Com 1 hora de exposição houve mortalidade larval nas concentrações de 0,25 mg mL<sup>-1</sup> e 0,125 mg mL<sup>-1</sup> para o pigmento de *R. minuta*, não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ). No mesmo período não ocorreu mortalidade larval nas diferentes concentrações do pigmento de *R. mucilaginosa*, isso foi observado apenas a partir de 6 horas de exposição na concentração de 0,25 mg mL<sup>-1</sup> e a partir de 10 horas nas menores concentrações.

Em relação ao pigmento de *R. minuta* a mortalidade larval continuou aumento, foi observado para a concentração de 0,0625 mg mL<sup>-1</sup> a partir de 4 horas. A concentração de 0,25 mg mL<sup>-1</sup> foi mais significativa ( $P < 0,05$ ), causando mortalidade superior a 50% em 8 horas e

100% em 24 horas, não diferindo neste último horário de observação apenas da sua concentração de 0,125 mg. mL<sup>-1</sup> ( $P > 0,05$ ), a qual ocasionou 95,5% de mortalidade. No entanto, a concentração de 0,125% diferiu significativamente da concentração de 0,0625 mg mL<sup>-1</sup> ( $P < 0,05$ ) apenas na observação de 24 horas.

Já o pigmento de *R. mucilaginosa*, apesar de ter ocorrido aumento de mortalidade na concentração de 0,25 mg. mL<sup>-1</sup> em 8 e 10 horas atingiu mais de 50% de mortalidade em 24 horas, estes aumentos não apresentaram diferenças significativas com suas demais concentrações em nem um dos últimos períodos de avaliação ( $P > 0,05$ ).

Esses resultados indicam que o pigmento da *R. minuta* é mais tóxico as larvas de *A. aegypti* quando comparado ao pigmento de *R. mucilaginosa*, visto que a mortalidade larval foi identificada desde as primeiras horas de observação com a possibilidade de atingir 95,5 e 100% em 24 horas, a depender da concentração. Estudos voltados para o potencial larvicida de pigmentos oriundo de fungos sobre larvas de mosquitos vetores são escassos e até o desenvolvimento desta pesquisa, não foram encontrados estudos de mesma natureza que envolvessem espécies do gênero *Rhodotorula*. Este estudo é o primeiro relato de atividade larvicida de pigmento de espécies pertencente a este gênero sobre larvas de *A. aegypti*.

No entanto, a toxicidade que pigmentos de fungos podem apresentar sobre larvas de insetos vetores é apoiado pelo estudo desenvolvido por Pradeep et al. (2015), que demonstraram que o pigmento do tipo isoquinolina sintetizado pelo fungo *Fusarium moniliforme* J. Sheld. (1904) apresentou atividade larvicida contra larvas de *A. aegypti* e *Anopheles stephensi* (Liston, 1901). Além disto, o estudo desenvolvido por Gajalakshmi et al. (2019), também demonstraram o potencial larvicida do pigmento produzido por *Monascus purpureus*, o qual ocasionou mortalidade sobre larvas de *Culex sp.*

Levando em consideração que uma substância com potencial neurotóxico em larvas de

insetos pode ocasionar o funcionamento inadequado do corpo e conseqüentemente a morte (Ragavendran et al, 2019), infere-se que a toxicidade dos pigmentos dos fungos *R. minuta* e *R. mucilaginosa*, estejam relacionadas a tal via. A pouca mobilidade das larvas e mortes observadas no presente estudo, corroboram com esta hipótese. O estudo realizado por Ragavendran et al. (2019) demonstraram efeitos similares sobre larvas de *A. aegypti*, como também em *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823), mas não com pigmentos e sim com extrato de micélio do fungo *Penicillium sp.*

Em relação aos grupos controles, não houve mortalidade, o que confirma atividade larvicida dos pigmentos. Contudo, os resultados obtidos demonstraram que o pigmento de *R. minuta* possui efeitos mais significativos sobre as larvas de *A. aegypti*, indicando o potencial do pigmento como uma substância promissora para ser utilizado no sistema integrado desse vetor, o que demanda a continuidade dos estudos.

Para a determinação de citotoxicidade em linhagens de células tumorais *in vitro* os valores foram expressos em IC<sub>50</sub> conforme tabela III.

**Tabela III**

**Valores de IC<sub>50</sub> para a atividade citotóxica em linhagens de células tumorais versus não tumorais.**

<b>Amostras</b>	<b>HCT116</b>	<b>HepG2</b>	<b>B16-F10</b>	<b>MRC-5</b>
PRMI	38,75 24,11 – 45,30	34,57 29,61 – 40,35	33,96 29,98 – 38,46	33,52 27,57 – 40,75
PRMU	>50	>50	>50	>50
DOX	0,06 0,03 – 0,12	0,04 0,02 – 0,06	0,05 0,04 – 0,06	1,39 1,18 – 1,65

A tabela apresenta os valores de IC<sub>50</sub> (concentração inibitória média) e o respectivo intervalo de confiança de 95% obtido a partir de três experimentos independentes realizados em duplicata pelo método do Alamar blue, após 72 horas de exposição com as células HCT116 (carcinoma de colón humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), B16-F10 (melanoma murino) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano) obtidos por regressão não-linear através do programa GraphPad Prisma versão 5.0. Doxorubicina (DOX) foi usada como controle positivo. PRMI = Pigmento *R. minuta* URM 5197, PRMU= Pigmento *R. mucilaginosa* URM 7409.

No presente estudo, os pigmentos produzidos por *R. minuta* e *R. mucilaginosa* não apresentaram atividade citotóxica promissora nas concentrações estudadas, contra células

normais e tumorais. O gênero *Rhodotorula* é conhecido por produzir diferentes carotenoides, dentre eles:  $\beta$ -caroteno, toruleno e torularodina (Moliné et al., 2012), esses dois últimos são conhecidos pelas propriedades anticancerígenas (Kot et al., 2018). É provável que na amostra do pigmento, as proporções desses carotenoides tenham sido menores e isso tenha afetado o resultado desse teste.

Sharma e Ghoshal (2020) ao trabalharem com o pigmento de *Rhodotorula mucilaginosa* MTCC-1403, conseguiram identificar atividade anticancerígena contra células tumorais humanas MCF-7 (câncer de mama). Apesar de alguns carotenoides apresentarem características antitumorais, isso não se aplica a todos e também podem ter esse efeito em células tumorais específicas.

Dessa maneira, é possível afirmar que os pigmentos produzidos por microrganismos podem apresentar composições diferentes e isso impactar nas suas atividades biológicas. No presente estudo os resultados corroboram para essa conclusão, pois ao realizar diferentes testes foi possível notar que o pigmento produzido por leveduras do mesmo gênero, mas de espécies diferentes nas mesmas condições de cultivo apresentaram diferentes atividades biológicas.

### **Agradecimentos**

A Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) pelo apoio financeiro, técnico e administrativo e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo auxílio financeiro para as bolsas de estudo de iniciação científica.

### **Contribuições dos autores**

TMS, EOX, JMT, cultivaram a levedura para produção do inóculo, realizaram a fermentação para produção do pigmento, extraíram o pigmento e o armazenaram para as análises. TMS e

TLASL realizaram os testes de atividade antimicrobiana, tabularam e interpretaram os resultados desses testes. DLS tabulou e discutiu os resultados da atividade larvicida dos pigmentos. DPB realizou os testes de citotoxicidade com células tumorais e tabulou dados. RFQ supervisionou a realização dos testes de atividade antimicrobiana e contribuiu para a realização dos testes de citotoxicidade. TMS e JSF escreveram, discutiram os resultados, revisaram e editaram o manuscrito. Todos os autores aprovaram a versão final deste manuscrito.

#### 4. CONCLUSÃO

Diante dos resultados encontrados no presente estudo, é possível afirmar que a produção de pigmentos naturais, especialmente de carotenoides por bioprocessos é promissora, principalmente quando se almeja a produção em escala industrial. Portanto, conseguir identificar as melhores condições de cultivo, temperatura, agitação, pH, fonte de carbono, proteínas, minerais e vitaminas necessárias são o primeiro passo para domínio da produção de pigmentos por microrganismos. Nesse sentido, não basta saber o microrganismo que produz pigmentos, é necessário encontrar as melhores condições para isso.

Sendo assim, é fato que existe uma nova demanda por parte da indústria para produção desses pigmentos naturais e os microrganismos se destacam por apresentarem baixo custo de manutenção, produção, tempo de cultivo e não sofrem influências do tempo, além de ocuparem pouco espaço.

Outro fator que impulsiona o estudo e aplicação dos bioprocessos, se refere a possibilidade de utilizar resíduos agroindustriais como fonte de carbono, e a depender da composição até mesmo fonte de nitrogênio. Assim, ao mesmo tempo que se deseja produzir um pigmento natural, existe a possibilidade de utilizar resíduos que até então seriam dispensados no meio ambiente sem nenhum tipo de preocupação ou cuidado.

