



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**CAMPOS MAGNÉTICOS APLICADOS EM CULTIVOS COM *Phaffia rhodozyma*:
AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO, PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES E
EXTRAÇÃO COM RUPTURA QUÍMICA**

Pedro Garcia Pereira da Silva

Profa. Dra. Lucielen Oliveira dos Santos

Orientadora

Profa. Dra. Janaina Fernandes de Medeiros Burkert

Coorientadora

RIO GRANDE - RS

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**CAMPOS MAGNÉTICOS APLICADOS EM CULTIVOS COM *Phaffia rhodozyma*:
AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO, PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES E
EXTRAÇÃO COM RUPTURA QUÍMICA**

Pedro Garcia Pereira da Silva

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em
Engenharia e Ciência de
Alimentos.

Profa. Dra. Lucielen Oliveira dos Santos

Orientadora

Profa. Dra. Janaina Fernandes de Medeiros Burkert

Coorientadora

RIO GRANDE - RS

2020

Ficha Catalográfica

S586c Silva, Pedro Garcia Pereira da.
Campos magnéticos aplicados em cultivos com *Phaffia Rhodozyma*: avaliação do crescimento, produção de carotenoides e extração ruptura química / Pedro Garcia Pereira da Silva. – 2020.
88 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2020.

Orientadora: Dra. Lucielen Oliveira dos Santos.

Coorientadora: Dra. Janaína Fernandes de Medeiros Burkert.

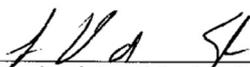
1. Levedura 2. Ímãs 3. Efeito Magnético 4. Extrato Carotenogênico
I. Santos, Lucielen Oliveira dos II. Burkert, Janaína Fernandes de Medeiros III. Título.

CDU 664.642:537.612

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

APROVAÇÃO

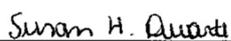
Dissertação defendida por Pedro Garcia Pereira da Silva e aprovada em 27 de fevereiro de 2020, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



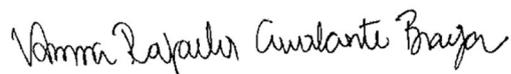
Prof. Dra. Lucielen Oliveira dos Santos - FURG



Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert – FURG



Prof. Dra. Susan Hartwig Duarte – FURG



Prof. Dra. Anna Rafaela Cavalcante Braga - UNIFESP

Dedico este trabalho à minha mãe e ao meu pai, que são meus maiores exemplos de amor e dedicação.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pelo dom da vida e por me iluminar durante toda essa caminhada.

Aos meus pais, **Maria Ilaria e Neri**, por todo carinho, atenção e amor dedicados a mim. E principalmente por serem meus maiores incentivadores nessa caminha árdua, mas tão significativa. Muito obrigado!!!

Às minhas irmãs, **Brenda e Laira**, por entenderem meu afastamento, por me incentivarem a correr atrás dos meus sonhos e principalmente por vivenciarmos juntos momentos de conquistas na nossa família.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Lucielen Oliveira dos Santos**, por me receber de portas abertas, pela confiança em mim depositada, pelos ensinamentos adquiridos e principalmente por se fazer presente durante todo esse período.

À minha coorientadora, **Profa. Dra. Janaína Fernandes de Medeiros Burkert**, pelo carinho a mim dedicado, pelas conversas e discussões sobre o tema da dissertação e principalmente por aceitar fazer parte deste projeto.

Aos integrantes da banca da qualificação, **Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert e Profa. Dra. Susan Hartwig Duarte**, pelas contribuições e sugestões para o andamento do trabalho.

Aos membros da banca de defesa da dissertação, **Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert, Profa. Dra. Susan Hartwig Duarte e Profa. Dra. Anna Rafaela Cavalcante Braga**, por aceitarem o convite para compor a banca e por todas as considerações feitas para o fechamento do trabalho.

Aos meus amigos da “Velha Guarda”, **Kristianne, Rosangela, Alan, Farid e Daiane**, por se fazerem presentes nesses dois anos, mesmo que houvessem 1500 km de distância. Nossas videoconferências tornaram o caminho mais leve e satisfatório. Obrigado por sempre torcerem por mim.

À minha família em Rio Grande, **Vitória, Gisele e Luan**, por entenderem por diversas vezes o meu mau humor e as ausências nos dias de praia, mas principalmente por se tornarem minha base de apoio. Depois da chegada de vocês, tudo foi mais alegre e mais fácil de suportar.

Aos meus colegas de mestrado, **Ana Luiza, Bruna, Francisco, Mayke e Nathieli**, pela parceira, horas de estudo durante a madrugada e também pelos churrascos de comemoração ao final de cada etapa vencida. Foi um prazer fazer parte dessa turma e o meu desejo sempre será de muito sucesso e felicidade pra cada um de vocês.

À **família BIOTEC**, por tornar o ambiente de trabalho tão agradável. Luisa, Sharlene, Taiete, Bruno, Beatriz e Daniel, vocês são pessoas de luz, merecem toda a felicidade que o mundo puder oferecer a vocês.

Às minhas colegas de causa, **Luisa, Sharlene, Taiete e Tabita**, obrigado pelos ensinamentos e discussões sobre o tema e principalmente por dedicarem parte do seu tempo de maneira tão sincera e generosa.

Ao meu iniciante científico, **Daniel**, pelas horas de trabalho e por ser um homem de fibra e inteligência inquestionáveis. O tempo investido discutindo e trocando conhecimentos nos proporcionou evoluir como pesquisadores.

À **CAPES**, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos funcionários da **Escola de Química e Alimentos**, por nos receberem tão bem e se tornarem parte importante do nosso dia a dia.

À **FURG**, da qual tenho imenso orgulho de fazer parte. Obrigada por disponibilizar ensino gratuito e de qualidade e este excelente Programa de Pós-Graduação.

Muito obrigado a todos que **direta ou indiretamente** ajudaram tornar possível a execução deste trabalho.

“Faça planos e lute para realizá-los com o coração feliz. Acredite ainda mais no seu sucesso.
Você pode e sempre será capaz de construir algo bem melhor para a sua vida”.

Nelson Locatelli

RESUMO

Os carotenoides constituem um grupo de pigmentos naturais de coloração amarela, laranja e vermelha que possuem importante atividade biológica devido as suas propriedades antioxidantes. Com a crescente demanda por tais compostos para serem utilizados em produtos alimentícios, farmacêuticos, cosméticos e rações, o interesse nos carotenoides naturalmente obtidos por processos biotecnológicos vem aumentando. A levedura *Phaffia rhodozyma* se destaca como produtora de carotenoides, onde seu conteúdo pode ser aumentado através da estimulação da síntese com a aplicação de campos magnéticos (CM). Desta forma o objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos campos magnéticos no cultivo de *P. rhodozyma* NRRL Y-17268 e o processo de extração de carotenoides por ruptura química. Primeiramente a aplicação do CM durante o cultivo do inóculo foi avaliada, sendo testadas as condições de 0 mT (controle) e 30 mT. Obteve-se aumento de 12,8% na concentração celular em 24 h no cultivo com a aplicação de CM em relação ao ensaio controle, sendo padronizada como melhor alternativa para o cultivo do inóculo. Desta forma nos ensaios posteriores o cultivo do inóculo foi feito em frascos agitados, caldo YM (*yeast extract – malt extract*), 25 °C, 150 rpm, 24 h, sob ação de 30 mT. Já os cultivos para a produção de carotenoides foram feitos em frascos agitados orbitalmente (500 mL) com 225 mL do meio YM, pH inicial 6,0, 10% de inóculo (10^8 cél mL⁻¹), 25 °C, 180 rpm por 168 h. Nesta etapa foram testados diferentes tempos de exposição ao CM (30 mT) ao longo de 168 h de cultivo e ensaio controle (sem a aplicação do CM). Em todos os cultivos foram determinados o pH e as concentrações de biomassa, açúcares redutores e carotenoides. Para a extração dos carotenoides da biomassa foi realizada a ruptura química das células utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) e posteriormente a extração dos carotenoides com acetona e hexano obtendo-se os extratos carotenogênicos. Sendo que os melhores resultados de concentração de biomassa ($7,23 \pm 0,33$ g L⁻¹), carotenoides volumétricos ($1189,81 \pm 26,18$ µg L⁻¹) e produtividade em carotenoides ($12,39 \pm 1,11$ µg L⁻¹ h⁻¹) foram alcançados em 96 h quando o CM foi aplicado durante todo o cultivo. Nesta condição a concentração volumétrica de carotenoides foi 42,9% maior que o ensaio controle. Após determinadas as melhores condições de cultivo foram avaliadas diferentes formas de extração por ruptura química e pré-tratamentos na biomassa para melhorar o processo de extração dos carotenoides. Nos ensaios de ruptura celular seguida de extração (3 repetições) utilizando biomassa que foi seca (24 h) e congelada (24 h) foi possível observar concentração volumétrica de carotenoides de $1620,39 \pm 59,34$ µg L⁻¹. Esses resultados nos permitem concluir que após serem definidas as melhores condições de cultivo com CM, pré-tratamento da biomassa e extração de carotenoides, foi possível reduzir o tempo total de processo em escala laboratorial em 120 h em relação a metodologia atualmente utilizada pelo grupo de pesquisa.

Palavras-chave: Levedura. Ímãs. Efeito magnético. Extrato carotenogênico.

ABSTRACT

MAGNETIC FIELDS APPLIED TO *Phaffia rhodozyma* CULTIVATION: EVALUATION OF GROWTH, CAROTENOID PRODUCTION AND CHEMICAL RUPTURE EXTRACTION

Carotenoids are a group of natural yellow, orange and red pigments that have important biological activity due to their antioxidant properties. Interest in carotenoids naturally obtained by biotechnological processes has been increasing, because of the growing demand for such compounds in food, pharmaceuticals, cosmetics and animal feed. The yeast *Phaffia rhodozyma* stands out as a carotenoid producer, whose content may be increased by stimulating synthesis with magnetic field (MF) application. Thus, this study aimed to evaluate the influence of MF on the cultivation of *P. rhodozyma* NRRL Y-17268 and the process of carotenoid extraction by chemical rupture. MF application in the inoculum culture was evaluated (0 mT – control and 30 mT). Cellular concentration increased 12.8% after 24 h culture with MF application by comparison with the control assay; it was considered the best alternative for the inoculum. Thus, in the other assays, the inoculum was cultivated in orbitally shaken flasks, YM broth, 25 °C, 150 rpm, 30 mT for 24 h. Carotenoid production was performed in orbitally shaken flasks (500 mL) with 225 mL YM medium, initial pH 6.0, 10% inoculum (10^8 cells mL⁻¹), 25 °C, 180 rpm for 168 h. In this stage, different MF exposure times (30 mT) were tested over the 168 h culture by comparison with the control assay (without MF application) to determine pH and concentrations of biomass, reducing sugars and carotenoid. Chemical cell rupture was performed by dimethylsulfoxide (DMSO) to extract carotenoids from the biomass. Carotenoids were extracted with acetone and hexane and resulted in carotenogenic extracts. The best biomass concentration (7.23 ± 0.33 g L⁻¹), volumetric carotenoids (1189.81 ± 26.18 µg L⁻¹) and carotenoid productivity (12.39 ± 1.11 µg L⁻¹ h⁻¹) were reached in 96 h, when the MF was applied throughout the cultivation. In this condition, carotenoid concentration was 42.9% higher than the one found in the control assay. After determining the best cultivation conditions, different forms of extraction by chemical rupture and pretreatments in biomass were evaluated to improve the process of carotenoid extraction. In the assays of cell rupture followed by extraction (3 replicates) with dry (24 h) and frozen (24 h) biomass, 1620.39 ± 59.34 µg L⁻¹ was found. Results show that, after defining the best conditions for *P. rhodozyma* cultivation with MF, pre-treatment of biomass and carotenoid extraction, total process time could be reduced in 120 h on a laboratory scale by comparison with the procedure currently used by the research group.

