

## IX CONGRESSO VIRTUAL DE AGRONOMIA

### **Emprego de solventes biocompatíveis na extração de carotenoides da biomassa de *Rhodotorula glutinis* CCT-2186**

Lara Vicente Ferreira Rocha<sup>1</sup>, Cassamo Ussemame Mussagy<sup>1</sup>, Jorge Fernando Brandão Pereira<sup>2</sup>, Valéria de Carvalho Santos Ebinuma<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Campus de Araraquara, UNESP

<sup>2</sup>Universidade de Coimbra, CIEPQPF, Departamento de Engenharia Química, FCTUC, Polo II, Coimbra, Portugal

Araraquara

2021

## RESUMO

Neste trabalho estudou-se técnicas de extração de carotenoides da biomassa de *Rodotorula glutinis* usando biosolventes. Inicialmente foi realizado o cultivo da levedura *R. glutinis* em biorreator para obtenção da biomassa. Posteriormente, foi realizada uma triagem da extração dos carotenoides presentes na biomassa com solventes orgânicos comuns, biosolventes e líquidos iônicos à base de colina. Os solventes com características moderadamente hidrofóbicas, nomeadamente, o hexanoato de colina e o isopropanol, apresentaram as maiores capacidades de extração, quando comparado ao solvente orgânico controle dimetilsulfóxido (DMSO). Além disso, os parâmetros da extração razão sólido-líquido (RSL) e temperatura foram avaliados, obtendo-se os melhores resultados para uma RSL de 0,2g/mL e temperatura de 65°C. Desta maneira, é possível extrair carotenoides da biomassa de *R. glutinis* empregando solventes biocompatíveis e mais sustentáveis.

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Carotenoides são um grupo de pigmentos naturais de coloração amarela, laranja ou vermelha, encontrados em plantas, vegetais, algas, óleos e em microrganismos, incluindo a levedura *Rhodotorula glutinis* (KOT *et al.*, 2019). Esses compostos são altamente lipossolúveis e podem ser classificados em dois grupos, carotenos e xantofilas (SAINI; KEUM, 2018).

Esses compostos apresentam diversas funções biológicas, como, por exemplo, atividade pró-vitamina A, atividade antioxidante, proteção contra a exposição à luz UV, o fortalecimento do sistema imune, atividade anticancer e a proteção contra doenças oculares. Por isso, são utilizados em diversos setores industriais, como indústrias de cosméticos, farmacêutica, de alimentos e de ração (KOT *et al.*, 2019; SAINI; KEUM, 2018 e MUSSAGY, *et al.*, 2018).

A síntese microbiológica dos carotenoides é mais vantajosa com relação a extração a partir de vegetais e a síntese química, pois diminui os custos do processo utilizando cepas melhoradas e fontes de nutrientes provenientes de resíduos industriais no cultivo, além de necessitarem de menos espaço para a produção. A levedura *R. glutinis* produz e acumula aproximadamente 50% do seu peso seco em carotenoides e lipídeos (KOT *et al.*, 2019).

Devido às suas características lipofílicas, a maior parte dos carotenoides microbianos é intracelular, sendo comumente extraídos da biomassa utilizando compostos orgânicos voláteis (VOCs). Contudo, atualmente é necessário buscar métodos alternativos de extração desses compostos, em particular utilizando solventes ambientalmente favoráveis, não tóxicos e biodegradáveis, como os biosolventes e os líquidos iônicos (LIs) (MUSSAGY, *et al.*, 2018 e SAINI; KEUM, 2018). Isso se deve porque solventes orgânicos são altamente inflamáveis, voláteis, tóxicos e com baixa degradação no ambiente, causando problemas ambientais e para a saúde (BYRNE, *et al.*, 2016; MUSSAGY, *et al.*, 2018 e SAINI; KEUM, 2018).

Seguindo os pressupostos apresentados, o presente resumo apresenta o desenvolvimento de métodos alternativos usando solventes ambientalmente favoráveis e biocompatíveis como uma plataforma efetiva para a extração de carotenoides da biomassa de *R. glutinis* CCT- 2186.

## 2. OBJETIVOS

Avaliar métodos de extração de carotenoides da biomassa úmida de *R. glutinis* combinando métodos convencionais e não convencionais, aplicando solventes ambientalmente favoráveis e biocompatíveis.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Cultivo de *R. glutinis*

A produção de carotenoides foi realizada biorreator TEC-BIO-7,5VI Tecnal, a 30 °C, sob agitação de 300 rpm e 1vvm por 72 h utilizando meio de cultivo derivado do meio Czapek-Dox. Posteriormente, o meio fermentado foi submetido a centrifugação para separação da biomassa do meio líquido. As células obtidas foram lavadas e ressuspensas em tampão fosfato pH 7, para então serem empregadas nos testes de rompimento celular e consequentemente, obtenção dos carotenoides.