Assim, o pigmento natural sobressai em relação ao pigmento sintético, porque sua funcionalidade não se restringe a coloração, podem apresentar atividades biológicas e serem destinados a outras finalidades. A identificação de atividades biológicas nos pigmentos obtidos impulsionou investigações sobre as possibilidades de aplicação dos mesmos, sejam na indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica e de rações. Dessa forma, estudos que investiguem as melhores condições de cultivo, os melhores resíduos agroindustriais e que analisem a substância produzida, em busca de uma aplicabilidade são fundamentais e relevantes para o avanço científico e tecnológico.

## REFERÊNCIAS

### INTRODUÇÃO

GARCIA-CORTES, A.; GRACIA-VÁSQUEZ, J.A.; ARANGUREN, Y.; RAMIREZ-CASTRILLON, M. Pigment Production Improvement in *Rhodotorula mucilaginosa* AJB01 Using Design of Experiment, *Microorganisms*, v.9, n. 387, p. 2-14, 2021.

GERELMAA, Z.; ZULTSETSEG, Ch.; BATJARGAL, B.; RENTSENKHAND, Ts. Selection of culture media for the production of carotenoids with antioxidant activity by *Rhodotorula glutinis*. *Proceedings of the Mongolian Academy of Sciences*. v.58, n. 4, p. 31-38, 2018.

KOT, A.M.; BŁAŻEJAK, S.; KIELISZEK, M.; GIENKA, I.; BRYŚ, J.; RECZEK, L.; POBIEGA, K. Effect of exogenous stress factors on the biosynthesis of carotenoids and lipids by *Rhodotorula* yeast strains in media containing agro-industrial waste. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.35, n.157, p.1-10, 2019.

LAU, W.; CARVAJAL-ZARRABAL, O.; NOLASCO-HIPÓLITO, C.; KOHEI, M.; GREGORY, Z.A.; ABDULLAH, M.O.; TOH SENGCHIEW.; LIHAN, S. Production of pigments by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Malaysian Journal of Microbiology*, v.14, n.4, p.344-350, 2018.

LOBO, P.T.D.; BRANDÃO, H.N., ASSIS, S.A. Production of carotenoids by *Rhodotorula mucilaginosa* using sugarcane juice (*Saccharum officinarum*) in the fermentation. *Brazilian Journal of Developmen*, v,7, n.12, p.18235- 18250, 2021.

MACHADO, W.R.C.; SOARES, B.V.; Del BIANCHI, V.L. Produção de carotenoides por meio de fermentação em estado sólido com *Rhodotorula mucilaginosa* em bagaço de laranja (*Citrus sinensis*). *Revista de Engenharia e Tecnologia*, v. 11, n. 3, p. 48-57, 2019.

MANIMALA, M.R.A; MURUGESAN, R. Carotenoid pigment production from Yeast: Health benefits and their industrial applications. *International Journal of Chemistry*, v.5, p.392-395, 2017.



MAPARI, S.A.S.; NIELSEN, K.F.; LARSSSEN, T.O.; FRISVAD, J.C.; MEYER, A.S.; THRANE, U. (2005). Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potencial natural food colorants. *Current Opinion in Biotechnology*, v.16, p.231-238, 2005.

MESQUITA, S.S.; TEIXEIRA, C.M.L.L.; SERVULO, E.F. Carotenoides: Propriedades, Aplicações e Mercado. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n.2, p. 672-688, 2017.

MISHA, B.; VARJANI, S.; KARTHIKEYA SRINIVASA VARMA, G. Agro-Industrial By-Products in the Synthesis of Food Grade Microbial Pigments: An Eco-Friendly Alternative. *Energy, Environment, and Sustainability*, p. 245-265, 2019.

PANESAR, R.; KAUR, S.; PANESAR, P.S. Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review. *Current Opinion in Food Science*, v.1, p. 70 -76, 2015.

PARASAR, D.P.; RAMAKRISHNAN, E.; KABILAN, S.; KOTOKY, J.; SARMA, H.K. Characterization of  $\beta$ -Cryptoxanthin and other Carotenoid Derivatives from *Rhodotorula taiwanensis*, A Novel Yeast Isolated from Traditional Starter Culture of Assam. *Chemistry & Biodiversity*, 1-27, 2021.

RODRIGUES, D.B.; FLORES, D.B.; BARIN, J.S.; MERCADANTE, A.Z.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L.Q. Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes. *Food Research International*, v. 65, p.144-148, 2014.

ROSTAMI H, HAMED H & YOLMEH, M. 2016. Some biological activities of pigments extracted from *Micrococcus roseus* (PTCC 1411) and *Rhodotorula glutinis* (PTCC 5257). *Int J Immunopathol Pharmacol* 29:684-695.

SHARMA, R.; GHOSHAL, G. Optimization of carotenoids production by *Rhodotorula mucilaginosa* (MTCC-1403) using agro-industrial waste in bioreactor: A statistical approach. *Biotechnology Reports*, v. 25, p. 1-11, 2020.

SILVA, S.R.S.; STAMFORD, T.C.M.; ALBUQUERQUE, W.W.C.; VIDAL, E.E.; STAMFORD, T.L.M. Reutilization of residual glycerin for the produce  $\beta$ -carotene by

*Rhodotorula minuta*. *Biotechnology Letters*, v.42, p. 437- 443., 2020.

SILVA, M. C. **Alterações na biossíntese de carotenoides em leveduras induzidas por agentes químicos**. 2004. 134 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2004.

TANG, W.; WANG, Y.; ZHANG, J.; CAI, Y.; HE, Z. Biosynthetic pathway of carotenoids in *Rhodotorula* and strategies for enhanced their production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.29, n.4, p.507-517, 2019.

VARMIRA, K.; HABIBI, A.; MORADI, S.; BAHRAMIAN, E. Experimental Evaluation of Airlift Photobioreactor for Carotenoid Pigments Production by *Rhodotorula rubra*. *Romanian Biotechnological Letters*, 2017.

VENIL, C.K.; YUSOF, N.Z.B.; AHMAD, W.A. Solid State Fermentation Utilizing Agro-Industrial Waste for Microbial Pigment production. *Sustainable Agriculture towards Food Security*, p. 375-381, 2017.

YOLMEH, M; KHOMEIRI, M. Effect of mutagenesis treatment on antimicrobial and antioxidant activities of pigments extracted from *Rhodotorula glutinis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, n.10, p. 285-290, 2017.

ZOHARI, M.; AKHAVAN SEPAHY, A.; AMINI, K. Molecular Cloning and Anti-Cancer Activity of Carotenoid Pigments Isolated from *Micrococcus* spp. and *Rhodotorula* spp. *Journal of Sciences*, v.32, n.1, p.29 - 37, 2021.

## CAPITULO 1

ABNT (2004). Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 10004. **Resíduos Sólidos. Classificação.**

[http://www.suape.pe.gov.br/images/publicacoes/normas/ABNT\\_NBR\\_n\\_10004\\_2004.pdf](http://www.suape.pe.gov.br/images/publicacoes/normas/ABNT_NBR_n_10004_2004.pdf).

Aquarone, E., Borzani, W., Schmidell Netto, W. & Lima, U. de A. (2001). *Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos*. São Paulo: Edgard Blucher.

Aruldas, C.A., Dufossé, L. & Ahmad, W.A. (2018). Current perspective of yellowish – Orange pigments from microorganisms – a review. *Journal of Cleaner Production*, 180, 168-182. doi: 10.1016/j.jclepro.2018.01.093.

Biff, S., Silva & M.R. da (2016). Uso do resíduo sólido proveniente do processo de beneficiamento de areia na indústria de revestimentos cerâmicos e sua influência nas propriedades físicas dos produtos cerâmicos. *Revista Matéria*, 21(4), 853- 865.

Buzzini, P. & Martini, A. (2000). Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. *Bioresource Technology*, 71, 41- 44. doi:10.1016/S0960-8524(99)00056-5.

Cheng, Y-T. & Yang, C-F. (2016). Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 61, 270 - 275. doi:10.1016/j.jtice.2015.12.027.

Coelho, A.R.; de Andrade Nóbrega, G.M.; Pagnocca, F.C.; Hoffmann, F.L.; Harada, K.I. & Hirooka, E.Y. (2011). Avaliação do potencial antagonístico de leveduras, visando biocontrole de deterioração por *Penicillium expansum*. *Semina: Ciências Agrárias*, 1879-1892.

Costa, I. (1992). **Produção de β-caroteno por uma espécie do gênero *Rhodotorula***. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Dworecka-Kaszak, B. & Kizerwetter-Świda, M. (2011). Pseudomycelium forming *Rhodotorula* – unusual picture of biofilm. *Mikologia Lekarska*, 18(2), 74-78.

Fell, J.W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G. & Statzell-Tallman, A. (2000). Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(3), 1351-1371. doi: 10.1099/00207713-50-3-1351.

Frengova, G.I. & Beshova, D.M. (2009). Carotenoides from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnolog*, 36, 163-180.

Gan, H. M., Thomas, B. N., Cavanaugh, N. T., Morales, G. H., Mayers, A. N., Savka, M. A., & Hudson, A. O. (2017). Whole genome sequencing of *Rhodotorula mucilaginosa* isolated from the chewing stick (*Distemonanthus benthamianus*): insights into *Rhodotorula* phylogeny, mitogenome dynamics and carotenoid biosynthesis. *PeerJ*, 5, 1-18. doi:10.7717/peerj.4030.