Keywords: Yeast. Magnets. Magnetic effect. Carotenogenic extract.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Micro-organismos produtores de carotenoides.....	31
Tabela 2 – Leveduras produtoras de carotenoides.....	33
Tabela 3 – Influência dos CM em diferentes cepas de leveduras.....	38
Tabela 4 – Composição do meio YM utilizado na manutenção da cepa e no cultivo do inóculo de <i>Phaffia rhodozyma</i> NRRL Y-17268.....	41
Tabela 5 – Ensaio de aplicação de campos magnéticos na produção de carotenoides.	43
Tabela 6 – Pré-tratamento utilizados na biomassa para a extração de carotenoides.	46
Tabela 7 – Contagem de células nos ensaios controle e com aplicação de campos magnéticos durante o cultivo do inóculo.	47
Tabela 8 – Parâmetros cinéticos dos cultivos de <i>P. rhodozyma</i> sob a influência de CM.....	62
Tabela 9 – Ensaio de extração de carotenoides em relação ao processo de ruptura celular com DMSO.....	62
Tabela 10 – Diferentes pré-tratamentos na biomassa para extração de carotenoides pelo processo de ruptura celular com DMSO.....	63
Tabela 11 – Tempo gasto no processo para obtenção dos extratos carotenogênicos com concentrações máximas de carotenoides.	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema da biossíntese de carotenoides.....	28
Figura 2 – Classes de carotenoides encontradas na natureza: (a) carotenos e (b) xantofilas. .	29
Figura 3 – Aplicação de CM durante o cultivo do inóculo.	42
Figura 4 – Ensaios de ruptura celular com DMSO seguidos de extração com acetona.	46
Figura 5 – Cinética do cultivo do ensaio controle, sem aplicação de CM (EC).	51
Figura 6 – Cinética do cultivo com aplicação de CM entre 0 e 24 h (CM 0-24).	51
Figura 7 – Cinética do cultivo com aplicação de CM entre 24 e 48 h (CM 24-48).	52
Figura 8 – Cinética do cultivo com aplicação de CM entre 48 e 72 h (CM 48-72).	52
Figura 9 – Cinética do cultivo com aplicação de CM entre 72 e 96 h (CM 72-96).	52
Figura 10 – Cinética do cultivo com aplicação de CM entre 96 e 120 h (CM 96-120).	53
Figura 11 – Cinética do cultivo com aplicação de CM entre 120 e 144 h (CM 120-144).	53
Figura 12 – Cinética do cultivo com aplicação de CM entre 144 e 168 h (CM 144-168).	53
Figura 13 – Cinética do cultivo com aplicação de CM durante todo o cultivo (CM 0-168)...	54
Figura 14 – Valores máximos da concentração de biomassa (A) e de produtividade em biomassa (B) de cada ensaio. Entre parênteses encontra-se o tempo no qual foi obtido o valor máximo. Média ± desvio padrão (n = 3). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre os ensaios ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.	55
Figura 15 – Valores máximos da concentração de carotenoides volumétricos (A) e de produtividade em carotenoides (B) de cada ensaio. Entre parênteses encontra-se o tempo no qual foi obtido o valor máximo. Média ± desvio padrão (n = 3). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre os ensaios ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.	59

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. OBJETIVOS.....	25
2.1 OBJETIVOS GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1 CAROTENOIDES	27
3.1.1 Biossíntese e estrutura dos carotenoides	27
3.2 PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR MICRO-ORGANISMOS	29
3.2.1 Produção de carotenoides por leveduras	31
3.3 CAMPOS MAGNÉTICOS EM BIOPROCESSOS.....	35
3.3.1 Aplicação de campos magnéticos em bioprocessos com leveduras.....	37
3.4 EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES POR RUPTURA QUÍMICA	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 MICRO-ORGANISMO E MANUTENÇÃO DA CEPA	41
4.2 CULTIVO DO INÓCULO COM APLICAÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS	41
4.3 ENSAIOS PARA A PRODUÇÃO DOS CAROTENOIDES.....	42
4.3.1 Determinação da concentração de biomassa	43
4.3.2 Extração de carotenoides.....	43
4.3.3 Determinação da concentração específica de carotenoides	44
4.3.4 Determinação de açúcares redutores.....	44
4.3.5 Parâmetros cinéticos	44
4.4 ENSAIOS DE EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES POR RUPTURA QUÍMICA COM DMSO	45
4.4.1 Avaliação da ruptura celular no processo de extração de carotenoides	45
4.4.2 Avaliação de pré-tratamentos na biomassa para a extração de carotenoides específicos e volumétricos	46
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1 APLICAÇÃO DOS CAMPOS MAGNÉTICOS DURANTE O CULTIVO DO INÓCULO	49
5.2 CINÉTICAS DE CULTIVO DE <i>Phaffia rhodozyma</i> SOB A INFLUÊNCIA DE CAMPOS MAGNÉTICOS	50
5.2.1 Acompanhamento do pH, concentração de biomassa e concentração de açúcares redutores totais nos cultivos sob a influência de CM	50
5.2.2 Produção de carotenoides sob a influência de campos magnéticos e determinação dos parâmetros cinéticos de cultivo	57
5.3 AVALIAÇÃO DOS ENSAIOS DE RUPTURA QUÍMICA COM DMSO E DE PRÉ-TRATAMENTOS NA BIOMASSA PARA A EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES	62
6. CONCLUSÃO.....	67
7. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

APÊNDICE 1.....81
APÊNDICE 2.....83
APÊNDICE 3.....87

1. INTRODUÇÃO

Os carotenoides pertencem a um grupo de pigmentos naturais com mais de 700 representantes que apresentam coloração amarela, laranja ou vermelha, à exceção dos carotenoides fitoeno e fitoflueno, que são incolores (MESQUITA; TEIXEIRA; SERVULO, 2017). São pigmentos amplamente difundidos na natureza, podendo ser encontrados em algumas espécies de bactérias, fungos, algas e plantas superiores, assim como em crustáceos (camarão, lagosta e siri) e peixes (truta e salmão), onde esses pigmentos são acumulados no organismo do animal por meio de sua alimentação (MESQUITA; TEIXEIRA; SERVULO, 2017; RODRIGUES, 2018; VALDUGA et al., 2009).

Além de pigmentos naturais, alguns carotenoides têm importante atividade biológica devido à sua atividade provitamina A que auxilia na prevenção de doenças degenerativas e alguns tipos de câncer (GRANADO-LORENCIO et al., 2017; PONKA, et al., 2015). Possuem atividade antioxidante, protegendo células e tecidos, neutralizando os radicais livres como doadores de elétrons, resultando em potenciais benefícios para a saúde, como o fortalecimento do sistema imunológico (CAMPOCOSÍO, 2008; MATA-GÓMEZ et al., 2014).

O mercado mundial que abrange todos os carotenoides foi avaliado em US\$ 1,2 bilhões em 2010, com taxa de crescimento anual de 2,3%, alcançando US\$ 1,8 bilhões em 2019. No que se refere às indústrias alimentícias e farmacêuticas, o interesse de se obter carotenoides como β -caroteno, luteína e astaxantina devido à sua vasta aplicabilidade, tende a aumentar a sua demanda industrial esperando-se que o mercado mundial de carotenoides atinja US\$ 2,0 bilhões em 2021, com taxa de crescimento anual de 5,7% (BCC RESEARCH, 2018; CIPOLATTI et al., 2019).

Na obtenção desses compostos, o volume de produção industrial ainda é dominado pelos métodos sintéticos, obtidos quimicamente envolvendo grande número de reações complexas ou por extração de plantas e algas. O que vem levando a um maior interesse dos pesquisadores em descobrir novas fontes, processos e técnicas que possam ser empregadas para intensificar o aumento da produção destes pigmentos por via biotecnológica, competindo assim com a produção sintética (CARDOSO et al., 2016; MATA-GÓMEZ et al., 2014; URNAU et al., 2019).

A produção de carotenoides por micro-organismos, apresenta algumas vantagens: os pigmentos sintetizados são considerados naturais, alguns micro-organismos são capazes de se desenvolver em substratos de baixo custo, necessitam de pequeno espaço para a etapa de síntese e as condições de cultivo podem ser manipuladas de forma a estimular a produção desses

compostos (MALDONADE, 2003; MATA-GÓMEZ et al., 2014; MESQUITA; TEIXEIRA; SERVULO, 2017). Desta forma, vários estudos estão direcionados a encontrar alternativas que possam induzir a síntese de carotenoides e/ou aumentar a eficiência destes sistemas biológicos, assim como o desenvolvimento de técnicas de extração para a obtenção desse composto de interesse de forma que eles sejam comercialmente viáveis (AUSICH, 1997; BHOSALE, 2004; MATA-GÓMEZ et al., 2014; RODRIGUES et al., 2019; URNAU et al., 2019).

Dentre os micro-organismos produtores de carotenoides, a levedura *Phaffia rhodozyma* se destaca devido à sua capacidade de assimilar diferentes fontes de carbono como substrato, possuir metabolismo heterotrófico com taxa de crescimento relativamente rápida, atingir alta densidade celular, ser certificada como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) e produzir carotenoides, como β -caroteno, luteína e astaxantina, sendo este seu carotenoide majoritário (CIPOLATTI et al., 2015; NOGUEIRA, 2017; URNAU, 2018).

Uma alternativa para avaliar cultivos microbianos é a utilização de campos magnéticos (CM), os quais vêm sendo estudados em organismos vivos de modo a induzir a produção de compostos de interesse ou o crescimento celular (BERLOT et al., 2013; CANLI et al., 2011; HUNT et al., 2009; KTHIRI et al., 2019; MOTTA et al., 2004; SANTOS et al., 2017). Porém, a aplicação de CM no cultivo de leveduras não é muito difundida, mesmo já tendo demonstrado que podem alterar a concentração de biomassa e produção de etanol (BERLOT et al., 2013; DEUTMEYER et al., 2011), concentração de glutathiona (GSH) (SANTOS et al., 2012) e a produção das enzimas invertase (CANLI et al., 2011), catalase (KTHIRI et al., 2019) e lacase (TAN et al., 2020).

Pesquisas com aplicação de CM mostraram diferenças no comportamento quando as células são submetidas ao tratamento magnético. Seu efeito pode ser negativo ou positivo, e pode incluir a aceleração do crescimento e mudanças no metabolismo (HUNT et al., 2009). Segundo Yang et al. (2011) essas modificações dependem da intensidade, frequência e tempo da aplicação do CM nos cultivos microbianos.

Em relação ao processo de extração de carotenoides desta levedura, estudos foram realizados visando maior eficiência no processo e para tal, foram avaliados pré-tratamentos na biomassa e utilização de métodos físicos, químicos e enzimáticos. Para a quantificação dessas biomoléculas os métodos químicos utilizando solventes orgânicos se mostraram mais eficientes (CIPOLATTI et al., 2015; FONSECA et al., 2011; MICHELON et al., 2012).

Em virtude dessas considerações foi realizado o estudo da produção de carotenoides por cultivos microbianos com *Phaffia rhodozyma* com a aplicação de CM, visto que até o presente momento não foram encontrados dados na literatura consultada referente à produção

destas biomoléculas por leveduras sob a influência de CM, bem como o estudo de extração por ruptura química com dimetilsulfóxido (DMSO) e pré-tratamentos na biomassa, visando a redução do tempo de processo em escala laboratorial para à obtenção de extratos carotenogênicos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência dos campos magnéticos no cultivo de *Phaffia rhodozyma* NRRL Y-17268 e o processo de extração de carotenoides com ruptura química.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a ação dos CM durante o cultivo do inóculo;
- Investigar a influência da aplicação de CM, durante diferentes períodos do cultivo, na produção de biomassa, carotenoides específicos e carotenoides volumétricos;
- Avaliar o processo de ruptura química com dimetilsulfóxido (DMSO) para a extração de carotenoides;
- Avaliar a recuperação de carotenoides extraídos de forma química na biomassa submetida a diferentes pré-tratamentos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CAROTENOIDES

Os carotenoides formam a classe de pigmentos mais difundida na natureza, sendo substâncias lipofílicas de origem natural, sintetizados por algas, fungos, bactérias, leveduras e plantas superiores (MESQUITA; TORQUILHO, 2016). Eles representam um grupo de pigmentos naturais com aproximadamente 700 representantes que apresentam coloração amarela, laranja ou vermelha, à exceção dos carotenoides fitoeno e fitoflueno, que são incolores (MESQUITA; TEIXEIRA; SERVULO, 2017).

Esses possuem maior valor agregado em termos econômicos e tecnológicos se comparados a outros pigmentos encontrados na natureza como melaninas, clorofilas, antocianinas e flavonoides, sendo astaxantina, β -caroteno e luteína os principais carotenoides empregados nas indústrias de alimentos, rações e farmacêutica (CIPOLATTI, 2012; RODRIGUES et al., 2019; RODRIGUEZ-AMAYA, 2019).

Na indústria de alimentos, os carotenoides são utilizados principalmente como corantes, tendo a função de colorir ou uniformizar a cor perdida durante o processamento e armazenamento (MESQUITA; TEIXEIRA; SERVULO, 2017; SILVA, 2009). Por serem precursores de compostos voláteis, contribuem para o sabor e aroma dos alimentos, sendo utilizados para produzir emulsões, suspensões coloidais e complexos com proteínas (GOUVEIA et al., 2006; RODRIGUEZ-AMAYA, 2019).

Nas indústrias de ração, esses pigmentos também são utilizados como corantes, com a finalidade de promover a pigmentação adequada do produto final. O aspecto da cor nas rações agrega valor comercial ao produto, sendo que os mesmos possuem atividades biológicas importantes para os animais (MESQUITA; TEIXEIRA; SERVULO, 2017; SILVA, 2009; VALDUGA et al., 2009).

Devido à sua funcionalidade, na indústria farmacêutica são utilizados na prevenção de doenças mediadas pela reação de supressão do radical peroxil (ERO), que pode desencadear distúrbios de fotossensibilidade, doenças cardiovasculares, diabetes, distúrbios de visão, câncer (cólon, esôfago, bucal, faringe e laringe) e distúrbios neurológicos (MESQUITA; TEIXEIRA; SERVULO, 2017; MESQUITA; TORQUILHO, 2016).