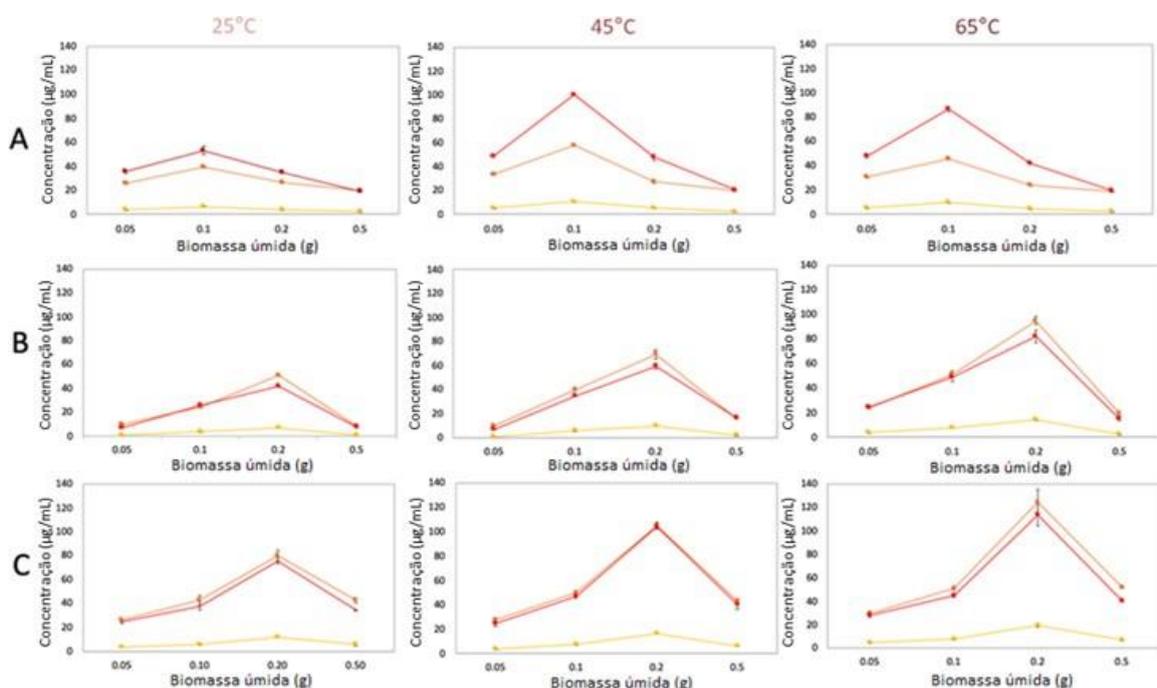
### 3.2 Ensaios de extração dos carotenoides da biomassa de *R. glutinis*

A obtenção dos carotenoides intracelulares da biomassa de *R. glutinis* CCT-2186 foi realizado por permeação seletiva da membrana celular. As células de *R. glutinis* foram tratadas utilizando solventes orgânicos comuns, como Dimetilsulfóxido (DMSO), e biosolventes, nomeadamente, líquidos iônicos (LIs) à base de colina (propanoato de colina, butanoato de colina, pentanoato de colina e hexanoato de colina), etanol e isopropanol. A extração foi realizada pesando 0,05g, 0,1g, 0,2g e 0,5g de biomassa úmida, que foram adicionadas a tubos do tipo Eppendorf<sup>®</sup> de 2 mL, e 1 mL dos solventes foram adicionados a diferentes temperaturas (25°C, 45°C e 65°C). As misturas foram homogeneizadas em agitador de amostras orbitais (Norte Científica, NH 2200) por 1 h a 100 rpm. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 12000 rpm a 25 °C em uma centrífuga Eppendorf<sup>®</sup> 5415r. Após a centrifugação, os sobrenadantes do lisado celular foram filtrados usando uma membrana filtrante millipore (0,22 µm) e então determinou-se as composições de carotenoides, ( $\beta$ -caroteno, toruleno e torularodina) por absorbância, em triplicata, em espectrofotômetro Genesys 10S UV-Vis-Thermo Scientific nos comprimentos de onda de 455 nm, 480 nm e 500 nm, respectivamente.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O screening realizado com diversos solventes orgânicos comuns e biosolventes demonstraram que a solubilização completa da biomassa úmida para extração dos carotenoides depende do teor de água na biomassa e hidrofobicidade do solvente. Com isso, os solventes DMSO (controle), etanol, isopropanol e os líquidos iônicos (LIs) à base de colina, nomeadamente propanoato de colina ([Ch][Pro]), butanoato de colina ([Ch][But]), pentanoato de colina ([Ch][Pent]) e hexanoato de colina ([Ch][Hex]) (biosolventes avaliados) obtiveram boa solubilidade com a biomassa e foram avaliados para a extração desses pigmentos. A Figura 1 abaixo ilustra os rendimentos de reação obtidos para cada solvente nas diferentes temperaturas e razão sólido-líquido (RSL) avaliadas. Como é possível observar, a RSL e o carotenoide mais extraído são diferentes para os biosolventes (etanol e isopropanol) e para o solvente orgânico comum controle (DMSO). Para o DMSO, a RSL ideal é de 0,1g/mL e o carotenoide mais extraído foi a torularodina, enquanto que para os biosolventes essa RSL