- Gómez-García, M. R. & Ochoa-Alejo, N. (2013). Biochemistry and molecular biology of carotenoid biosynthesis in chili peppers (*Capsicum spp.*). *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (9), 19025-19053.
- Heer, K. & Sharma, S. (2017). Microbial pigments as a natural color: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 8 (5), 1913-1922.
- Hernández-Almanza, A., Montanez, J.C., Aguilar-González, M.A., Martínez-Ávila, C., Rodríguez-Herrera, R. & Aguilar, C.N. (2014). *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. *Food Bioscience*, 5, 64-72.
- Hoog G.S. de, Guarro J., Gené, J. & Figueras M.J (2000). Atlas of Clinical Fungi (2a ed.). Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Ioannou, P., Vamvoukaki, R., Samonis, G. (2018). *Rhodotorula* species infections in humans: A systematic review. *Mycoses*, 62 (2), 90-100.
- Kot, A.M., Błażej, S., Kieliszek, M., Gientka, I., Bryś, J., Reczek, L. & Pobiega, K. (2019). Effect of exogenous stress factors on the biosynthesis of carotenoids and lipids by *Rhodotorula* yeast strains in media containing agro-industrial waste. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35 (157), 1-10. doi: 10.1007/s11274-019-2732-8.
- Kot, A.M., Blazejak, S., Kieliszek, M., Gientka, I., Piwowarek, K. & Brzezińska, R. (2020). Production of lipids and carotenoids by *Rhodotorula gracilis* ATCC 10788 yeast in a bioreactor using low - cost wastes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 26, 1-8. doi: 10.1016/j.bcab.2020.101634.
- Kot, A.M., Blazejak, S. & Kurez, A. (2016). *Rhodotorula glutinis* – potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (14), 6103-6117. doi: 10.1007/s00253-016-7611-8.
- Kwon-Chung, K.J. & Bennett, J.E. (1992). Cryptococcosis. *Medical Mycology Philadelphia*, 8, 397-445.
- Leite, P., Sousa, D., Fernandes, H., Ferreira, M., Costa, A. R., Filipe, D., Gonçalves, M., Peres, H., Belo, I. & Salgado, J.M. (2021). Recent advances in production of lignocellulolytic enzymes by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 27, 1-25. doi: 10.1016/j.cogsc.2020.100407.
- Li, H., Huang, L., Zhang, Y. & Yan, Y. (2020). Production, Characterization and Immunomodulatory Activity of an Extracellular Polysaccharide from *Rhodotorula mucilaginosa* YL-1 Isolated from Sea Salt Field. *Marine drugs*, 18 (595), 1-16. doi:10.3390/md18120595.
- 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 (2), 182-189. doi: 10.1016/j.bej.2007.02.014.
- Lobo, P.T.D., Brandão, H.N. & Assis, S.A.de (2021). Production of carotenoids by *Rhodotorula mucilaginosa* using sugarcane juice (*Saccharum officinarum*) in the

fermentation. *Brazilian Journal of Development*, 7 (2), 18235-18250.

Lopes, H.J.S., Bonturi, N., Kerkhoven, E.J., Miranda, E.A. & Lahtvee, P. (2020). C/N ratio and carbon source-dependent lipid production profiling in *Rhodotorula toruloides*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104,2639-2649.

Loss, S.H., Antonio, A.C.P., Roehrig, C., Castro, P.S. & Maccari, J.G. (2013). Meningite e endocardite infecciosa causada por *Rhodotorula mucilaginosa* em paciente imunocompetent. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, 23(4), 507-509.

Machado, W.R.C. & Burkert, J.F. de M. (2014). Produção de carotenoides microbianos pela levedura *Sporidiobolus pararoseus* utilizando coprodutos. *Revista de Engenharia e Tecnologia*, 6 (2), 59-69.

Machado, W.R.C., Soares, B.V. & Del Bianchi, V.L. (2019). Produção de carotenoides por meio de fermentação em estado sólido com *Rhodotorula mucilaginosa* em bagaço de laranja (*Citrus sinensis*). *Revista de Engenharia e Tecnologia*, 11(3), 48-57.

Malajovich, M.A. (2004). *Biocologia*. Rio de Janeiro: Axcell Books do Brasil.

Malik, K., Tokkas, J. & Goyal, S. (2012). Microbial pigments: a review. *International Journal of Microbial Resource Technology*, 1(4), 361-365.

Malisorn, C. & Suntornsuk, W. (2008). Optimization of  $\beta$ -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. *Bioresource Technology*, 99 (7), 2281 - 2287. doi:10.1016/j.biortech.2007.05.019.

Manimala, M.R.A & Murugesan, R. (2017). Carotenoid pigment production from Yeast: Health benefits and their industrial applications. *International Journal of Chemistry*, 5, 392-395.

Mapari, S.A.S., Nielsen, K.F., Larssen, T.O., Frisvad, J.C., Meyer, A.S. & Thrane, U. (2005). Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potencial natural food colorants. *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 231-238.

Markou, G. & Georgakaki, D. (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (bluegreen algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Apple Energy*, 88, 3389 - 3401. doi: 10.1016/j.apenergy.2010.12.042.

Maza, D.D., Viñartab, S.C., Suc, Y., Guillamón, J.M. & Aybar, M.J. (2020). Growth and lipid production of *Rhodotorula glutinis* R4, in comparison to other oleaginous yeasts. *Journal of Biotechnology*, 310, 21-31. doi: 10.1016/j.jbiotec.2020.01.012.

Medeiros, F. O., Alves, F. G., Lisboa, C. R., Martins, D. de S., Burkert, C. A. V. & Kalil, S. J. (2008). Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de  $\beta$ -galactosidase para uso em laboratório. *Química Nova*, 31 (2), 336- 339.

Menezes, J.D.S., Druzian, J.I., Padilha, F.F. & Souza, R.R. (2012). Produção Biotecnológica de goma xantana em alguns resíduos agroindustriais, caracterização e aplicações. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, 8 (8),1761-1776.

- Mesquita, S.S da, Teixeira, C.M.L.L. & Servulo, E. (2017). Carotenoids: Properties, Applications and Market. *Revista Virtual de Química*, 9(2), 672-688. doi:10.21577/1984-6835.20170040.
- Miceli, M.H, Díaz, J.A. & Lee, S.A. (2011). Emerging opportunistic yeast infections. *The Lancet Infectious Diseases*, 11(2),142-151. doi: 10.1016/S1473-3099(10)70218-8.
- Michelon, M., Borba, T.M., Rafael, R.S., Burkert, C.A.V. & Burkert, J.F.M., (2012). Extraction of carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: a comparison between different techniques of cell disruption. *Food Science and Biotechnology*, 21, 1-8.
- Miziorko, H. M. (2011). Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Archives of Biochemistry Biophysics*, 505(2), 131-143.
- Monks, L. M.; Rigo, A.; Mazutti, M. A.; Oliveira, J. V. & Valduga, E. (2013). Use of chemical, enzymatic and ultrasound-assisted methods for cell disruption to obtain carotenoids. *Biocatalysis and Agricultural biotechnology*, 2 (2), 165-169.
- Nelson, D.L.& Cox, M.M. [tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga ... et al.]; revisão técnica: Carlos Termignoni ... [et al.]. (2014). *Princípios de Bioquímica de Lehninger* (6ª ed.). Porto Alegre: Artmed.
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 81-84.
- Panesar, R., Kaur, S. & Panesar, P.S. (2015). Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review. *Current Opinion in Food Science*, 1, 70 -76.
- Park,P. K.; Kim, E. Y. & Chu, K. H. (2007). Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments. *Separation and Purification Technology*, 53, 148-152.
- Pereira Jr., N., Bon, E.P.S. & Ferrara, M.A. (2008). *Tecnologia de Bioprocessos. Séries em Biotecnologia*, 1, Rio de Janeiro: Escola de Química, UFRJ.
- Petrik, S., Marova,I., Haronikova, A., Kostovova, I. & Breierova, E. (2013). Production of biomass, carotenoid and other lipid metabolites by several red yeast strains cultivated on waste glycerol from biofuel production – a comparative screening study. *Annals of Microbiology*, 63, 1537 - 1551.
- Pinheiro, T.L.F. (2006). **Produção de Lípases por fermentação em estado sólido e submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo**. Dissertação de mestrado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS, Brasil.  
Disponível: <  
[https://www.uricer.edu.br/eal\\_hp/DissertPDF/Turma2004/DissertThaisFontoura2006.pdf](https://www.uricer.edu.br/eal_hp/DissertPDF/Turma2004/DissertThaisFontoura2006.pdf)>
- Potenza, L., Chitasombat, M. N., Klimko, N., Bettelli, F., Dragonetti, G., Del Principe, M. I., ... Pagano, L. (2018). *Rhodotorula* infection in haematological patient: risk factors and outcome. *Mycoses*, 62(3), 223-229. doi:10.1111/myc.12875.
- Querol, A. & Fleet, G.H. (2006). *The yeast handbook. Yeast in food and beverages*. (2a ed.). Berlin, Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.