3.1.1 Biossíntese e estrutura dos carotenoides

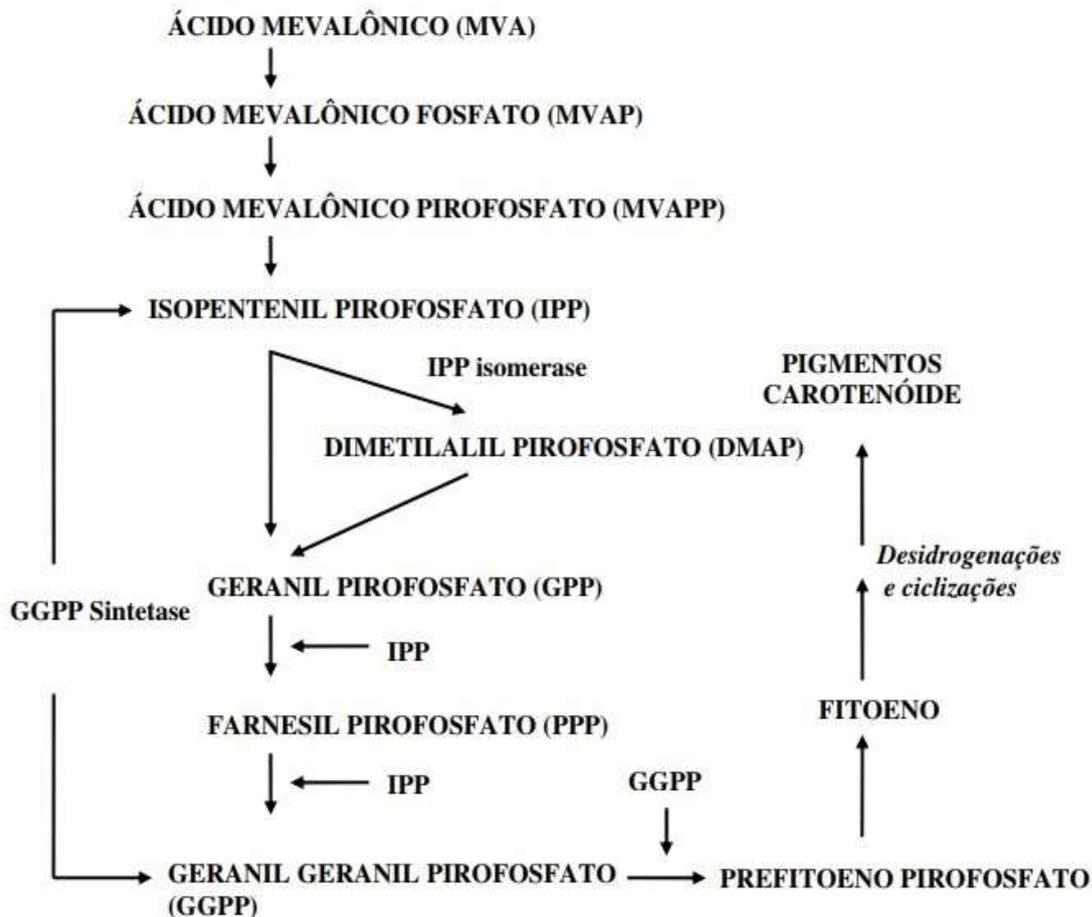
Os carotenoides são geralmente tetraterpenoides de 40 carbonos (C40), formados pela união de oito unidades isoprenoides de 5 carbonos (C5), exceto na posição central, onde a

junção ocorre no sentido cauda-cauda, ligados de tal forma que resulta em uma molécula simétrica e linear. A estrutura básica acíclica C40 pode ser modificada por hidrogenação, desidrogenação, ciclização ou oxidação (VALDUGA et al., 2009).

Devido às diferenças dos carotenoides, surgem as variadas cores características de muitos alimentos que podem variar de amarelo pálido até o vermelho intenso, característica essa relacionada à série de duplas ligações conjugadas, que permitem a absorção de luz na região visível desses pigmentos, atuando como um cromóforo (VALDUGA et al., 2009).

A biossíntese dos carotenoides (Figura 1) envolve a formação de geranyl-geranyl pirofosfato e na sua conversão em fitoeno através da ação da enzima fitoeno sintetase. Esse primeiro caroteno não apresenta coloração, contudo, através de uma série de desidrogenações, outros carotenos são formados. A biossíntese até a conversão em fitoeno, pode ser dividida em três etapas: 1) a formação de isopentenil pirofosfato (IPP), 2) conversão de IPP para geranyl pirofosfato (GPP), e 3) a condensação de duas moléculas de GGPP para formar fitoeno, o qual é o precursor da maioria dos carotenoides (FRENGOVA; BESHKOVA, 2009; MARGALITH, 1999).

Figura 1 - Esquema da biossíntese de carotenoides.

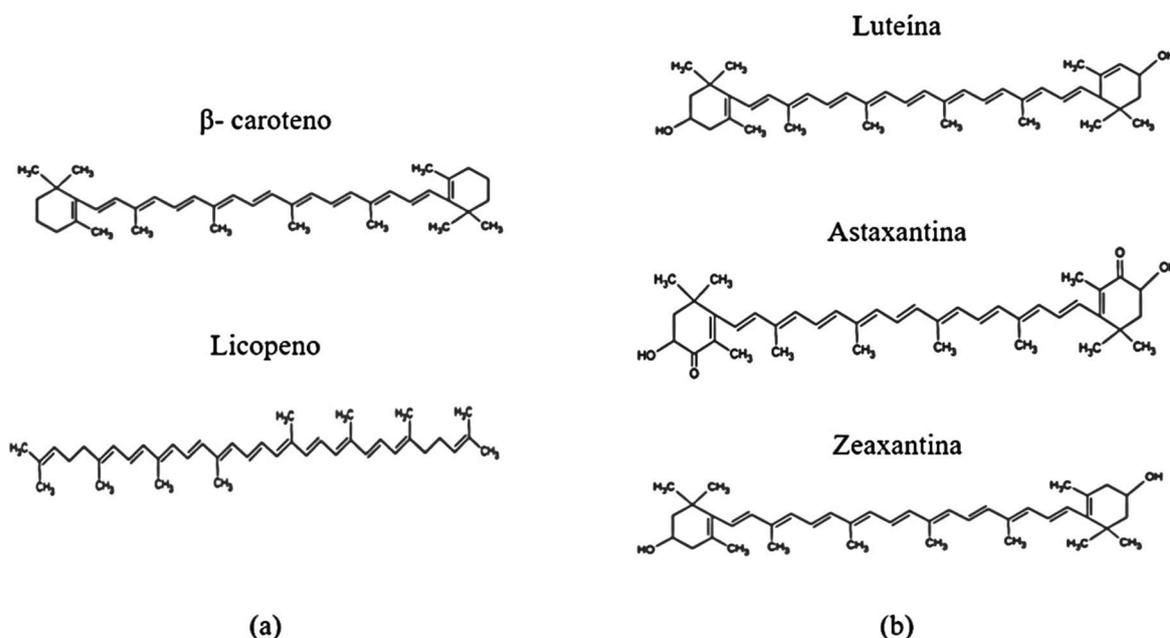


Fonte: Adaptado de Frengova e Beshkova (2009).

Todos os organismos fotossintéticos (incluindo plantas e cianobactérias) e alguns micro-organismos como bactérias, fungos filamentosos e leveduras podem sintetizar os carotenoides (MEZZOMO; FERREIRA, 2016). Esse grupo de pigmentos solúveis em lipídios compõe mais de 700 carotenoides identificados, sendo que sua estrutura característica determina suas ações e o potencial de suas funções biológicas (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007; MESQUITA; TORQUILHO, 2016).

Duas classes de carotenoides são encontradas na natureza (Figura 2): os carotenos, que possuem apenas carbono e hidrogênio em sua estrutura e podem ser ciclizados em uma extremidade da molécula, e os derivados que possuem oxigênio em sua estrutura, conhecidos como xantofilas (MESQUITA; TORQUILHO, 2016).

Figura 2 – Classes de carotenoides encontradas na natureza: (a) carotenos e (b) xantofilas.



Fonte: Adaptado de Mesquita e Torquillo (2016).

3.2 PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR MICRO-ORGANISMOS

Alguns estudos mostraram que carotenoides produzidos naturalmente por micro-organismos têm sido utilizados pela indústria alimentícia e farmacêutica, tendo como principal razão a facilidade de aumentar a produção microbiana pelas condições de cultivo e pela manipulação genética, o que facilita a obtenção desses biocompostos sem a necessidade de serem isolados de plantas e animais ou sintetizados quimicamente (MESQUITA; TEIXEIRA; SERVULO, 2017; MEZZOMO; FERREIRA, 2016; SILVA, 2009).

Segundo Valduga et al. (2009), a variedade e a quantidade de carotenoides produzida estão ligadas diretamente ao micro-organismo, meio de cultura e condições operacionais do processo, como temperatura, pH e agitação. Sendo assim, a maioria dos estudos avalia a otimização dessas condições de cultivo que afetam o crescimento do micro-organismo e a produção de carotenoides.

A possibilidade da produção de corantes de fontes naturais em escala industrial e o valor agregado ao produto tornam a produção biotecnológica de carotenoides uma área interessante. Nesse contexto, Liu e Wu (2007) descreveram que a produtividade de um bioprocessamento em um dado sistema depende das condições nutricionais e físicas da cultura, afetando não somente o crescimento celular como a produção de pigmento, estes atuando como mecanismo de defesa em resposta ao estresse das condições ambientais.

Melhorar a eficiência da biossíntese de carotenoides pode aumentar a produção. Além disso, com a alteração das condições de cultivo e uma abordagem molecular, a biossíntese dos carotenoides pode ser conduzida pelo fluxo total de carbono do sistema e o nível de atividade das enzimas, onde o substrato específico dessas enzimas não precisa reconhecer toda a molécula de substrato, apenas certas regiões da molécula que são adequadas para a biossíntese de carotenoides (BHOSALE, 2004; SANDMANN, 2001).

A obtenção de carotenoides microbianos é afetada por fatores físicos (temperatura, luminosidade, aeração, agitação e/ou teor de oxigênio) e pela composição do meio de cultivo (fonte de carbono e nitrogênio), os quais variam de acordo com as necessidades que cada micro-organismo possui. Sendo assim, a mudança nesses fatores pode influenciar positiva ou negativamente a biossíntese destes pigmentos (BUZZINI et al., 2005; SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2016).

Segundo Silva (2009), a produção de carotenoides pelo processo biotecnológico tem sido investigada, destacando-se a produção de β -caroteno pelo fungo *Blakeslea trispora* e a bactéria *Mycobacterium phlei*, produção de luteína pelas microalgas marinhas *Chlorella sorokiniana* e *Chlorella pyrenoidosa* e a produção de astaxantina pelas bactérias *Mycobacterium lactiola* e *Brevibacterium* sp.

Nogueira (2017), Rodrigues (2018) e Zeni (2009) mostraram que além de micro-organismos que produzem carotenoides de interesse comercial, como as microalgas *Haematococcus pluvialis* e *Chlorella*, o fungo *Dacrymyces*; as bactérias *Rhodococcus*, *Streptomyces* e *Mycobacterium* e as leveduras *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* e *Phaffia rhodozyma*, têm sido utilizados como modelo para estudar a fotorregulação, biossíntese e a

influência de modificações genéticas nesses micro-organismos, avaliando a produção, o processo de extração de carotenoides e suas possíveis aplicações.

Existem diversos micro-organismos que são fontes de obtenção de carotenoides e potenciais para a produção em escala comercial (Tabela 1). Dentre estes pode-se citar microalgas e cianobactérias (azuis e verdes), bactérias e alguns fungos filamentosos (CIPOLLATI, 2012; SILVA, 2009; ZENI, 2009).

Tabela 1 – Micro-organismos produtores de carotenoides.

Espécie	Micro-organismo	Carotenoides principais
Cianobactéria	<i>Anabaena variabilis</i>	Cantaxantina
Cianobactéria	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	Cantaxantina
Cianobactéria	<i>Nostoc commune</i>	Cantaxantina
Microalga	<i>Chlorella sorokiniana</i>	Luteína
Microalga	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Luteína
Microalga	<i>Chlorella zofingiensis</i>	Astaxantina
Microalga	<i>Dunaliella salina</i>	Zeaxantina
Microalga	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Cantaxantina
Fungo	<i>Blakeslea trispora</i>	β -caroteno e Licopeno
Fungo	<i>Dacrymyces deliquescens</i>	Luteína
Bactéria	<i>Rhodococcus maris</i>	Cantaxantina
Bactéria	<i>Streptomyces chrestomyceticus</i>	Xantofilas
Bactéria	<i>Mycobacterium phlei</i>	Xantofilas e β -caroteno
Bactéria	<i>Flavobacterium</i> sp.	Zeaxantina e β -caroteno
Bactéria	<i>Mycobacterium lactiola</i>	Astaxantina
Bactéria	<i>Brevibacterium</i> sp.	Cantaxantina e Astaxantina

Fonte: Adaptado de Silva (2009) e Zeni (2009).

3.2.1 Produção de carotenoides por leveduras

A produção de alguns metabólitos em resposta ao estresse celular pode tornar-se interessante para biotecnologia. Por exemplo, entre os vários grupos taxonômicos algumas leveduras são produtoras de carotenoides. Entre essas leveduras: *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium* e *Phaffia* (Tabela 2) são as que aparecem com maior destaque nos estudos envolvendo a produção desses compostos (AL-TURKI; AL-HASSAN; ABDEL-RAZIK, 2016; BUZZINI et al., 2007; CIPOLLATI, et al., 2019; FRENGOVA; BESHKOVA, 2009; RODRIGUES et al., 2019; SILVA, 2004).