é de 0,2g/mL e o carotenoide mais extraído foi o  $\beta$ -caroteno. Além disso, o aumento da temperatura favoreceu a extração desses pigmentos tanto para o solvente controle quanto para os biosolventes. A baixa RSL para o DMSO pode estar relacionado com o aumento da quantidade de biomassa que gerou um incremento da viscosidade do meio, que dificultou a transferência de massa desses pigmentos do meio intracelular para o extracelular. Como o DMSO é mais hidrofílico do que os biosolventes, a torularodina teve maior afinidade, por isso foi o carotenoide mais extraído por esse solvente. Com relação aos biosolventes, ambos obtiveram o mesmo perfil de extração com RSL de 0,2g/mL e o carotenoide mais extraído sendo o  $\beta$ -caroteno. Entretanto, o aumento da hidrofobicidade do isopropanol com relação ao etanol, promoveu também um aumento dos rendimentos de extração, devido à maior afinidade com esses pigmentos lipofílicos.



**Figura 1.** Rendimentos de extração de  $\beta$ -caroteno (laranja), torularodina (vermelho) e toruleno (amarelo) utilizando A- DMSO (controle), B- etanol e C- isopropanol, avaliando a razão sólido-líquido das células de *R. glutinis* após 1 hora agitando a 100 rpm e 25°C, 45°C e 65°C.

A Tabela 1 a seguir apresenta os resultados de extração utilizando os líquidos iônicos à base de colina.

**Tabela 1.** Rendimentos de extração de  $\beta$ -caroteno, torularodina e toruleno utilizando DMSO (controle) e soluções aquosas dos LIs (90% v/v) em uma concentração de 0,2g/mL de biomassa úmida após 1 hora de agitação a 100 rpm e 25°C.

Solvente	Carotenoide		
	$\beta$ -caroteno	Torularodina	Toruleno
DMSO	26,578 $\pm$ 0,981	35,002 $\pm$ 0,817	4,190 $\pm$ 0,115
[Ch][Pro]	9,380 $\pm$ 0,002	11,332 $\pm$ 0,014	0,655 $\pm$ 0,01
[Ch][But]	15,243 $\pm$ 0,034	16,578 $\pm$ 0,005	1,386 $\pm$ 0,029
[Ch][Pent]	23,573 $\pm$ 0,033	23,745 $\pm$ 0,023	2,130 $\pm$ 0,017
[Ch][Hex]	116,793 $\pm$ 0,003	110,15 $\pm$ 0,031	14,815 $\pm$ 0,004

Pode-se observar que os resultados obtidos apresentam um perfil semelhante ao obtido para os biosolventes etanol e isopropanol, com maior extração de  $\beta$ -caroteno. Além disso, pode-se verificar que com o aumento da cadeia alquílica ânion utilizado na síntese dos LIs promove um aumento da extração dos carotenoides, devido ao aumento da hidrofobicidade LI utilizado na extração e afinidade com os pigmentos. O LI [Ch][Hex] promoveu um aumento de aproximadamente 6 vezes na extração de  $\beta$ -caroteno e 2 vezes de torularodina, quando comparados com o solvente controle (DMSO).

## 5. CONCLUSÃO

O presente trabalho avaliou métodos alternativos de extração de carotenoides intracelulares presentes na biomassa de *R. glutinis* CCT-2186. Todos os biosolventes e LIs analisados permitiram a extração dos 3 carotenoides analisados ( $\beta$ -caroteno, torularodina e toruleno), porém observou-se que o aumento da hidrofobicidade relativa do solvente permite aumentar a capacidade de recuperação dos compostos intracelulares. Os solventes com melhores capacidades para a recuperação foram o isopropanol e o hexanoato de colina, os quais permitiram extrações de  $\beta$ -caroteno 6 vezes superiores ao controle (DMSO). Além disso, estes resultados permitiram também concluir a importância do parâmetro no processo de extração, onde o aumento da temperatura do processo de extração permitiu uma diminuição da viscosidade da solução e maior difusão dos carotenoides do meio intracelular para o extracelular. A razão sólido-líquido é também um fator importante na extração, visto que a mesma está diretamente relacionada com a de saturação do sistema, a partir da qual não é possível melhorar os índices de extração dos carotenoides.

## 6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o auxílio financeiro recebido pela FAPESP (Processo 2019/09618-3).

## 7. REFERÊNCIAS

- BYRNE, F. P. *et al.* Tools and techniques for solvent selection: green solvent selection guides. **Sustainable Chemical Processes**, 2016, 4, 7.
- KOT, A. M. *et al.* Simultaneous production of lipids and carotenoids by the red yeast *Rhodotorula* from waste glycerol fraction and potato wastewater. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2019, 188, 1-9.
- MUSSAGY, C. U. *et al.* Production and extraction of carotenoids produced by microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2018, 103, 1095-1114.
- SAINI, R. K.; KEUM, Y. S. Carotenoids extraction methods: a review of recent developments. **Food Chemistry**, 2018, 240, 90-103.