- Rodrigues, D.B., Flores, D.B., Barin, J.S., Mercadante, A.Z., Jacob-Lopes, E. & Zepka, L.Q. (2014). Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes. *Food Research International*, 65, 144-148. doi: 10.1016/j.foodres.2014.06.037.
- Rodrigues, T.A.; Schueler, T.A.; da Silva, J.R.; Sérvulo, E.F.C. & Oliveira, F.J.S. (2019). Valorization of solid wastes from the brewery and biodiesel industries for the bioproduction of natural dye. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 36(1), 99 -107.
- Samadlouie, H.R., Jahanbin, K. & Jalali, P. (2020). Production, medium optimization, and structural characterization of an extracellular polysaccharide produced by *Rhodotorula minuta* ATCC 10658. *Food Science & Nutrition*, 8, 4957-4964. doi: 10.1002/fsn3.1792.
- Sampaio, J.P. (2011). Chapter 155 - *Rhodotorula* Harrison (1928). *The yeasts (Fifth Edition)*, 1873-1927. doi:10.1016/B978-0-444-52149-1.00155-5.
- Sanchés, C. (2009). Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Advances*, 27(2), 185-194. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.11.001.
- Schneider, T., Graeff-Hönninger, S., French, W.T., Hernandez, R., Merkt, N., Claupein, W., Hetrick, M. & Pham, P. (2013). Lipid and carotenoids production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents. *Energy*, 61, 34-43.
- Sen, T., Barrow, C.J. & Deshmukh, S.K. (2019). Microbial Pigments in the Food Industry - Challenges and the Way Forward. *Frontiers in Nutrition*, 6 (7), 1-14. doi: 10.3389/fnut.2019.00007.
- Sharma, R. & Ghoshal, G. (2020). Optimization of carotenoids production by *Rhodotorula mucilaginosa* (MTCC-1403) using agro-industrial waste in bioreactor: A statistical approach. *Biotechnology Reports*, 25, 1-11. doi: 10.1016/j.btre.2019.e00407.
- Silva, S.R.S., Stamford, T.C.M., Albuquerque, W.W.C., Vidal, E.E. & Stamford, T.L.M. (2020). Reutilization of residual glycerin for the produce b-carotene by *Rhodotorula minuta*. *Biotechnology Letters*, 42, 437- 443.
- Silva, T.M.; Silva Neto, A.B. da; Teixeira, J.M.; Cerqueira-Silva, C.B.M.; Gualberto, S.A.; Freitas, J.S. de. (2021). Optimization of pigment production by *Rhodotorula minuta* URM 5197 and *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409 using yellow passion fruit peel (*Passiflora edulis*). *Research, Society and Development*, 10, 17, e152101724311.
- Squina, F.M. & Mercadante, A.Z. (2003). Análise, por CLAE, de carotenoides de cinco linhagens de *Rhodotorula*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 39 (3), 309-318.
- Tang, W., Wang, Y., Zhang, J., Cai, Y. & He, Z. (2019). Biosynthetic pathway of carotenoids in *Rhodotorula* and strategies for enhanced their production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(4), 507-517. doi: 10.4014/jmb.1801.01022.
- Taylor, L. T. (1996). *Supercritical Fluid Extraction*. New York: John Wiley & Sons.
- Tinoi, J., Rakariyatham, N. & Deming, R.L. (2005). Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolysed mung bean waste flour as substrate.

*Process Biochemistry*, 40 (7), 2551-2557.

Tuli, H.S., Chaudhary, P., Beniwal, V. & Sharma, A.K., (2015). Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. *Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 4669-4678. doi: 10.1007/s13197-014-1601-6.

Uenojo. M., Maróstica Junior, M.R. & Pastore, G.M. (2007). Carotenóides: Propriedades, Aplicações e Biotransformação para formação de compostos de aroma. *Química Nova*, 30(3), 616-622.

Valduga, E., Tatsch, P, O; Tiggeman, L., Treichel, H., Toniozzo, G., Zeni, J. & Dilucio, M. (2009). Produção de carotenoides: Microrganismos com fonte de pigmentos naturais. *Revista Química Nova On-Line*, 32 (9), 2429-2436. doi: 10.1590/S0100-40422009000900036.

Venil, C.K, Zakaria, Z.A. & Ahmad, W.A. (2013). Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, 48 (7), 1065-1079. doi: 10.1016/j.procbio.2013.06.006.

Wanderley, M. D.; Neves, E.& Andrade, C. J. (2011). Aspectos da produção industrial de enzimas. *Revista Hestia Citino*, 1(1), 30-36.

Wirth, F. & Goldani, L.Z. (2012). Review Article. Epidemiology of *Rhodotorula*: An Emerging Pathogen. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2012, 1-7. doi: 10.1155/2012/465717.

Xue, F., Gao, B., Zhu, Y., Zhang, X., Feng, W. & Tan, T. (2010). Pilot - scale production of microbial lipid using starch wastewater as raw material. *Bioresource Technology*, 101(15), 6092 - 6095. doi: 10.1016/j.biortech.2010.01.124.

Yadav, K.S. & Prabha, R. (2014). Extraction of Pigments from *Rhodotorula* Species of Dairy Environment. *Indian Journal of Science and Technology*, 7 (12),1973-1977. doi: 10.17485/ijst/2014/v7i12.28.



### CAPITULO 3

AHMED SA, GOGAL RM & WALSH JE. 1994. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods* 170: 211 - 224.

BOIK J. 2001. Natural compounds in cancer therapy. Oregon Medical Press, Minnesota, USA, p. 25.

BROINIZI PRB, ANDRADE-WARTHA ERS DE, SILVA AM DE O, NOVOA AJV, TORRES RP, AZEREDO HMC, ALVES RE & MANCINI-FILHO J. 2007. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale L.*). *Ciênc Tecnol Aliment* 27: 902-908.

CIPOLATTI EP, MANOEL EA, FERNANDEZ – LAFUENTE R, FREIRE DMG. 2017. Support engineering: relation, between development of new supports for immobilization of lipases and their applications. *Biotechnol Res Int* 1:26-34.

CIPOLATTI EP, REMEDIA RD, SÁA C DOS S, RODRIGUES AB, RAMOSA JMG, BURKERT CAV, FURLONG EB, BURKERT JF DE M. 2019. Use of agroindustrial byproducts as substrate for production of carotenoids with antioxidant potential by wild yeasts. *Biocatal Agric Biotechnol* 10: 1-9.

CUNHA MG, FRANCHIN M, GALVÃO LCC, RUIZ ALTG, CARVALHO JE, IKEGAKI M, ALENCAR SM, KOOH H & ROSALEN PL. 2013. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. *BMC Complement. Alternat Med* 13:2-9.

DAWOUD TM, ALHARBI NS, THERUVINTHALAKAL AM, THEKKANGIL A, KADAIKUNNAN S, KHALED JM, ALMANAA TN, SANKAR K, INNASIMUTHU GM, ALANZI KF & RAJAM SK. 2020. Characterization and antifungal activity of the yellow pigment produced by *Bacillus sp.* DBS4 isolated from the lichen *Dirinaria agealita*. Saudi J Biol Sci 27:1403-1411.

FARIA RN. 2012. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico da folha de *Phanera flexuosa* (Moric.) L. P. Queiroz (Caesalpinioideae) e da inibição dos fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos. Dissertação. Mestrado em Ciências Fisiológicas, 115p.

GAJALAKSHMI P, RAJA A, BANU HMV. 2019. Efficacy of polyketide pigment produced by *Monascus purpureus* and its biological activity. Nutrafoods 2:113-120.

GERELMAA Z, ZULTSETSEG CH, BATJARGAL B, RENTSENKHAND TS. 2018. Selection of culture media for the production of carotenoids with antioxidant activity by *Rhodotorula glutinis*. Proc Mong Acad Sci 58:31-38.

KECELI TM, ERGINKAYA Z, TURKKAN E, KAYA U. 2013. Antioxidant and Antibacterial Effects of Carotenoids Extracted from *Rhodotorula glutinis* Strains. Asian J Chem 25:42-46.

KOT AM, BŁAŻEJAK S, GIENKA I, KIELISZEK M, BRYŚ J. 2018. Torulene and torularhodin: “new” fungal carotenoids for industry? Microb Cell Fact. 17: 2-14.

KUSKOSKI EM, ASUERO AG, TRONCOSO AM, MANCINI-FILHO J & FETT R. 2005. Aplicacion de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidant en pulpa de

frutos. Food Sci. Technol 25:726-732.

LAGASHETTI AC, DUFOSSÉ L, SINGH SK & SINGH, PN. 2019. Fungal Pigments and Their Prospects in Different Industries. Microorganisms. 7: 1-36.

LOPEZ FC, LIGABUE-BRAUN R. 2021. Agro-industrial Residues: Eco-Friendly and Inexpensive Substrates for Microbial Pigments Production. Front Sustain Food Syst 5:1-16.

MCKEEGAN KS, BORGES-WALMSLEY MI & WALMSLEY AR. 2002. Microbial and viral drug resistance mechanisms. Trends Microbiol 10: S8-S14.