Essas leveduras podem produzir carotenoides, onde o tipo e a concentração dos vários pigmentos formados dependem das espécies de micro-organismos e das condições de cultivo. As espécies *Sporidiobolus*, *Rhodotorula* e *Rhodospiridium* produzem principalmente β -caroteno e toruleno (BUZZINI et al., 2007), *Sporobolomyces* produz como carotenoide

específico o toruleno (BUZZINI et al., 2007) e *Phaffia rhodozyma* é produtora de β -caroteno e astaxantina (CIPOLATTI, 2012; CIPOLATTI et al., 2015).

De modo geral, as leveduras são capazes de sintetizar compostos a partir de diferentes substratos como resíduos da água da parboilização do arroz (SILVA, 2009), soro de leite (BONOW, 2016), glicerol (KLEIN et al., 2017) e melão de cana (GASMALLA et al., 2012). Essa adaptabilidade ao substrato, tornam esses micro-organismos promissores para estudos de cultivos microbianos visando à produção de carotenoides (RODRIGUES, 2018).

Os carotenoides são produzidos pelas leveduras no interior da célula (Tabela 2). Logo, é necessário que haja o processo de ruptura celular para posterior extração com solvente para que os pigmentos sejam liberados, sendo que a rigidez desta parede celular acaba limitando a extração desses produtos, sendo necessário mais estudos que viabilizem a obtenção desses compostos por micro-organismos (CIPOLATTI et al., 2019; RODRIGUES et al., 2019; ZHANG et al., 2019).

A produção de carotenoides pode ser afetada pela irradiação de luz. Contudo, a intensidade e a forma de iluminação variam de acordo com o micro-organismo (BHOSALE, 2004). Em estudos, Johnson e Gil-Hwan (1991), utilizando alta intensidade luminosa (20 watts), concluíram que a luz inibiu o crescimento celular e a produção do biocomposto, ambas causadas pelo estresse celular em cultivos com *P. rhodozyma*.

Mata-Gómez et al. (2014) citaram que a aeração é outro parâmetro importante, visto que a carotenogênese é um processo aeróbico. Desse modo, a aeração no cultivo com leveduras é essencial para a assimilação do substrato e consequente crescimento durante o cultivo microbiano. Esse efeito foi estudado por Davioli, Mierau e Weber (2004) com levedura *S. roseus*, onde o aumento na homogeneização utilizando frascos cônicos com recuo de 5 cm de amplitude, causaram incremento significativo na concentração de carotenoides totais, variando de 109 para 402 $\mu\text{g g}^{-1}$, utilizando frascos padrões e frascos com recuo, respectivamente.

Sabe-se também que esses compostos não são encontrados em leveduras comumente utilizadas na indústria, tais como *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* e *Candida utilis* (MALDONADE; SCAMPARINI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2007). No entanto, essas leveduras apresentam ergosterol como principal isoprenoide, o que torna possível direcionar o fluxo de carbono para a produção de carotenoides através do isolamento de genes carotenogênicos que são incorporados pela técnica de DNA recombinante no micro-organismo alvo, resultando em um organismo geneticamente modificado, cuja característica adquirida passa a ser hereditária (BRUMANO, 2008; SANDMANN, 2001).

Tabela 2 – Leveduras produtoras de carotenoides.

Micro-organismo	Tipo de carotenoide	Concentração dos carotenoides específicos ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Concentração dos carotenoides volumétricos ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Tempo de cultivo (h)	Referência
<i>Rhodotorula</i> sp	Tolureno	65,8	551,98	120	(BUZZINI et al., 2007)
<i>Rhodotorula</i> sp	Torulahodina	42,2	354,01	120	(BUZZINI et al., 2007)
<i>Rhodospiridium diobovatum</i>	Torulahodina	37,8	560,9	120	(BUZZINI et al., 2007)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Torulahodina	52,5	295,11	120	(BUZZINI et al., 2007)
<i>Rhodotorula graminis</i>	β -caroteno	31,2	281,76	120	(BUZZINI et al., 2007)
<i>Sporidiobolus longiusculus</i>	β -caroteno	56,5	612,1	120	(BUZZINI et al., 2007)
<i>Sporidiobolus longiusculus</i>	Tolureno	95,7	1036,78	120	(BUZZINI et al., 2007)
<i>Sporidiobolus johnsonii</i>	β -caroteno	12,6	49,45	120	(BUZZINI et al., 2007)
<i>Sporobolomyces pararoseus</i>	Tolureno	33,2	254,95	120	(BUZZINI et al., 2007)
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	β -caroteno	101,4	830,30	168	(CIPOLATTI et al., 2019)
<i>Rhodotorula rubra</i>	β -caroteno	329	2320	72	(BANZATTO; FREITA; MUTTON, 2013)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Nd*	1500	Nd*	120	(AL-TURKI; AL-HASSAN; ABDEL-RAZIK, 2016)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	β -caroteno	Nd*	201	24	(MALISORN; SUNTORNSUK, 2008)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Nd*	1580	Nd*	120	(AL-TURKI; AL-HASSAN; ABDEL-RAZIK, 2016)
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxantina	215	Nd*	168	(CIPOLATTI et al., 2015)
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxantina	450	Nd*	120	(DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA; TORRES-MUÑOZ, 2004)
<i>Phaffia rhodozyma</i>	β -caroteno	143	1804	168	(CIPOLATTI, 2012)
<i>Phaffia rhodozyma</i>	β -caroteno	238,1	1162	72	(URNAU et al., 2019)

*Nd = Não definido.

A levedura *Phaffia rhodozyma* teve seu isolamento no início dos anos 70 por Herman Phaff e colaboradores. E em sua homenagem o micro-organismo passou a ser denominado *Phaffia rhodozyma*, mediante adequação ao Código Internacional de Nomenclatura Botânica (BONFIM, 1999; MILLER; YONEYAMA; SONEDA, 1976).

Essa levedura é um micro-organismo aeróbio facultativo que forma colônias vermelho alaranjadas, apresentando padrão de crescimento relativamente rápido. Possui habilidade para alcançar alta densidade celular em biorreatores industriais e também é capaz de assimilar glicose e outros açúcares, com exceção de lactose, galactose, D-ribose e D-arabinose (WAGNER; RAMBLA; LEGARRETA, 2008).

P. rhodozyma, conhecida também por *Xanthophyllomyces dendrohous*, é capaz de produzir carotenoides intracelularmente (CIPOLATTI et al., 2015; MICHELON et al., 2012; SILVA et al., 2016). Segundo Blasko et al. (2008), tais carotenoides como astaxantina, luteína e β -caroteno, são antioxidantes lipossolúveis, capazes de proteger os danos oxidativos causados por espécies reativas de oxigênio.

Além disso, *P. rhodozyma* destaca-se por ser produtora de carotenoides, entre os quais a astaxantina em maior proporção (BONFIM, 1999; WAGNER; RAMBLA; LEGARRETA, 2008). Essa pode ser usada como fonte de pigmento industrial em razão de seu metabolismo heterotrófico, qualidade nutricional e segurança como aditivo alimentar (BONFIM, 1999), possuindo a aprovação como um micro-organismo GRAS (*Generally Recognized as Safe*) nos Estados Unidos. Portanto, a produção de carotenoides a partir de fontes naturais, como essa levedura, é uma alternativa em potencial para a substituição desses compostos obtidos por síntese química (NI et al., 2008).

Silva (2009) estudou a maximização da produção de astaxantina por *P. rhodozyma* utilizando diferentes meios de cultura. As condições de cultivo foram pH inicial de 5,0, 25 °C e 150 rpm durante 168 h. O meio foi composto por 16,25 g L⁻¹ de extrato de malte, 8,75 g L⁻¹ de peptona, 15 g L⁻¹ de sacarose e 87,5 g L⁻¹ de água de parboilização do arroz. Os cultivos foram feitos em frascos agitados e a produção volumétrica de astaxantina foi 5,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Pesquisas referentes à produção de carotenoides em cultivos submersos de *P. rhodozyma* NRRL Y-17268 utilizando glicerol bruto e água de parboilização do arroz foram realizadas por Silva (2010). As condições ótimas de cultivo para a produção de carotenoides foram observadas ao utilizar 10 g L⁻¹ de glicerol bruto, 7,5 g L⁻¹ de peptona, 6,4 g L⁻¹ de glicose, 90 g L⁻¹ de água de parboilização do arroz, 20 g L⁻¹ de extrato de malte, 1 g L⁻¹ de extrato de levedura, pH inicial de 4,0, 25 °C e 150 rpm durante 168 h. Nestas condições foram obtidas

concentração de biomassa de $13,5 \text{ g L}^{-1}$, produção específica e volumétrica de carotenoides de $176,0 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ e $2,4 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Silva et al. (2016) investigaram a produção de carotenoides por *P. rhodozyma* NRRL Y-17268 em meio de cultura contendo subprodutos como glicerol bruto (a partir de biodiesel) e água de parboilização de arroz nas condições de processo de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 6 e 150 rpm, durante 168 h. A produção máxima de carotenoides foi obtida utilizando meio composto por 10 g L^{-1} de glicerol bruto, 10 g L^{-1} de glicose, 10 g L^{-1} de extrato de levedura, 10 g L^{-1} de extrato de malte e 1 g L^{-1} de peptona, atingindo produções específicas e volumétricas de carotenoides de $326,8 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ e $4,1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Cipolatti et al. (2019) estudaram a otimização na produção de carotenoides por *Sporidiobolus pararoseus* utilizando coprodutos agroindustriais para a formulação do meio de cultivo. Os cultivos submersos foram feitos em frascos agitados a 180 rpm, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ por 168 h. A utilização de 6 g L^{-1} de melaço de cana de açúcar e $36,5 \text{ g L}^{-1}$ de água de maceração de milho resultou na produção volumétrica em carotenoides de $830,3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ após 168 h de cultivo.

Zhang et al. (2019) estudaram a produção de carotenoides por *Phaffia rhodozyma*, em cultivo submerso com 300 mL de meio YEPD (*Yeast extract – Peptone – Dextrose*) suplementado com cloreto de cálcio e dióxido de titânio sob condições de $20 \text{ }^\circ\text{C}$, 180 rpm durante 72 h. A concentração de carotenoides totais máxima foi $54,45 \text{ mg g}^{-1}$, sendo identificados os carotenoides astaxantina, β -caroteno e luteína com concentrações de 4,53, 21,6 e $30,32 \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente.

3.3 CAMPOS MAGNÉTICOS EM BIOPROCESSOS

Os campos magnéticos (CM) produzidos pelo homem têm se tornado uma parte crescente do nosso biosistema, se propagando pela Terra em benefício do homem. Dessa maneira, os organismos vivos necessitam se adaptar a esse novo fator, pois eles influenciam diretamente algumas de suas funções biológicas, sendo necessária investigação para se obter conhecimento desse assunto (NOVÁK et al., 2007).

Para Souza (2006), poucas áreas são tão controversas cientificamente como a que referencia efeitos biológicos resultantes da ação de CM. Os estudos relacionados ao assunto começaram em meados dos anos 60 com o objetivo de observar os efeitos resultantes dos CM em sistemas biológicos. Sendo assim, para Goodman e Blank (1995), os resultados obtidos indicaram que os sistemas biológicos respondem ao magnetismo como estresse ambiental.

Sabendo que durante o processo de transformação da matéria, energia é produzida e depois interage com a própria matéria e outras formas de energia, aparelhos eletromagnéticos induzidos por energia podem afetar os processos que ocorrem nos sistemas biológicos (DOBŠINSKÝ; JEDLIČKA, 2017). Por isso algumas hipóteses, como a interferência nos processos de transporte através da membrana plasmática e síntese de DNA, têm sido estudadas (BRKOVIC; POSTIC; ILIC, 2014; LOPES, 2008).

Segundo Filipic et al. (2012), os CM podem ser classificados em fracos (menor que 1 mT), moderados (1 mT a 1 T), fortes (1 a 5 T) e ultra fortes (maior que 5 T). Ainda, de acordo com Zapata, Moreno e Márquez (2002), seu efeito em sistemas biológicos pode ser inibitório, estimulante ou nulo, dependendo da intensidade e tempo de exposição.

As variáveis nesse processo são os parâmetros físicos do CM (intensidade, frequência e forma da onda), o tipo de célula, temperatura de exposição e o estado biológico da célula. Portanto é muito importante ter completo controle dos parâmetros que podem influenciar o processo como o protocolo de exposição, manipulação de amostras, temperatura de exposição, intervalos de tempos antes e depois da exposição dos CM, e o que pode ser um dos mais importantes parâmetros: o estado biológico das células (RUIZ-GÓMEZ et al., 2004).

A aplicação de CM em cultivos microbianos teve início nos anos 90. Porém, tem sua aplicação limitada em escala industrial. Em muitos estudos científicos verificou-se que os CM podem influenciar os sistemas biológicos como na produção de biomassa e etanol por *S. cerevisiae* (BERLOT et al., 2013; DEUTMEYER et al., 2011), glutatona (GSH) por *S. cerevisiae* (BONOW, 2016; SANTOS et al., 2010; SANTOS et al., 2012), pigmento vermelho e amarelo por *Monascus purpureus* (ZHANG et al., 2014b), ácido cítrico e celulase por *Aspergillus niger* (GAO; ZHANG; FENG, 2011), atividade enzimática de *S. cerevisiae* em mosto de fermentação de vinho (BAYRAKTAR, 2013), produção de biomassa e invertase por *Rhodotorula glutinis* (CANLI et al., 2011), melhoramento na produção da enzima inulinase por *Geotrichum candidum* (CANLI; KURBANOGLU, 2011), produção da enzima catalase por *S. cerevisiae* (KTHIRI et al., 2019), estímulo na produção da enzima lacase por *Candida tropicalis* (TAN et al., 2019) e fixação de CO₂ por *Chlorella fusca* (DEAMICI; SANTOS; COSTA, 2019).

Ainda no estudo da influência de CM em processos biológicos, a aplicação de partículas adsorventes em combinação com técnicas de separação magnética permite sua manipulação e separação seletiva na presença de outros sólidos suspensos. Assim, torna-se possível selecionar espécies-alvo magneticamente distintas de processos biológicos, eliminando algumas fases de tratamento prévio de amostras, como centrifugação, filtração e separação por membrana (FRAZREB et al., 2006).

O estudo da aplicação de CM durante a obtenção do inóculo também se faz necessário de modo a acompanhar o processo de crescimento celular e de manter as mesmas condições ambientais posteriormente no cultivo. Estudos com diferentes micro-organismos mostraram efeitos diferentes da ação do CM no crescimento celular durante o cultivo do inóculo. Com *Haematococcus pluvialis* o efeito sobre o crescimento celular foi inibitório em relação ao controle, passando de 123×10^4 para $83,82 \times 10^4$ cel mL⁻¹ após a exposição de 0,03 T (GÓMEZ-LUNA et al., 2009). Outros estudos demonstraram efeito positivo, como para *Salmonella hadar* com aplicação de 200 mT entre 6-9 h durante o cultivo do inóculo, aumentando em 32% a concentração celular (MAY; SNOUSSI, 2009) e com *Alternaria alternata* e *Curvularia inaequalis* com aplicação de 1 mT, obtendo aumento do crescimento celular na faixa de 68- 133% em 72 h (NAGY; FISCHL, 2004).

Berlot et al (2013), utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, obtiveram aumento de 27,7% na produção de biomassa, 19,8% na produção de etanol, 15,7% na produção de glicerol e 36,4% na produção de acetaldeído com aplicação de 140 mT por 72 h durante o cultivo do inóculo em relação ao ensaio controle, mostrando que a aplicação de CM no inóculo se faz necessário de modo a observar os efeitos biológicos causados no micro-organismo visando aumento da concentração celular e compostos de interesse.

3.3.1 Aplicação de campos magnéticos em bioprocessos com leveduras

As leveduras são conhecidas por desenvolverem diferentes mecanismos adaptativos, com intuito de sobreviver mesmo em condições de estresse, sendo que as mais comuns incluem variações no pH e temperatura, estresse oxidativo, choque osmótico e os produtos de fermentação tóxicos, principalmente o etanol (PENNINCKX, 2000). Grande parte dos estudos de aplicação de CM em cultivos microbianos tem utilizado a levedura *S. cerevisiae* como modelo de estudo devido às suas características morfológicas, metabólicas e genéticas bem conhecidas e por sua semelhança no mecanismo molecular associado com processos celulares básicos entre diferentes espécies eucarióticas, incluindo as células humanas (RUIZ-GÓMEZ et al., 2004).

Nesse contexto, leveduras são capazes de responder a uma grande variedade de estímulos ambientais e condições de estresse (incluindo os CM), promovendo mudanças intra e extracelulares que podem ser classificadas como irreversíveis, reversíveis ou resultarem em mudanças nas células e nas suas organelas. As modificações celulares e moleculares induzidas quando os CM interagem com materiais biológicos são, no entanto, dependentes da duração da

exposição, da penetração no tecido os quais estão relacionados à sua intensidade e frequência do estímulo. Respostas celulares também dependem não somente da intensidade e frequência do CM, mas também do tipo de CM (estático ou oscilatório), na forma da onda (sinusoidal, quadrada, etc.), na condição biológica e no tipo de célula exposta (DINI; ABRRO, 2005).

Foloea et al. (1998) descreveram que o mecanismo da eletroestimulação não era bem conhecido, mas pode estar ligado a mudanças na membrana, pois durante a eletroestimulação sabe-se que ocorre o aumento dos fluxos na membrana plasmática. Outra explicação pode estar baseada no eletro-ativação de alguns sistemas enzimáticos ou caminhos metabólicos relacionados a alguns processos que acontecem em nível de membrana.

O principal objetivo, em cultivos microbianos com leveduras assistidos de CM, é estimular o processo de crescimento celular ou a atividade metabólica com a expectativa de obterem-se altos rendimentos (HRISTOV; PEREZ, 2011). Na Tabela 3 é apresentada o efeito de diferentes intensidades e tempos de exposição aos CM em diversas cepas de leveduras.

Tabela 3 – Influência dos CM em diferentes cepas de leveduras.

Levedura	Intensidade do CM (mT)	Tempo de exposição (h)	Efeito positivo	Referência
<i>S. cerevisiae</i>	220	24	Biomassa e produção de etanol	(MOTTA et al., 2004)
<i>S. cerevisiae</i>	221	25	Biomassa	(MUNIZ et al., 2007)
<i>S. cerevisiae</i>	200	30	Produção de etanol	(DEUTMEYER et al., 2011)
<i>S. cerevisiae</i>	140	24-72	Biomassa e produção de etanol	(BERLOT et al., 2013)
<i>S. cerevisiae</i>	20	72	GSH	(SANTOS et al., 2012)
<i>S. cerevisiae</i>	110-220	12	Biomassa	(HRISTOV; PEREZ, 2011)
<i>S. cerevisiae</i>	31,7	0-72	Biomassa e GSH	(BONOW, 2016)
<i>S. cerevisiae</i>	250	9	Produção de catalase	KTHIRI et al., 2019)
<i>C. tropicalis</i>	95	24	Produção de calase	(TAN et al., 2019)
<i>R. glutinis</i>	7	72	Biomassa e invertase	(CANLI et al., 2011)

Dessa forma o estudo da aplicação de CM em leveduras se faz necessário, visto a ampla capacidade desses micro-organismos produzirem compostos de interesse, nas mais diferentes condições operacionais de processo devido a sua adaptabilidade nos cultivos microbianos.

3.4 EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES POR RUPTURA QUÍMICA

A parede externa de um micro-organismo pode ser permeabilizada por uma grande variedade de compostos químicos, que diferem na seletividade e eficiência para diferentes

espécies microbianas. Sendo em processos de extração utilizada a permeabilização química por solventes para que ocorra o rompimento celular e a liberação de compostos intracelulares de interesse (GECIOVA, BURY; JELEN, 2002; LOPES, 2014).

O processo de ruptura química depende do micro-organismo a ser estudado para posterior extração e recuperação de carotenoides, onde se utilizam solventes orgânicos como o dimetilsulfóxido (DMSO), hexano e éter de petróleo, ambos alteram a composição das membranas, aumentando a sua permeabilidade, sendo altamente eficientes para esse propósito. Essa técnica não é utilizada em escala industrial por diversas razões, entre elas o alto custo e a toxicidade. Porém são comumente utilizadas em estudos de extração de modo a obterem-se maiores rendimento no processo em escala laboratorial (LOPES., 2014; TREVAN et al., 1990 WAGNER, RAMBLA; LEGARRETA, 2008).

Diversos estudos na literatura avaliaram a extração de carotenoides com diferentes métodos de ruptura química. De modo a salientar que o processo de ruptura celular e extração de carotenoides merece atenção devido a possibilidade de aumentar a eficiência e reduzir o tempo do processo para a obtenção dos extratos carotenogênicos. Fonseca et al. (2011), também utilizando *Phaffia rhodozyma*, avaliaram diferentes pré-tratamentos da biomassa (secagem e congelamento), utilizando DMSO para a ruptura celular. A concentração máxima de 164,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ de astaxantina foi alcançada combinando os pré-tratamentos (48/48 h) de secagem e congelamento da biomassa antes do processo de ruptura química e extração dos carotenoides

Monks et al. (2013) estudaram diferentes técnicas de ruptura e extração de carotenoides produzidos pela levedura *Sporidiobolus salmonicolor*, utilizando diferentes solventes na etapa de ruptura química da biomassa, entre eles: DMSO, diclorometano, etanol, acetato de etila e acetona. Os resultados demonstraram que a utilização da combinação de solventes promove um efeito sinérgico sobre a recuperação de carotenoides, no entanto, a máxima concentração de carotenoides totais (2875 g L^{-1}) foi obtido no tratamento com CO_2 supercrítico (300 bar 120 min^{-1}).

Michelon et al. (2012) estudaram diferentes técnicas de ruptura e extração de carotenoides produzidos por *Phaffia rhodozyma*, sendo utilizado diferentes solventes químicos. Os resultados demonstraram que as concentrações máximas no processo de extração e recuperação dos carotenoides foram de 153,91, 47,72, 30,55 e 61,22 $\mu\text{g g}^{-1}$ utilizando como solventes DMSO, ácido láctico, ácido acético e ácido clorídrico respectivamente, demonstrando a eficiência do DMSO na obtenção desses compostos.

Ni et al. (2008) verificaram a otimização da extração de astaxantina a partir de *Phaffia rhodozyma*, onde utilizaram os ácidos clorídrico, acético e láctico para a ruptura celular.

Através de um planejamento fatorial fracionário encontraram que à condição ótima de extração era concentração de ácido láctico de $5,55 \text{ mol L}^{-1}$, 20,25 mL de etanol por grama de levedura seca, a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, por 3 min. Nesta condição foram obtidos $129,5 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ de astaxantina e $151,6 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ de carotenoides totais. O método de ruptura com ácidos foi considerado viável e prático para uso industrial, sendo eficiente no processo de extração e possuindo baixa toxicidade.

De forma geral, o método mais eficiente para o rompimento celular é a utilização de solventes orgânicos, algumas alternativas com o uso de DMSO e éter de petróleo não são empregadas em escala industrial pela toxicidade e por ser considerado um processo demorado (CHEN et al., 2018; TREVAN et al., 1990). Porém, alguns solventes orgânicos são permitidos para uso nas indústrias de alimentos, como acetona, álcool benzílico, acetato de etila, hexano, isopropanol, metanol, metil-etil-cetona, etanol, ácido acético, ácido láctico e ácido clorídrico, sendo que o uso e suas concentrações dependem do tipo de alimento onde os mesmos serão empregados (FOOD AND DRUG REGULATION, 2005). No entanto para avaliar a recuperação de carotenoides produzidos por *Phaffia rhodozyma*, se faz necessário estudos com solventes orgânicos de modo a quantificar a produção de carotenoides em escala laboratorial. Sendo que para o emprego em escala industrial, se faz necessário o desenvolvimento de alternativas por meio de tecnologias verdes para que ocorra a extração desses compostos com altos rendimentos para então sua utilização no desenvolvimento de novos produtos nas indústrias farmacêuticas, de alimentos e de rações.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRO-ORGANISMO E MANUTENÇÃO DA CEPA

A levedura *Phaffia rhodozyma* NRRL Y-17268, proveniente do *Northern Regional Research Laboratories* (Peoria, IL, EUA) e certificada como GRAS (*Generally Recognized as Safe*), foi o micro-organismo utilizado neste estudo. A manutenção da cepa foi realizada em ágar inclinado, utilizando-se o meio YM (*yeast extract – malt extract*) e mantida a 4 °C (NOGUEIRA; PRESTES; BURKERT, 2017). Na Tabela 4 é apresentada a composição do meio YM.

Tabela 4 – Composição do meio YM utilizado na manutenção da cepa e no cultivo do inóculo de *Phaffia rhodozyma* NRRL Y-17268.

Composto	Concentração (g L ⁻¹)
Glicose	10,0
Peptona	5,0
Extrato de levedura	3,0
Extrato de malte	3,0
Ágar*	20,0

*Usado somente para a manutenção da cepa.

Para a reativação, a partir das culturas estoques foram feitos repiques para tubos de ensaio com o mesmo meio e incubados por 48 h a 25 °C. Após as células foram ressuspensas em 1 mL de água peptonada (0,1%) e adicionadas em 9 mL de meio YM, sendo incubados nas mesmas condições descritas anteriormente (NOGUEIRA; PRESTES; BURKERT, 2017).

4.2 CULTIVO DO INÓCULO COM APLICAÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS

O preparo do inóculo foi feito em frascos Erlenmeyer (250 mL), contendo 90 mL do caldo YM, e 10 mL do cultivo oriundo da reativação, sendo as condições do processo: 25 °C, 150 rpm em agitador orbital por 48 h ou tempo necessário para atingir 1x10⁸ cél mL⁻¹ (RIOS et al., 2015).

Durante o cultivo do inóculo foi avaliada a aplicação do CM, sendo feitos dois ensaios: controle (sem aplicação de CM) e com aplicação de CM. Para tal, nos ensaios com aplicação de CM, os ímãs de ferrite (80x80x10 mm) foram colocados na parte inferior dos frascos agitados (Figura 3), sendo aplicado CM médio de 30 mT com alcance do CM de 40x80 mm, medido através de Teslômetro (GlobalMag – TLMP – HALL). Os ensaios foram

realizados em triplicata com amostragens a cada 12 h para determinação da concentração celular, utilizando-se de câmara de Neubauer (25 repetições).