MESQUITA SS, TEIXEIRA, CMLL & SERVULO, EFC. 2017. Carotenoides: Propriedades, Aplicações e Mercado. Rev Virtual Quim 9: 672-688.

MILLER HE. 1971. A simplified method for the evaluation of antioxidants. J Am Oil Chem Soc 48: 91.

MOLINÉ M, LIBKIND D & VAN BROOCK M. 2012. Production of torularhodin, torulene and  $\beta$ -carotene by *Rhodotorula* yeasts. Methods Mol Biol 898: 275 - 283.

NASCIMENTO JC, LAGE LFO, CAMARGOS CRD, AMARAL JC, COSTA L M, SOUSA NA & OLIVEIRA FQ. 2011. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da Bauhinia variegata L. Rev Bras Farm 92: 327- 332.

NUMAN M, BASHIR S, MUMTAZ R, TAYYAB S, REHMAN NU, KHAN AL, SHINWARIL ZK & AL-HARRASI A. 2018. Therapeutic applications of bacterial pigments: a review of current status and future opportunities. 3 Biotech 8:1-15.

O'BRIEN J, WILSON I, ORTON T & POGNAN F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. Eur J Biochem 267: 5421-5426.

PRADEEP FS, PALANISWAMY M, RAVI S, THANGAMANI A & PRADEEP BV. 2015. Larvicidal activity of a novel isoquinoline type pigment from *Fusarium moniliforme* KUMBF1201 against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. Process Biochem 50: 1479-1486.

PICCINELLI AL, DE SIMONE F, PASSI S AND RASTRELLI L. 2004. Phenolic constituents and antioxidant activity of *Wendita calysina* leaves (burrito), a folk Paraguayan tea. J Agric Food Chem 52: 5863-5868.

RAGAVENDRAN C, MANIGANDAN V, KAMARAJ C, BALASUBRAMANI G, PRAKASH JS, PERUMAL P & NATARAJAN D. 2019. Larvicidal, histopathological, antibacterial activity of indigenous fungus *Penicillium* sp. against *Aedes aegypti* L and *Culex quinquefasciatus* (Say)(Diptera: Culicidae) and its acetylcholinesterase inhibition and toxicity assessment of zebrafish (*Danio rerio*). Front microbiol 10: 1-17.

RE R, PELEGRINI N, PROTEGGENTE A, PANNALA A, YANG M & RICE-EVANS C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med 26:1231-1237.

ROSTAMI H, HAMED I H & YOLMEH, M. 2016. Some biological activities of pigments extracted from *Micrococcus roseus* (PTCC 1411) and *Rhodotorula glutinis* (PTCC 5257). Int J Immunopathol Pharmacol 29:684-695.

SANTOS TLA DOS, QUEIROZ RF, SAWAYA ACHF, LOPEZ BG-C, SOARES MBP, BEZERRA DP, RODRIGUES, ACBC, PAULA VF DE & WALDSCHMIDT AM. 2017. *Melipona mondury* produces a geoproplis with antioxidant, antibacterial and antiproliferative activities. An Acad Bras Ciênc 89:2247-2259.

SHARMA R & GHOSHAL G. 2020. Characterization and cytotoxic activity of pigment extracted from *Rhodotorula mucilaginosa* to assess its potential as biofunctional additive in confectionary products. J Food Sci Technol 58:2688-2698.

SILVA SRS, STAMFORD TCM, ALBUQUERQUE WWC, VIDAL EE & STAMFORD TLM. 2020. Reutilization of residual glycerin for the produce  $\beta$ -carotene by *Rhodotorula minuta*. Biotechnol Lett 42: 437- 443.

SILVA TM, SILVA NETO AB da; TEIXEIRA JM, CERQUEIRA-SILVA CBM, GUALBERTO SA., FREITAS JS de. 2021. Optimization of pigment production by *Rhodotorula minuta* URM 5197 and *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409 using yellow passion fruit peel (*Passiflora edulis*). Res Soc Dev 10, 17: e152101724311.

SUFFNESS M & PEZZUTO JM. 1990. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann K. Editor. Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity. London:

Academic Press, 71-133p.

YOLMEH M, HAMED H AND KHOMEIRI M. 2016. Antimicrobial Activity of Pigments Extracted from *Rhodotorula glutinis* Against Some Bacteria and Fungi. *Zahedan J Res Med Sci* 18:1-5.

## **ANEXOS**

**Anexo 1** - Guia para elaboração de trabalhos acadêmicos (com base na ABNT – NBR 14724 e Regimento Geral do PMBqBM).



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB**  
*Campus* VITÓRIA DA CONQUISTA  
**PROGRAMA MULTICÊNTRICO EM**  
**BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR –**  
**PMBqBM**

**GUIA PARA ELABORAÇÃO**  
**DE TRABALHOS**  
**ACADÊMICOS (COM BASE**  
**NA ABNT-NBR 14724 e**  
**REGIMENTO GERAL DO**  
**PMBqBM)**

VITÓRIA DA CONQUISTA – BA  
2017



## **APRESENTAÇÃO**

Segundo documento da ABNT - NBR 14724, “dissertação é o documento que representa o resultado de um trabalho experimental ou exposição de um estudo científico retrospectivo, de tema único e bem delimitado em sua extensão, com o objetivo de reunir, analisar e interpretar informações. Deve evidenciar o conhecimento de literatura existente sobre o assunto e a capacidade de sistematização do candidato. É feito sob coordenação de um orientador (doutor), visando à obtenção do título de mestre.” A tese é o “documento que representa o resultado de um trabalho experimental ou exposição de um estudo científico de tema único e bem delimitado. Deve ser elaborado com base em investigação original, constituindo-se em real contribuição para a especialidade em questão. É feito sob a coordenação de um orientador (doutor) e visa a obtenção do título de doutor, ou similar.”

Este guia contém os itens básicos relativos a apresentação escrita do trabalho do exame de qualificação do mestrado, dissertação e tese. As informações sobre os prazos e procedimentos encontram-se nas normas internas do PMBqBM.

Para um maior detalhamento consultar o documento original da ABNT.

## **ESTRUTURA DO TRABALHO**

A estrutura do trabalho (que será descrita mais detalhadamente adiante) é composta por partes obrigatórias e opcionais. De acordo com a ABNT/NBR-14724, o trabalho compreende três elementos: pré-textuais, textuais e pós-textuais.

### **ELEMENTOS PRÉ-TEXTUAIS**

Capa – Obrigatório (**Modelo 1**)

Folha de rosto – Obrigatório

(**Modelo 2**) Ficha catalográfica –  
Obrigatória

Folha de aprovação – Obrigatória

(**Modelo 3**) Dedicatória – Opcional

Agradecimentos –

Obrigatório Epígrafe –

Opcional

Resumo – Obrigatório

Abstract – Obrigatório

Sumário – Obrigatório

(**Modelo 4**) Lista de Figuras –

Obrigatório Lista de Anexos –

Obrigatório

Lista de Apêndices – Obrigatório, quando

houver Lista de abreviaturas e siglas –

Obrigatório

### **TEXTUAIS**

Introdução – Obrigatório

Objetivos – Obrigatório

Desenvolvimento –

Obrigatório Conclusão –

Obrigatório Próximos

trabalhos – Opcional

Próximas etapas e cronograma – Para exame de qualificação

### **PÓS-TEXTUAIS**

Referências – Obrigatório

Apêndices – Opcional

Anexos – Opcional

## 1. CONFIGURAÇÃO DAS PÁGINAS

**Tamanho do papel:** padrão A4 (210 x 297 mm)

**Margens:** As folhas devem apresentar margem esquerda e superior a 3 cm; direita e inferior de 2 cm

**Espaçamento entrelinhas:** 1,5 cm

**Recuo de primeira linha:** 1,25 cm

**Tamanho e forma da letra do texto:** Times New Roman, tamanho 12 ou Arial tamanho 12. Nomes científicos, em latim e língua estrangeira devem ser escritos em itálico. Os títulos de cada seção devem ser em caixa alta, centralizados e em negrito.

**Paginação:** a numeração deve figurar no canto superior direito da folha, em algarismos romanos minúsculos nas páginas preliminares (pré-textuais), com exceção da página de rosto, que não deve ser numerada, porém contada. Na parte textual a numeração, em sequência, é colocada em algarismos arábicos. Segundo norma da ABNT: “todas as folhas do trabalho, a partir da folha de rosto, devem ser contadas sequencialmente, mas não numeradas. A numeração é colocada, a partir da primeira folha da parte textual, em algarismos arábicos, no canto superior direito da folha, a 2 cm da borda superior, ficando o último algarismo a 2 cm da borda direita da folha. Havendo apêndice e anexo, as suas folhas devem ser numeradas de maneira contínua e sua paginação deve dar seguimento à do texto principal”.

**Cabeçalho:** opcional. Deve conter o nome do autor, ano e parte do título do trabalho.

## 2. ESTRUTURA DO TRABALHO

### ELEMENTOS PRÉ TEXTUAIS

**Capa:** obrigatória. Deve conter a instituição, autor, título, e na base da página local (município e Estado) e data (mês e ano) (**Modelo 1**).

**Folha-de-rosto:** obrigatória. Dados utilizados na elaboração da ficha catalográfica: autor, título, finalidade do trabalho (em letra tamanho 10, abaixo do título e concentrada à direita (**Modelo 2**):

“Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre”

“Tese apresentada ao Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor”

“Trabalho de qualificação de mestrado apresentado ao Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre”

**Ficha catalográfica:** obrigatória. Deve ser colocada no verso da folha-de-rosto, sendo elaborada por profissional especializado (bibliotecário, a partir das informações fornecidas pelo autor), sendo enquadrada num retângulo de 8,0 x 12,5 cm. O discente deverá consultar a Biblioteca setorial sobre os procedimentos de emissão da ficha catalográfica. Dispensável para o trabalho do exame de qualificação.

**Folha de Aprovação:** obrigatória. Deve constar logo após a folha de rosto, na versão final do trabalho após a defesa, e ser assinada pelos componentes da banca examinadora, sendo três assinaturas para os exames de qualificação e mestrado e cinco para defesas de tese (**Modelo 3**). Dispensável para o trabalho do exame de qualificação.

**Dedicatória:** opcional. Página na qual o autor presta uma homenagem ou dedica o seu trabalho a outras pessoas, texto em itálico.

**Agradecimentos:** obrigatório. Manifestação de agradecimento a pessoas e instituições que, de alguma forma, colaboraram para a execução do trabalho. Deve ser dirigido àqueles que realmente contribuíram de maneira relevante na elaboração do trabalho, especificando-se em que colaboraram. O título (AGRADECIMENTOS) deve estar centralizado.

**Epígrafe:** opcional. Texto em itálico, no qual o autor apresenta uma citação,

seguida de indicação de autoria. Nessa folha não se coloca título.

**Resumo:** obrigatório. Texto curto, no máximo com uma página, com a descrição sintética dos aspectos relacionados aos objetivos, justificativa, material e métodos, resultados e conclusões do trabalho. Logo abaixo do resumo devem figurar as palavras-chave ou descritores (no máximo de 5), ou seja, as palavras representativas do conteúdo do trabalho.

**Abstract:** obrigatório. Consiste na versão do resumo em inglês. Logo abaixo do resumo em língua estrangeira devem figurar as palavras-chave ou descritores no idioma escolhido (no máximo de 5).

**Sumário:** obrigatório. Relação dos tópicos hierarquizados do trabalho, com a indicação da página onde se encontra cada assunto, a partir das listas de figuras, na sequência em que aparecem no texto. Usa-se o termo Sumário (e não índice ou lista) para designar esta parte. A palavra Sumário, no título desta folha, é colocada sem número, centralizada e com o mesmo tipo e tamanho de fonte das seções primárias. O espaçamento entrelinhas deverá ser simples. (**Modelo 4**).

**Lista de figuras:** obrigatório, quando houver. Útil quando se tem muitas figuras no texto.

**Lista de tabelas:** obrigatório, quando houver.

Lista de Apêndices: obrigatório, quando houver.

Lista de Anexos: obrigatório, quando houver.

Lista de abreviaturas e siglas: obrigatório. Lista em ordem alfabética das abreviaturas e siglas, utilizadas no texto, seguida de sua descrição por extensor. Observação: caso um nome científico de um organismo seja citado com o classificador, todos os demais devem ser citados da mesma forma pelo menos na primeira vez em que for mencionado. O mesmo com relação à abreviação do gênero, isto é, só poderá ocorrer a abreviação com a primeira letra do gênero após citação por completo.

## **ELEMENTOS TEXTUAIS**

**INTRODUÇÃO:** obrigatório. Deve conter uma visão geral de todo o trabalho com base na literatura em até 5 (cinco) páginas. A citação de autoria deverá seguir as normas da ABNT.

**OBJETIVOS:** obrigatório. Deve conter os objetivos gerais e específicos propostos no trabalho.

**DESENVOLVIMENTO:** obrigatório. Deve ser escrito em capítulos. O primeiro capítulo obrigatoriamente é uma revisão bibliográfica no formato de um artigo de revisão de revista à escolha do autor(a) e orientador(a) para exame de qualificação, dissertação e tese. No entanto, o(a) discente poderá redigir um referencial teórico contendo o estado da arte do trabalho a ser defendido ao invés do artigo de revisão. Os demais capítulos deverão conter os dados obtidos no mestrado seguindo as exigências de uma revista científica de escolha do autor(a) e orientador(a) para escrita de um artigo original. Assim, antes de cada capítulo o autor deve indicar o nome do trabalho, revista escolhida e link do guia ao autor da revista, centralizados na página. As referências do primeiro e demais capítulos deverão vir agrupadas ao final em elementos pós-textuais, exceto no caso de artigos já publicados ou submetidos, cujas referências compõem o manuscrito.

No caso de artigo já submetido, aceito ou publicado, ele deve ser inserido como capítulo.

Para o exame de qualificação de mestrado, caso não haja trabalhos findados, os dados a serem incluídos no segundo capítulo em diante são parciais.

**CONCLUSÃO:** obrigatório. Sintetiza a contribuição do trabalho e deve estar de acordo com os objetivos. Não deve conter dados, comentários ou discussão dos resultados.

**PRÓXIMOS TRABALHOS:** opcional para qualificação. No caso de mudança de nível realizada concomitantemente à qualificação de mestrado, o discente deverá obrigatoriamente incluir neste item a problemática/justificativa, novos objetivos, metodologia e resultados esperados em até 5 páginas.

**PRÓXIMAS ETAPAS E CRONOGRAMA:** obrigatório para os exames de qualificação. O autor deve descrever o que ainda será feito e o tempo dispendido para alcançar cada meta utilizando uma tabela. No caso de mudança de nível, o cronograma deverá contemplar os 48 meses do doutorado, sendo que o período no mestrado entra no cômputo total.

## **ELEMENTOS PÓS-TEXTUAIS**

**REFERÊNCIAS:** obrigatória. Relação da bibliografia efetivamente consultada para a produção da Introdução, Capítulos e proposta de projeto de doutorado (para os candidatos à mudança de nível). As referências devem ser feitas de acordo com as normas da ABNT, e digitadas em espaço simples e separadas entre si por espaço duplo.

**APÊNDICES:** opcional. Apêndices são documentos (textos, ilustrações, tabelas, questionários, etc.) elaborados pelo autor, com a função de fundamentar, comprovar ou ilustrar ítems do estudo apresentados no texto. Relação do que o autor considera merecer registro. Os apêndices devem ser identificados por meio de letras maiúsculas consecutivas, travessão e seus respectivos títulos.

**ANEXOS:** opcional. Anexos são constituídos de tabelas, quadros, gráficos, ilustrações, questionários, entre outros documentos, não elaborados pelo autor. Têm por finalidade documentar, fundamentar, comprovar ou ilustrar itens descritos no texto. Os anexos devem ser identificados por meio de letras maiúsculas consecutivas, travessão e seus respectivos títulos.

**Obs.1:** Quando for o caso de pesquisa com envolvimento de seres humanos ou animais, é obrigatória a inclusão de um anexo com a cópia do parecer de aprovação do Comitê de Ética. No caso de artigos aceitos para publicação, deve-se anexar a carta de aceite.

**Obs.2:** Para um maior detalhamento de normas e regras para escrita de trabalhos acadêmicos, consulte o documento original da ABNT (NBR 14724:2011) e o Regimento geral do PMBqBM.



**Modelo 1**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB**  
**PROGRAMA MULTICÊNTRICO EM**  
**BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR –**  
**PMBqBM**



(Fonte escolhida; tamanho 12, maiúsculo centralizado)

**NOME DO ALUNO**

(Fonte escolhida; tamanho 12, maiúsculo centralizado)

**TÍTULO DO TRABALHO DO *Homo sapiens***

(Título em negrito – Fonte escolhida, tamanho 14 e centralizados, nomes científicos e latim devem estar em itálico e não grafados em caixa alta)

**CIDADE - BA**

**MÊS – ANO**

(Fonte escolhida; tamanho 12, centralizado)

**Modelo 2****NOME DO ALUNO**

(Fonte escolhida; tamanho 12, maiúsculo centralizado)

**TÍTULO DO TRABALHO**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

**Orientador:** Nome do Orientador

**Co-orientador:** Nome do Co-orientador (se houver)

(Fonte escolhida; tamanho 10, parágrafo justificado com recuo esquerdo)

**CIDADE –BA**

**MÊS-ANO**

(Fonte escolhida; tamanho 12, centralizado)

**Modelo 3****TERMO DE APROVAÇÃO**

(Fonte escolhida; tamanho 12, maiúsculo centralizado)

**NOME DO ALUNO**

(Fonte escolhida; tamanho 12, maiúsculo centralizado)

**TÍTULO DO TRABALHO**

(Título em negrito – Fonte escolhida, tamanho 12 e centralizado, nomes científicos e latim devem estar em itálico e não grafados em caixa alta)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular)

\_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2017

**Comissão Examinadora:**

---

Nome do orientador

Instituição

---

Nome do professor

Instituição

---

Nome do orientador

Instituição

Modelo**SUMÁRIO**

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>08</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1. OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>16</b>
<b>3. DESENVOLVIMENTO .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1. REVISÃO SOBRE GEOPROPÓLIS .....</b>	<b>17</b>
<b>3.2. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E ANTINOCEPTIVA DA     GEOPROPÓLIS .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3. PROSPECÇÃO BIOGUIADA DA GEOPROPÓLIS .....</b>	<b>40</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>6. SUGESTÃO PARA TRABALHO FUTURO .....</b>	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>62</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>70</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>75</b>

## Anexo 2 - Guia para autores da Revista Research, Society and Development

### Submissões

O cadastro no sistema e posterior acesso, por meio de login e senha, são obrigatórios para a submissão de trabalhos, bem como para acompanhar o processo editorial em curso. [Acesso](#) em uma conta existente ou [Registrar](#) uma nova conta.

### Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

- O arquivo em Microsoft Word enviado no momento da submissão **não** possui os nomes dos autores; A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em [Diretrizes para Autores](#).
- Custo de publicação (APC) | Para autores brasileiros a taxa de publicação é de R\$ 300,00 BRL (trezentos reais). Para demais autores, a taxa de publicação é de US\$ 100,00 USD (cem dólares americanos). A taxa de publicação é cobrada apenas para trabalhos aceitos. **Não existe taxa de submissão.**

### Diretrizes para Autores

#### 1) Estrutura do texto:

- Título em português, inglês e espanhol.
- Os autores do artigo (devem ser colocados nesta sequência: nome, ORCID, instituição, e-mail). OBS.: O número do ORCID é individual para cada autor, e ele é necessário para o registro no DOI, e em caso de erro, não é possível realizar o registro no DOI).
- Resumo e Palavras-chave em português, inglês e espanhol (o resumo deve conter objetivo do artigo, metodologia, resultados e conclusão do estudo. Deve ter entre 150 a 250 palavras);
- Corpo do texto (deve conter as seções: 1. Introdução, na qual haja contextualização, problema estudado e objetivo do artigo; 2. Metodologia utilizada no estudo, bem como autores de suporte a metodologia; 3. Resultados (ou alternativamente, 3. Resultados e Discussão, renumerando os demais subitens); 4. Discussão e, 5. Considerações finais ou Conclusão);
- Referências: (Autores, o artigo deve ter no mínimo 20 referências as mais atuais possíveis. Tanto a citação no texto, quanto no item de Referências, utilizar o estilo de formatação da APA - American Psychological Association. As referências devem ser completas e atualizadas. Colocadas em ordem alfabética crescente, pelo sobrenome do

primeiro autor da referência. Não devem ser numeradas. Devem ser colocadas em tamanho 8 e espaçamento 1,0, separadas uma das outras por um espaço em branco).

## 2) Layout:

- Formato Word (.doc);
- Escrito em espaço 1,5 cm, utilizando Times New Roman fonte 10, em formato A4 e as margens do texto deverão ser inferior, superior, direita e esquerda de 1,5 cm.;
- Recuos são feitos na régua do editor de texto (não pela tecla TAB);
- Os artigos científicos devem ter mais de 5 páginas.

## 3) Figuras:

O uso de imagens, tabelas e as ilustrações deve seguir o bom senso e, preferencialmente, a ética e axiologia da comunidade científica que discute os temas do manuscrito. Obs: o tamanho máximo do arquivo a ser submetido é de 10 MB (10 mega).

As figuras, tabelas, quadros etc. (devem ter sua chamada no texto antes de serem inseridas. Após a sua inserção, deve constar a fonte (de onde vem a figura ou tabela...) e um parágrafo de comentário no qual se diga o que o leitor deve observar de importante neste recurso. As figuras, tabelas e quadros... devem ser numeradas em ordem crescente. Os títulos das tabelas, figuras ou quadros devem ser colocados na parte superior e as fontes na parte inferior.

## 4) Autoria:

O arquivo em word enviado (anexado) no momento da submissão NÃO deve ter os nomes dos autores.

Todos os autores precisam ser incluídos apenas no sistema da revista e na versão final do artigo (após análise dos pareceristas da revista). Os autores devem ser registrados apenas nos metadados e na versão final do artigo (artigo final dentro do template) em ordem de importância e contribuição na construção do texto. OBS.: Autores escrevam o nome dos autores com a grafia correta e sem abreviaturas no início e final artigo e também no sistema da revista.

O artigo deve ter no máximo 15 autores. Para casos excepcionais é necessário consulta prévia à Equipe da Revista.

## 5) Vídeos tutoriais:

- Cadastro de novo usuário: <https://youtu.be/udVFytOmZ3M>

- Passo a passo da submissão do artigo no sistema da revista: <https://youtu.be/OKGdHs7b2Tc>

6) Exemplo de referências em APA:

- Artigo em periódico:

Gohn, M. G. & Hom, C. S. (2008). Abordagens Teóricas no Estudo dos Movimentos Sociais na América Latina. *Caderno CRH*, 21(54), 439-455.

- Livro:

Ganga, G. M. D.; Soma, T. S. & Hoh, G. D. (2012). *Trabalho de conclusão de curso (TCC) na engenharia de produção*. Atlas.

- Página da internet:

Amoroso, D. (2016). *O que é Web 2.0?* <http://www.tecmundo.com.br/web/183-o-que-e-web-2-0->

7) A revista publica artigos originais e inéditos que não estejam postulados simultaneamente em outras revistas ou órgãos editoriais.

8) Dúvidas: Quaisquer dúvidas envie um e-mail para [rsd.articles@gmail.com](mailto:rsd.articles@gmail.com) ou [dorlivete.rsd@gmail.com](mailto:dorlivete.rsd@gmail.com) ou WhatsApp (55-11-98679-6000)

### ***Declaração de Direito Autoral***

Autores que publicam nesta revista concordam com os seguintes termos:

1) Autores mantêm os direitos autorais e concedem à revista o direito de primeira publicação, com o trabalho simultaneamente licenciado sob a Licença Creative Commons Attribution que permite o compartilhamento do trabalho com reconhecimento da autoria e publicação inicial nesta revista.

2) Autores têm autorização para assumir contratos adicionais separadamente, para distribuição não-exclusiva da versão do trabalho publicada nesta revista (ex.: publicar em repositório institucional ou como capítulo de livro), com reconhecimento de autoria e publicação inicial nesta revista.

3) Autores têm permissão e são estimulados a publicar e distribuir seu trabalho online (ex.: em repositórios institucionais ou na sua página pessoal) a qualquer ponto antes ou durante o processo editorial, já que isso pode gerar alterações produtivas, bem como aumentar o impacto e a citação do trabalho publicado.

### ***Política de Privacidade***

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.



## Anexo 3 - Guia para autores Anais da Academia Brasileira de Ciências

### Instructions to authors

The journal Anais da Academia Brasileira de Ciências from 2012 onwards only considers online submissions. Once you have prepared your manuscript according to the instructions below, please visit the new, improved online submission website at <https://mc04.manuscriptcentral.com/aabc-scielo>. Please read these instructions carefully and follow them strictly. In this way you will help ensure that the review and publication of your paper are as efficient and quick as possible. The editors reserve the right to return manuscripts that are not in accordance with these instructions. Papers must be clearly and concisely written in English.

#### Aim and editorial policy

All submitted manuscripts should contain original research not previously published and not under consideration for publication elsewhere. The primary criterion for acceptance is scientific quality. Papers should avoid excessive use of abbreviations or jargon, and should be intelligible to as wide an audience as possible. Particular attention should be paid to the Abstract, Introduction, and Discussion sections, which should clearly draw attention to the novelty and significance of the data reported. Failure to do this may result in delays in publication or rejection of the paper. Articles accepted for publication become property of the journal.

Texts can be published as a review, a full paper (article) or as a short communication. Issues appear in March, June, September and December.

#### Types of Papers

##### Reviews

Reviews are published by **invitation only** and still have to undergo our peer review process. However, a proposal for a Review may be submitted via e-mail to our editorial staff ([aabc@abc.org.br](mailto:aabc@abc.org.br)). The e-mail should state the topics and authors of the proposed review, as well as the abstract, academy section and the justification why the topic is of particular interest to the field.

The AABC allows authors to deposit preprints of their submission in community preprint servers such as ArXiv.org and bioRxiv.org. However, the authors must update their entries expressly acknowledging that the article has been accepted/published by AABC.

##### Letters to the Editor

Letters to the Editor will be subjected to editing and revision and should not contain material that has been submitted or published elsewhere. Letters in reference to an article published by the AABC

should not exceed 250 words (excluding references), and must be received within four weeks after online publication of the article. Letters not related to an article published by the AABC should not exceed 500 words (excluding references). A letter can have no more than ten references and one figure or table.

### Articles

Whenever possible the articles should be subdivided into the following parts: **1.** Front Page; **2.** Abstract (written on a separate page, 200 words or less, no abbreviations); **3.** Introduction; **4.** Materials and Methods; **5.** Results; **6.** Discussion; **7.** Acknowledgments, if applicable; **8.** Author Contributions (when the paper has more than one author); **9.** References. **10.** Figure legends, if applicable. Articles from some areas such as Mathematical Sciences should follow their usual format. In some cases, it may be advisable to omit part (4) and to merge parts (5) and (6). Whenever applicable, the Materials and Methods section should indicate the Ethics Committee that evaluated the procedures for human studies or the norms followed for the maintenance and experimental treatments of animals.