Figura 3 - Aplicação de CM durante o cultivo do inóculo.



4.3 ENSAIOS PARA A PRODUÇÃO DOS CAROTENOIDES

Para estes ensaios o inóculo foi obtido com aplicação de CM durante 24 h de cultivo (10^8 cél mL⁻¹). A produção de carotenoides foi feita em frascos agitados (500 mL), contendo 225 mL do meio YM, pH inicial de 6,0, 10 % de inóculo ($v v^{-1}$), 25 °C, 180 rpm (agitador orbital) por 168 h (RIOS et al., 2015). Conforme descrito por Cipolatti et al. (2015), o pH e as concentrações de biomassa, açúcares redutores e carotenoides totais foram determinadas a cada 24 h durante todo cultivo.

Os ensaios com diferentes tempos de aplicação de CM para a produção de carotenoides foram realizados em triplicata (Tabela 5). Os mesmos ímãs de ferrite utilizados no cultivo do inóculo foram colocados na parte inferior dos frascos Erlenmeyer, sendo aplicado CM médio de 30 mT com alcance do CM de 40x80 mm, medido através de Teslômetro (GlobalMag – TLMP – HALL).

Tabela 5 – Ensaio de aplicação de campos magnéticos na produção de carotenoides.

Ensaio codificados	Aplicação de CM (h)
EC*	Sem aplicação de CM
CM 0-24	0-24
CM 24-48	24-48
CM 48-72	48-72
CM 72-96	72-96
CM 96-120	96-120
CM 120-144	120-144
CM 144-168	144-168
CM 0-168	0-168

*EC = ensaio controle.

4.3.1 Determinação da concentração de biomassa e pH

Ao longo do cultivo foram retiradas alíquotas de 2 mL, sendo as mesmas centrifugadas (1745 g) por 10 min. O sobrenadante foi separado para determinação de pH (AOAC, 2000). O precipitado foi lavado e ressuspenso em água destilada para determinação da concentração de biomassa por leitura da absorbância a 620 nm, relacionando com a curva padrão de biomassa (Apêndice 1) (KUSDIYANTINI et al., 1998).

4.3.2 Extração de carotenoides

Alíquotas de 8 mL foram retiradas ao longo dos cultivos, sendo centrifugadas (1745 g) por 10 min. A biomassa separada dos cultivos foi seca (48 h a 35 °C), macerada com gral e pistilo e padronizada em peneira com mesh 115 (CIPOLATTI, 2012). Na sequência as amostras foram pesadas e congeladas a -18 °C por 48 h.

Para a extração dos carotenoides em 0,05 g de biomassa foram adicionados 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), previamente aquecido a 55 °C, homogeneizando por 1 min em vórtex, a cada 15 min, até completar 1 h de contato, caracterizando um ciclo de ruptura química (FONSECA et al., 2011). Após essa etapa foi adicionado 6 mL de acetona P.A. de modo a facilitar a extração dos carotenoides. A amostra foi centrifugada a 1745 g por 10 min, a fase solvente foi separada e o ciclo de ruptura química foi repetido duas vezes, quando ocorreu o branqueamento total da biomassa (metodologia padrão utilizada neste estudo). Nas fases solventes, obtidas nas centrifugações, foram adicionados 10 mL de solução de NaCl 20% (m v⁻¹) e 10 mL de hexano. Após agitação e separação de fases o excesso de água foi

retirado com sulfato de sódio (Na_2SO_4), obtendo-se os extratos carotenogênicos (CIPOLATTI et al., 2015).

4.3.3 Determinação da concentração específica de carotenoides

A determinação da concentração de carotenoides específicos nos extratos foi feita em espectrofotômetro a 470 nm (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). A Equação 1 foi utilizada, sendo os resultados expressos em termos de seu carotenoide majoritário (astaxantina em hexano, com absorvidade molar de $2100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (CIPOLATTI et al., 2015; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). Na equação CE = concentração de carotenoides específicos ($\mu\text{g g}^{-1}$), A = absorvância, V = volume do extrato (mL), m_{amostra} = biomassa seca e $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ = absorvidade molar.

$$\text{CE } (\mu\text{g g}^{-1}) = \frac{A \times V \times 10^6}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \times 100 \times m_{\text{amostra}}} \quad (1)$$

Para obter a concentração volumétrica de carotenoides ($\mu\text{g L}^{-1}$) foi utilizada a concentração específica de carotenoides ($\mu\text{g g}^{-1}$) e a concentração da biomassa (g L^{-1}).

4.3.4 Determinação de açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores foi feita segundo descrito por Miller (1959). Para tal, foi utilizado o sobrenadante das amostras obtidas durante os cultivos. Para cada 1 mL de amostra foi adicionado 1 mL da solução de ácido 3,5 - dinitrosalicílico (DNS), seguido de 5 min de reação em banho a $100 \text{ }^\circ\text{C}$. Após, os tubos foram resfriados em banho de gelo, sendo adicionados 8 mL de solução de tartarato duplo de sódio e potássio. A leitura da transmitância foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. A concentração de glicose foi calculada utilizando a curva padrão de glicose (Apêndice 1) e os resultados expressos em g L^{-1} .

4.3.5 Parâmetros cinéticos

As Equações 2, 3 e 4 foram utilizadas para calcular os fatores de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$), substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) e biomassa em produto ($Y_{P/X}$), respectivamente (BAILEY; OLLIS, 1986). As Equações 5 e 6 foram utilizadas para obter a produtividade em biomassa (P_X) e produtividade em produto (P_P), onde: X_{final} = concentração de biomassa final (g L^{-1}); X_{inicial} = concentração de biomassa inicial (g L^{-1}); P_{final} = concentração

final de carotenoides ($\mu\text{g L}^{-1}$); P_{inicial} = concentração inicial de carotenoides ($\mu\text{g L}^{-1}$); S_{inicial} = concentração inicial de glicose (g L^{-1}); S_{final} = concentração final de glicose (g L^{-1}) e t = tempo de cultivo.

$$Y_{P/S} = \frac{P_{\text{final}} - P_{\text{inicial}}}{S_{\text{inicial}} - S_{\text{final}}} \quad (2)$$

$$Y_{X/S} = \frac{X_{\text{final}} - X_{\text{inicial}}}{S_{\text{inicial}} - S_{\text{final}}} \quad (3)$$

$$Y_{P/X} = \frac{P_{\text{final}} - P_{\text{inicial}}}{X_{\text{final}} - X_{\text{inicial}}} \quad (4)$$

$$P_X = \frac{X_{\text{final}} - X_{\text{inicial}}}{t} \quad (5)$$

$$P_P = \frac{P_{\text{final}} - P_{\text{inicial}}}{t} \quad (6)$$

Para comparar os resultados obtidos nos ensaios com aplicação de CM, em relação aos ensaios controle, sem aplicação de CM, foi utilizada a Equação 7. Onde η corresponde à eficiência de aplicação de CM e relaciona as respostas avaliadas nos cultivos com CM (R_{CM}) e às respostas nos cultivos controle (R_{EC}) (DEAMICI et al., 2016).

$$\eta = \left(\frac{R_{\text{CM}} - R_{\text{EC}}}{R_{\text{EC}}} \right) \times 100 \quad (7)$$

4.4 ENSAIOS DE EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES POR RUPTURA QUÍMICA COM DMSO

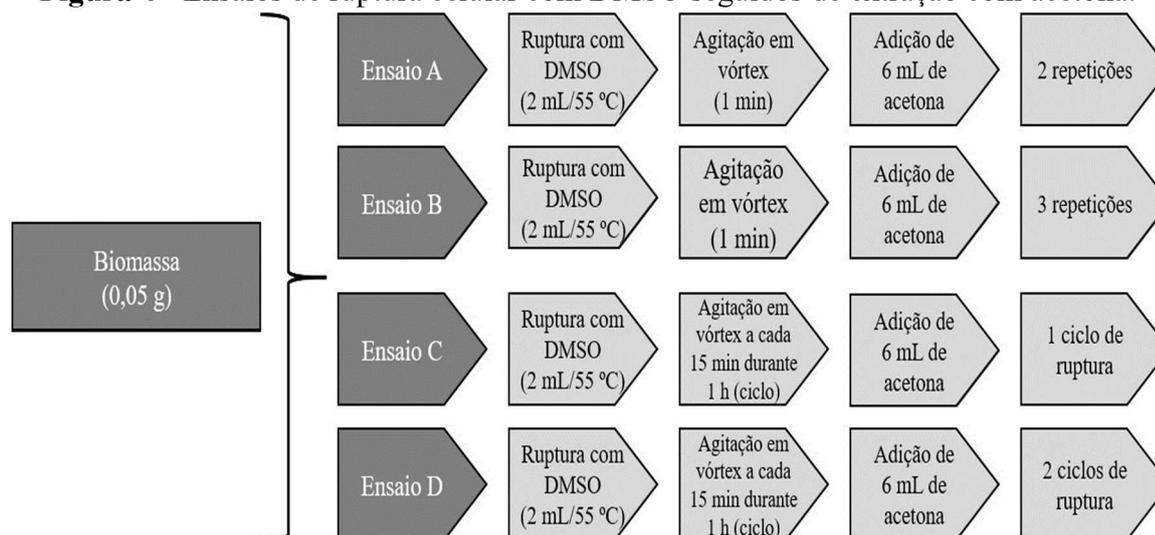
O cultivo para a obtenção da biomassa para a realização dos ensaios de extração de carotenoides por ruptura química com DMSO foi feito em frascos agitados (500 mL), contendo 225 mL do meio YM, pH inicial de 6,0, 10% de inóculo (v v^{-1}), 25 °C, 180 rpm (agitador orbital), com aplicação de CM médio de 30 mT na melhor condição estabelecida no item 4.3.

4.4.1 Avaliação da ruptura celular no processo de extração de carotenoides

Ao final do cultivo foram utilizadas as condições descritas no item 4.3.2 para a obtenção da biomassa. Para avaliar o processo de ruptura celular com DMSO foram utilizados 0,05 g de biomassa adicionados de 2 mL de DMSO, previamente aquecido a 55 °C

Para os ensaios A e B, após a adição do DMSO, a biomassa foi homogeneizada por 1 min em vórtex e em sequência foi adicionado 6 mL de acetona para facilitar a extração de carotenoides, sendo que no ensaio A foram feitas 2 repetições do processo de ruptura e para o ensaio B foram feitas 3 repetições. Para os ensaios C e D, após a adição do DMSO, a biomassa foi homogeneizada por 1 min em vórtex, a cada 15 min, até completar 1 h de contato, caracterizando um ciclo de ruptura química, após esse processo foi adicionado 6 mL de acetona para facilitar a extração dos carotenoides, sendo que no ensaio C foi realizado 1 ciclo de ruptura e para o ensaio D foram feitos 2 ciclos de ruptura (procedimento utilizado como padrão neste estudo), conforme descrito na Figura 4. Após o processo de ruptura celular em todos os ensaios, as amostras foram centrifugadas a 1745 g por 10 min e a fase solvente separada. Para a determinação da concentração de carotenoides foram utilizadas as condições descritas no item 4.3.3.

Figura 4 - Ensaios de ruptura celular com DMSO seguidos de extração com acetona.



4.4.2 Avaliação de pré-tratamentos na biomassa para a extração de carotenoides

Para a obtenção da biomassa foram utilizadas as condições descritas no item 4.4, sob a ação de diferentes pré-tratamentos na biomassa conforme descrito na Tabela 6. A estufa de circulação de ar (35 °C), o freezer (-18 °C) e o ultra freezer (-70 °C) foram utilizados de modo a avaliar a concentração de carotenoides após o processo de ruptura celular e extração de carotenoides sob a ação de diferentes pré-tratamentos na biomassa. Para a extração de carotenoides foi utilizado a metodologia descrita no item 4.3.2 (metodologia padrão utilizada neste trabalho) e a melhor condição de extração em função da ruptura celular com DMSO descrita no item 4.4.1.

Tabela 6 - Pré-tratamento utilizados na biomassa para a extração de carotenoides.

Ensaio	Pré-tratamento da biomassa
1	Secagem (24 h)
2	Secagem (48 h)
3	Secagem (24 h) / Congelamento (24 h)
4	Secagem (48 h) / Congelamento (48 h)
5	Liofilização (48 h)*

* Amostras mantidas a -70 °C por 48 h antes de serem liofilizadas.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os ensaios onde foram avaliadas duas condições as médias foram comparadas pelo teste T de “student”. Para os ensaios realizados com três ou mais condições os resultados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey, ambos com 95% de confiança.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 APLICAÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS DURANTE O CULTIVO DO INÓCULO

Os resultados de contagem de células que foram feitos com o propósito de avaliar a aplicação do CM durante o cultivo do inóculo da levedura *P. rhodozyma* são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Contagem de células nos ensaios controle e com aplicação de campos magnéticos durante o cultivo do inóculo.