### Short communications

Short communications aim to report a **concise, but important contribution on research**, which has progressed to the stage when it is considered that results should be publicized to other workers in the field. A short communication should also have an Abstract (100 words or less), a short introduction (up to 200 words) and should not exceed 1,500 words. Tables and Figures may be included but the text length should be proportionally reduced. This section of the AABC should contain extremely relevant contributions and competition is very high.

After the first screening, the articles will be evaluated by at least two reviewers, them being from educational and/or national and international research institutions, with proven scientific production. After due corrections and possible suggestions, the paper may be accepted or rejected, considering the reviews received.

We use the integrated Crossref Similarity Check program to detect plagiarism.

There are no APC and submission charges in the AABC.

### Preparation of manuscripts

All parts of the manuscript should be double-spaced throughout. After acceptance, no changes will be made in the manuscript so that proofs require only corrections of typographical errors. The authors should send their manuscript in electronic version only.

#### Length of manuscript

While papers may be of any length required for the concise presentation and discussion of the data, succinct and carefully prepared papers are favored both in terms of impact as well as in readability. They must not, however, exceed 50 pages, including all items (figures, tables, references, etc...), unless previously agreed with

the Editor-in-Chief.

### **Title page**

The title page of the manuscript should present the following items: **1.** Title of the article (the title should be up to 150 characters including spaces, and informative to a broad scientific community); do not include abbreviations in the title. **2.** Full name(s) of all author(s); use superscript numbers right after each author name to indicate the affiliation; **3.** Professional address and ORCID of all authors, including Department and Institution name, street name and number, ZIP/Postal code, City, State and Country; **4.** Key words (four to six in alphabetical order separated by commas); **5.** Running title (a short version of the title, up to 50 characters including spaces); **6.** Academy Section to which the content of the work belongs; **7.** Name, address, phone number, e-mail of the correspondent author, including to whom all correspondence and proofs should be sent to (please indicate the corresponding author with an \* after the name). Should any of these requirements not be met, we may unsubmit your paper and ask for corrections.

### **Abstract**

The abstract must contain no more than 200 words and present the main findings of the article, including a brief introduction, the objectives of the work and a conclusion based on the presented findings. If the authors are submitting an invited/authorized review, the abstract must introduce the main theme of the review and explicit the contribution of the revision to the field. References should not be included in the abstract.

### **Manuscript text**

All text should be written in double-space using 12-point Times New Roman or equivalent typeface. Please organize, whenever possible, the text into the following parts: **1.** Title Page; **2.** Abstract (written on a separate page, 200 words or less, no abbreviations); **3.** Introduction; **4.** Materials and Methods; **5.** Results; **6.** Discussion; **7.** Acknowledgments, if applicable; **8.** Author contributions, when there is more than one author, explaining briefly how each author has contributed for the paper **9.** References. **10.** Figure and table legends, if applicable.

Articles from some areas such as Mathematical Sciences should follow their usual format. In some cases it may be advisable to omit part (4) and to merge parts (5) and (6). Whenever applicable, the Materials and Methods section should indicate the Ethics Committee that evaluated the procedures for human studies or the norms followed for the maintenance and experimental treatments of animals. All procedures must be described in detail. Use American English style to write the text. Chemical names should be provided according to IUPAC, and strains of organisms should be specified. Provide names of reagents and/or equipment suppliers. Use units and symbols according to Bureau International des Poids et Mesures (SI) symbols whenever possible.

### **Acknowledgments**

These should be included at the end of the text. Personal acknowledgments should precede those of institutions or agencies. Footnotes should be avoided; when necessary they must be numbered. Acknowledgments to grants and scholarships, and of indebtedness to colleagues as well as mention to the origin of an article (e.g. thesis) should be added to the Acknowledgments section. Include the full name of the funding agency, country, and funded project number (if applicable).

## Abbreviations

These should be defined at their first occurrence in the text, except for official, standard abbreviations. Units and their symbols should conform to those approved by the Bureau International des Poids et Mesures (SI).

## Figure Legends

This information must be provided at the end of the manuscript, after the abbreviations. All figures must contain a descriptive legend. The legend must contain an introductory sentence that describes the main findings. All panels (if applicable) must be identified in the figure legend by lower case letters (1a, 2a, 2b, 3c, 3d, etc.). When presenting error bars, please inform if a number that follows the  $\pm$  sign is a standard error of mean (SEM) or a standard deviation of mean (SD). Or include in the legend if the presented result is representative of N individual experiments.

## Tables

Each table should have a brief title above it. Table footnotes should be placed below the table. Tables have to be cited in the paper in Roman numerals (Table I, Table II, Tables IV and V, etc.). Tables must be submitted as separate files in editable format, preferably as \*.doc or \*.docx file.

## Figures

Only high-quality figures will be accepted (minimum of 300 dpi). All illustrations will be considered figures including drawings, graphs, maps, photographs, etc. Their tentative placement in the text should be indicated and all figures must be cited with their respective number along the text. Figures should be sent according to the following specifications: 1. Drawings and illustrations should be in format .PS/EPS or .CDR (PostScript or Corel Draw) and never be inserted in text; 2. Images or figures in grayscale should be in format .TIF and never be inserted in text; 3. Each figure should be saved and sent in a separate file; 4. Figures should, in principle, be submitted at the size they are to appear in the journal, i.e., 8 cm (one column) or 16.2 cm (two columns) wide, with maximal height for each figure and respective legend smaller than or equal to 22 cm.

The legends to the figures should be sent double-spaced on a separate page. Each linear dimension of the smallest characters and symbols should not be less than 2 mm after reduction. Colored figures are accepted just as much as b/w ones, but up to 5 black and white figures are free of charge, while every colored figure will be charged, due communication will be made in the production phase (after the evaluation process), should the author want them colored as well in the printed version. For the purpose of counting black and white figures, tables occupying two thirds of the page or having more than 12 columns or 24 rows will be considered b/w figures; 5. Manuscripts on Mathematics, Physics or Chemistry may be typesetted in TEX, AMS-TEX or LaTeX; 6. Manuscripts without mathematical formulae may be sent in .RTF or doc/docx for Windows.

## References

Authors are responsible for the accuracy of the References. Published articles and those in press may be included. Personal communications (Smith, personal communication) must be authorized in writing by those involved. References to thesis, meeting abstracts (not published in indexed journals) and manuscripts in preparation or submitted, but not yet accepted, should be cited in the text as (Smith

et al., unpublished data) and should NOT be included in the list of references.

The references should be cited in the text as, for example, 'Smith 2004', 'Smith & Wesson 2005' or, for three or more authors, 'Smith et al. 2006'. Two or more papers by the same author(s) in the same year should be distinguished by letters, e.g. 'Smith 2004a', 'Smith 2004b' etc. Letters should also distinguish papers by three or more authors with identical first author and year of publication. References should be listed according to the alphabetical order of the first author, always in the order SURNAME XY in which X and Y are initials. If there are more than ten authors, use et al. after the first author. References must contain the title of the article. Names of the journals should be abbreviated without dots or commas. For the correct abbreviations, refer to lists of the major databases in which the journal is indexed or consult the World List of Scientific Periodicals. The abbreviation to be used for the Anais da Academia Brasileira de Ciências is An Acad Bras Cienc. The following examples are to be considered as guidelines for the References.

## REFERENCES

ALBE-FESSARD D, CONDES-LARA M, SANDERSON P & LEVANTE A. 1984a. Tentative explanation of the special role played by the areas of paleospinothalamic projection in patients with deafferentation pain syndromes. *Adv Pain Res Ther* 6: 167-182.

ALBE-FESSARD D, SANDERSON P, CONDES-LARA M, DELAND-SHEER E, GIUFFRIDA R & CESARO P. 1984b. Utilisation de la depression envahissante de Leão pour l'étude de relations entre structures centrales. *An Acad Bras Cienc* 56: 371-383.

KNOWLES RG & MONCADA S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298: 249-258.

PINTO ID & SANGUINETTI YT. 1984. Mesozoic Ostracode Genus *Theriosynoecum* Branson, 1936 and validity of related Genera. *An Acad Bras Cienc* 56: 207-215.

*Books and book chapters*  
DAVIES M. 1947. An outline of the development of Science. Thinker's Library, n. 120. London: Watts, 214 p.

PREHN RT. 1964. Role of immunity in biology of cancer. In: NATIONAL CANCER CONFERENCE, 5., Philadelphia. Proceedings ... , Philadelphia: J. B. Lippincott, p. 97-104.

UYTENBOGAARDT W & BURKE EAJ. 1971. Tables for microscopic identification of minerals, 2nd ed., Amsterdam: Elsevier, 430 p.

WOODY RW. 1974. Studies of theoretical circular dichroism of polipeptides: contributions of B-turns. In: BLOUTS ER ET AL. (Eds), Peptides, polypeptides and proteins, New York: J Wiley & Sons, New York, USA, p. 338-350.