Tempo (h)	Ensaio controle (cél mL ⁻¹)	Ensaio com CM (cél mL ⁻¹)
0	1,31x10 ⁷ ±6,95x10 ^{5a}	1,29x10 ⁷ ±8,26x10 ^{5a}
12	1,99x10 ⁷ ±8,44x10 ^{5a}	1,90x10 ⁷ ±1,94x10 ^{6a}
24	1,33x10 ⁸ ±1,21x10 ^{7b}	1,50x10 ⁸ ±1,49x10 ^{7a}
36	1,90x10 ⁸ ±1,80x10 ^{7b}	2,14x10 ⁸ ±1,58x10 ^{7a}
48	2,96x10 ⁸ ±1,71x10 ^{7b}	4,08x10 ⁸ ±1,34x10 ^{7a}

*média±desvio padrão (n =3).

Letras iguais na mesma linha indicam que as médias não diferem significativamente ao nível de confiança de 95% pelo teste T de “student” (p ≥0,05)

Observa-se na Tabela 7, para os tempos considerados, que após 24 h houve diferença significativa no crescimento celular, atingindo valores superiores a 1x10⁸ cél mL⁻¹, sendo esta, a concentração mínima de células necessária para iniciar os cultivos. Observou-se também houve aumento no crescimento celular no ensaio com a aplicação de CM de 12,8, 12,6 e 37,8% nos tempos de cultivo de 24, 36 e 48 h, respectivamente, em relação ao ensaio controle. Dessa maneira, optou-se por definir como padrão a aplicação de CM durante o cultivo do inóculo e definir o tempo de cultivo em 24 h, não sendo necessário estender o cultivo do inóculo até 48 h, conforme descrito e utilizado por Rios et al. (2015). Com isso além de diminuir o tempo do cultivo de 48 h para 24 h, conseguiu-se com a aplicação de CM aumentar em 12,8% a quantidade de células no inóculo.

Alguns autores, como Santos et al. (2012), relataram a falta de conhecimento de todos os efeitos gerados pelo CM nas células e o efeito de não linearidade em relação ao tempo de exposição e intensidade do CM. De acordo com Hristov e Perez (2011), os resultados da literatura são contraditórios, mostrando algumas preocupações sobre a exposição ao CM em células de *S. cerevisiae*, apontando a necessidade de estudos interdisciplinares para explicar melhor os efeitos do CM. Berlot et al. (2013), ao investigarem a influência do CM de 140 mT por 72 h de cultivo do inóculo, observaram aumento significativo de 27,7% no crescimento

celular de *S. cerevisiae* em relação ao cultivo controle. Resultado esse relacionado ao estresse celular causado pela aplicação de CM, confirmando assim o efeito magnético positivo no crescimento celular de micro-organismos durante o cultivo do inóculo.

Dessa forma, observa-se a importância da aplicação de CM no cultivo do inóculo, visto a necessidade de o mesmo estar adaptado as condições do processo, posteriormente avaliadas neste estudo.

5.2 CINÉTICAS DE CULTIVO DE *Phaffia rhodozyma* SOB A INFLUÊNCIA DE CAMPOS MAGNÉTICOS

5.2.1 Acompanhamento do pH, concentração de biomassa e concentração de açúcares redutores totais nos cultivos sob a influência de CM

O Apêndice 2 apresenta os resultados de pH, concentração de biomassa (g L^{-1}), concentração de açúcares redutores totais (ART), concentração de carotenoides específicos ($\mu\text{g g}^{-1}$) e concentração de carotenoides volumétricos ($\mu\text{g L}^{-1}$) dos ensaios controle e com diferentes períodos de aplicação de CM, descritos no item 4.3.

Durante o acompanhamento das cinéticas dos cultivos de *Phaffia rhodozyma* com diferentes tempos de exposição aos CM (30 mT) foi possível observar que o pH em todos os ensaios diminuiu nas primeiras 24 h de cultivo, aumentando gradativamente, atingindo no final dos cultivos valores de 8,10 e 8,12 no ensaio controle (EC) (Fig. 5) e CM 0-168 (Fig. 13), respectivamente. O pH nos outros ensaios com aplicação de CM tiveram o mesmo comportamento, sendo o pH final do cultivo entre 6,98 e 7,69 (Fig. 6-12).

Esse comportamento do pH também foi observado por Cipolatti et al. (2019), que estudando as leveduras *Pichia fermentans* e *Sporidiobolus pararoseus* para produzir carotenoides com meio YM e meio agroindustrial, ajustaram o pH inicial do cultivo para 6,0 e nas primeiras 24 h observaram declínio do pH variando de 4,1 a 5,3 e de 4,8 a 5,6 para as leveduras *P. fermentans* e *S. pararoseus*, respectivamente. Tal comportamento também foi observado por Silva et al. (2016), que estudaram a maximização da produção de carotenoides a partir da levedura *Phaffia rhodozyma* com meios agroindustriais (glicerol bruto e água de parboilização de arroz), observando declínio de 6,0 para 4,7 no valor do pH nas primeiras 24 h de cultivo, sendo que posteriormente houve aumento gradual do mesmo alcançando 7,2 em 168 h.

De acordo com Colet et al. (2015), Urnau et al. (2019) e Valduga et al. (2009), essas leveduras excretam naturalmente compostos intermediários do metabolismo durante seu crescimento (ácido acético, álcool ou intermediário do ciclo do ácido cítrico), levando à

diminuição inicial do pH, que pode ser observada em até 72 h de cultivo dependendo do tipo de levedura produtora de carotenoides, sendo posteriormente assimilado naturalmente pelo micro-organismo após a ingestão de nutrientes e por intensa estimulação da carotenogênese, resultando em aumento gradual do pH até o final do cultivo.

Figura 5 – Cinética do cultivo do ensaio controle, sem aplicação de CM (EC).

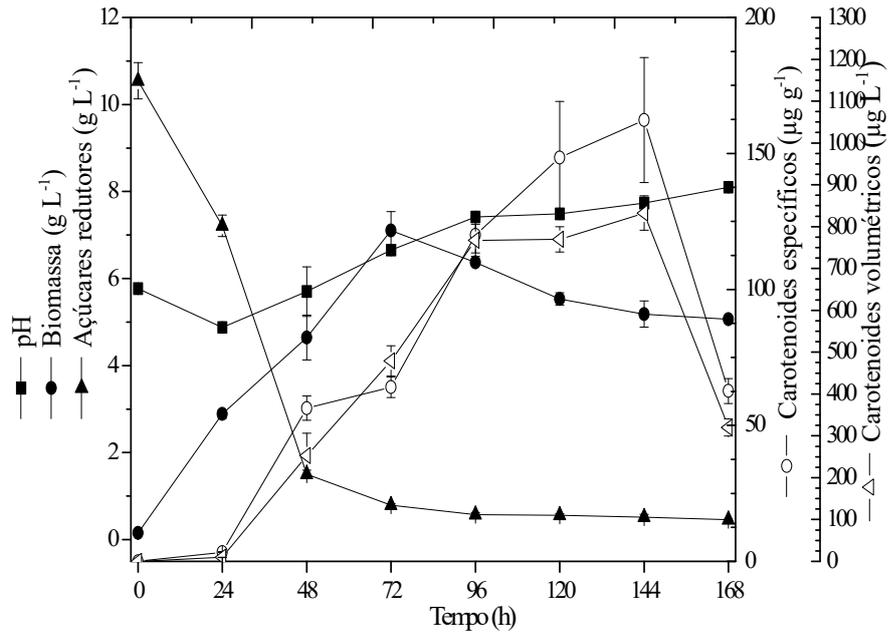


Figura 6 – Cinética do cultivo com aplicação de CM entre 0 e 24 h (CM 0-24).

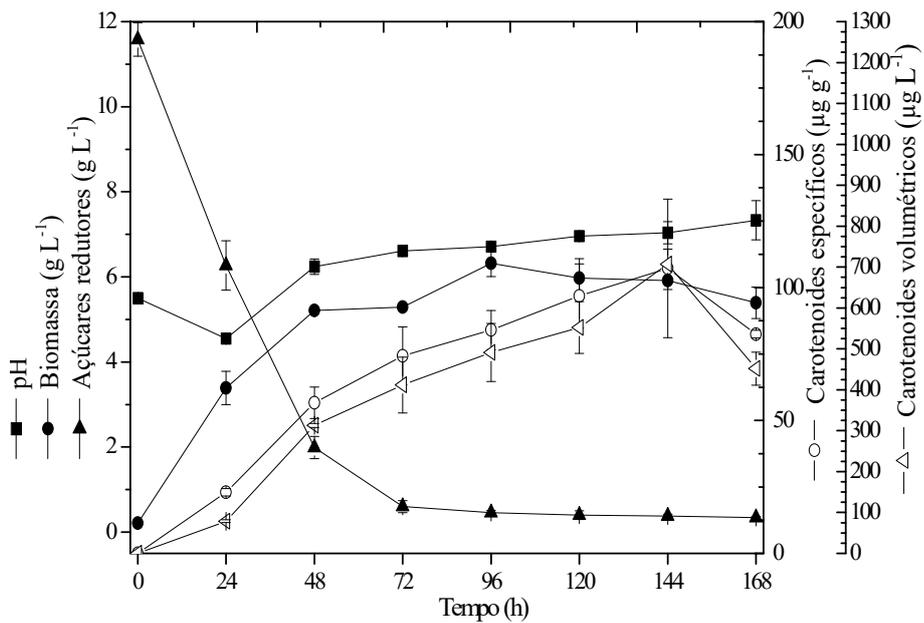


Figura 7 – Cinética do cultivo com aplicação de CM entre 24 e 48 h (CM 24-48).

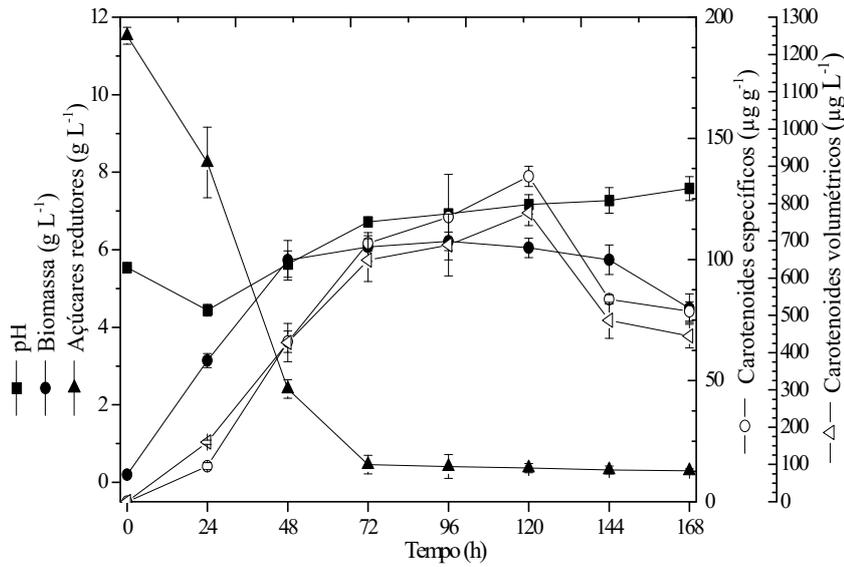


Figura 8 – Cinética do cultivo com aplicação de CM entre 48 e 72 h (CM 48-72).

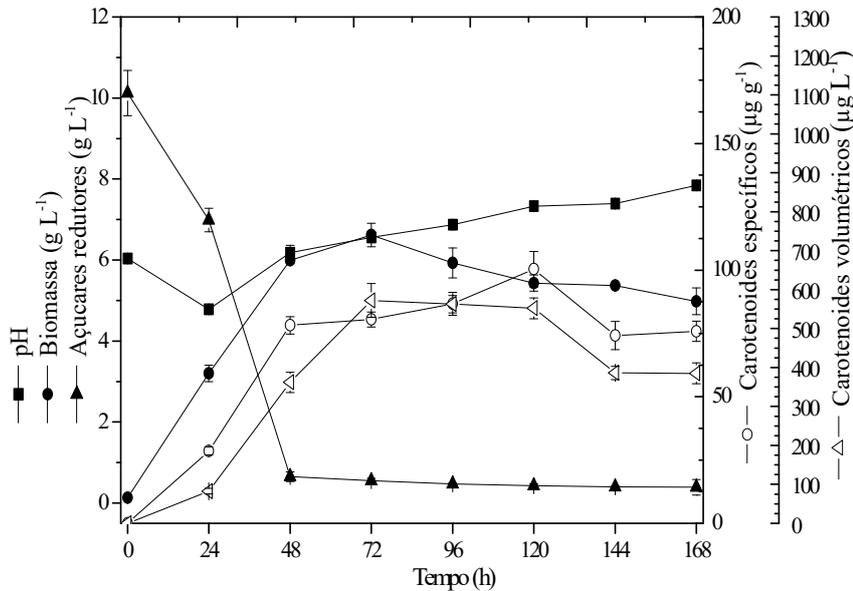


Figura 9 – Cinética do cultivo com aplicação de CM entre 72 e 96 h (CM 72-96).

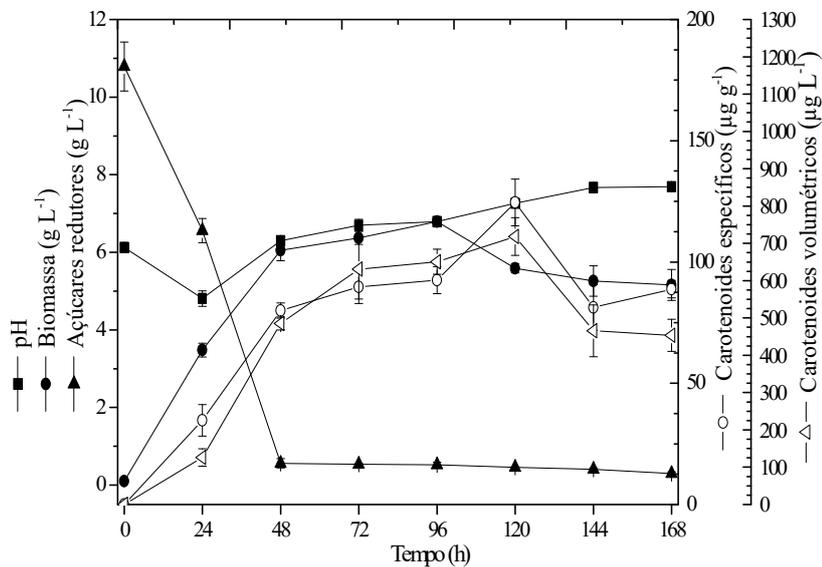


Figura 10 – Cinética do cultivo com aplicação de CM entre 96 e 120 h (CM 96-120).

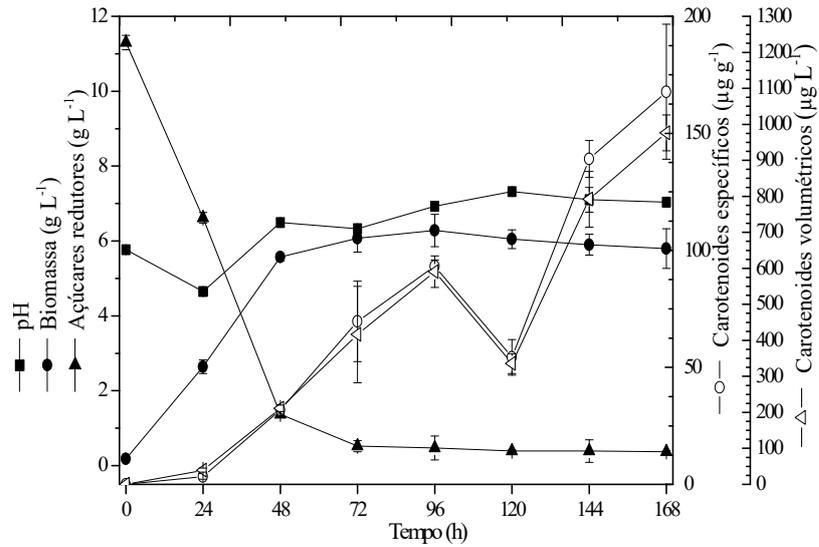


Figura 11 – Cinética do cultivo com aplicação de CM entre 120 e 144 h (CM 120-144).

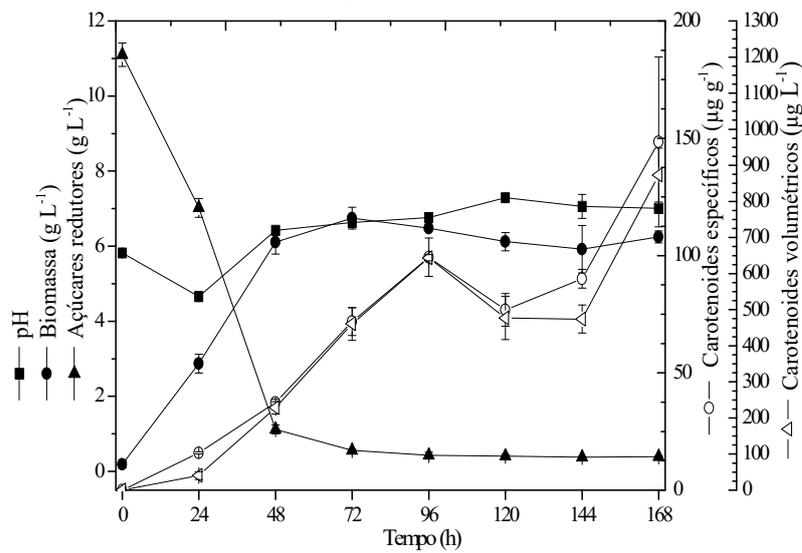


Figura 12 – Cinética do cultivo com aplicação de CM entre 144 e 168 h (CM 144-168).

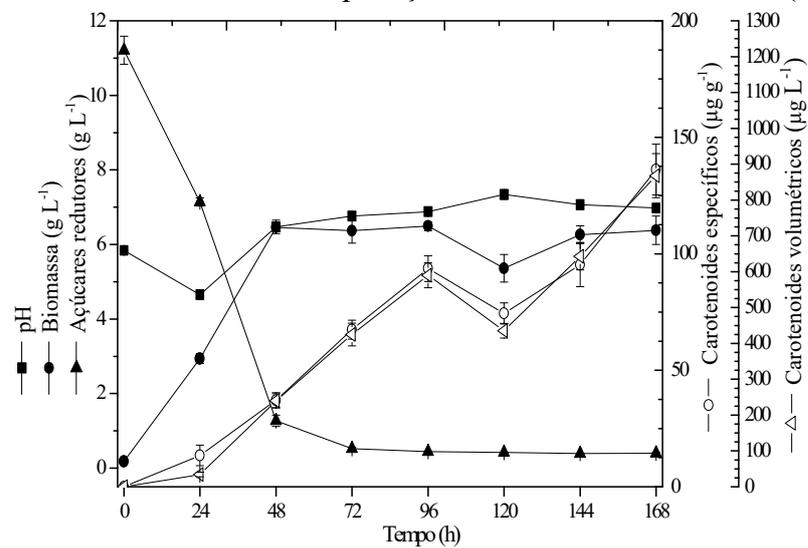
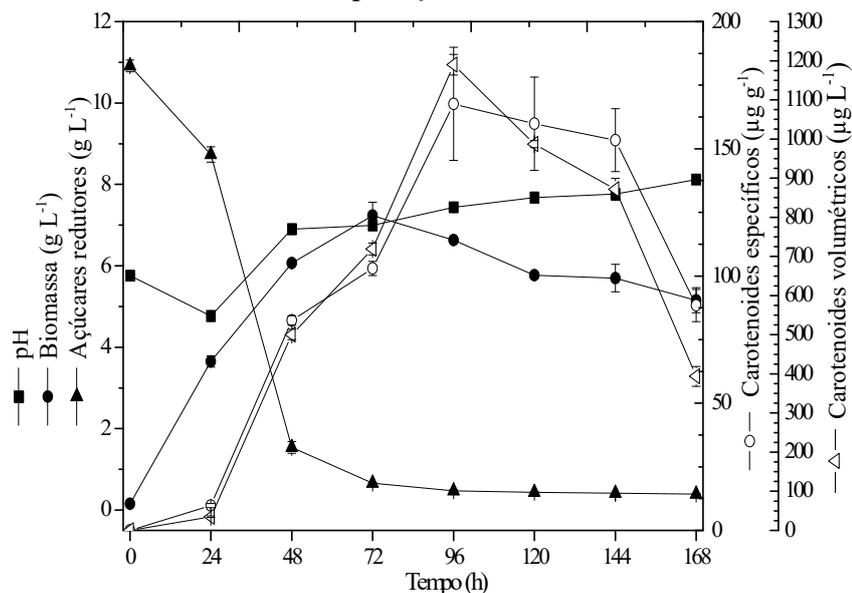


Figura 13 – Cinética do cultivo com aplicação de CM durante todo o cultivo (CM 0-168).

As concentrações iniciais de ART para todos os ensaios variaram de 10,12 a 11,58 g L⁻¹, sendo consumido em torno de 80% após 48 h de cultivo (Fig.5-13). O açúcar utilizado no meio foi a glicose, um monossacarídeo facilmente assimilado pela levedura. Observa-se que nos ensaios CM 0-24 e CM 24-48, após 48 h de cultivo, foram encontradas as concentrações de 1,99 e 2,41 g L⁻¹, sendo superiores aos demais ensaios no mesmo tempo de cultivo. Esses valores possivelmente estão relacionados com o período de aplicação do CM, no início do cultivo onde a levedura estava também se adaptando as condições de cultivo, consumindo o substrato de forma mais lenta. Dessa maneira, após 48 h de cultivo houve diminuição gradual da concentração de açúcares em todos os ensaios, sendo observado o mesmo comportamento até o final do cultivo com concentração de ART entre 0,30-0,45 g L⁻¹ (Apêndice 2).

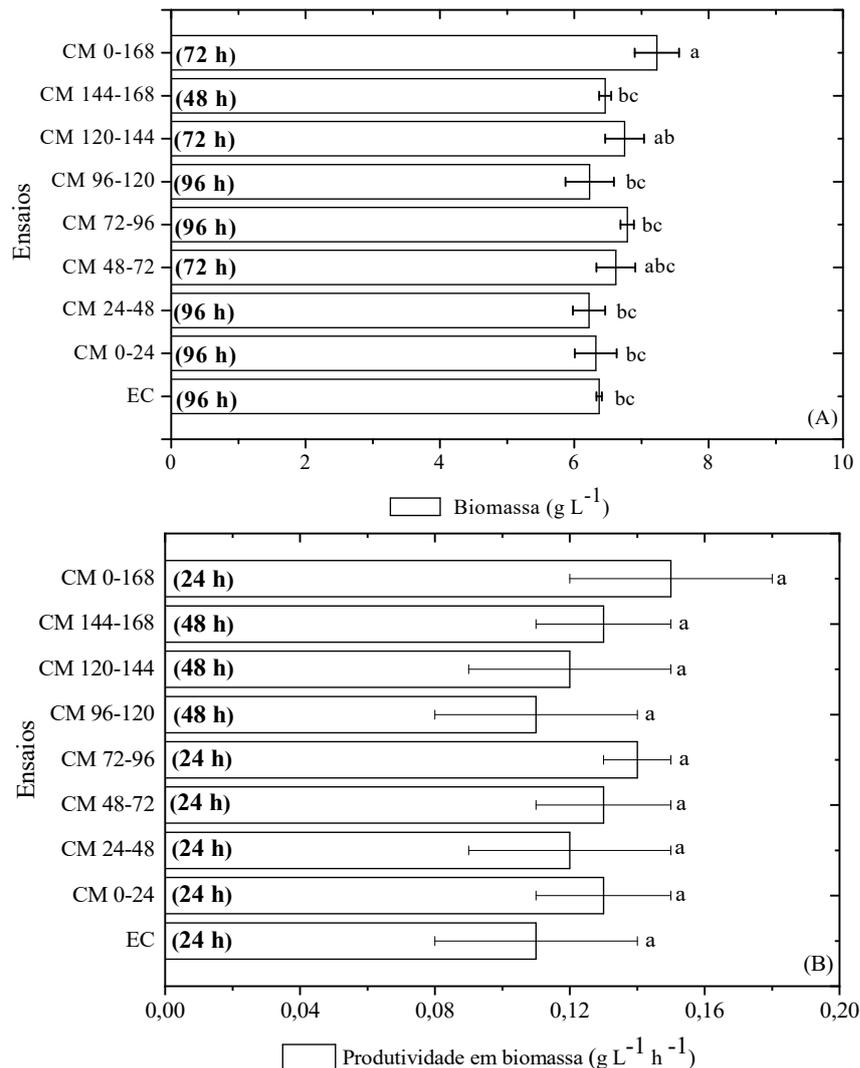
Cipolatti et al. (2019) e Rodrigues et al. (2019) também usando micro-organismos produtores de carotenoides com diferentes meios agroindustriais como substrato, observaram queda de 50% na concentração de ART nas primeiras 24 h e 75% após 96 h de cultivo. A diferença observada no tempo de consumo do substrato nesses estudos acima, está relacionada à capacidade do micro-organismo em assimilar açúcares complexos, que compõe os meios agroindustriais utilizados.

Em geral, sabe-se que as leveduras são aplicadas em numerosos processos fermentativos, pois possuem a capacidade de assimilar e utilizar como fonte de energia vários tipos de substratos, sendo esse um fator importante em relação a outros micro-organismos. Mas de acordo com Mata-Gómez et al. (2014), para as leveduras carotenogênicas, a fonte de carbono

é uma das variáveis mais estudadas, pois influencia diretamente a produção de carotenoides, afetando a produção de acetil-CoA e conseqüentemente a biossíntese de carotenoides, uma vez que essa coenzima é a primeira precursora da produção de carotenoides, sendo convertida em ácido mevalônico.

Com relação à concentração de biomassa, todos os ensaios iniciaram com 0,13 a 0,18 g L⁻¹ e após 48 h houve aumento na concentração de biomassa nos ensaios com a aplicação de CM, atingindo concentrações entre 5,21 e 6,46 g L⁻¹ (Fig. 6-13), diferindo significativamente (p<0,05) do ensaio controle que alcançou 4,64 g L⁻¹ (Fig. 5) (Apêndice 3). Posteriormente, todos os ensaios tiveram o mesmo comportamento, sendo que entre 72-96 h de cultivo a maioria dos ensaios alcançou seus valores máximos na concentração de biomassa, variando de 6,22 a 7,23 g L⁻¹ (Figura 14).

Figura 14 – Valores máximos da concentração de biomassa (A) e de produtividade em biomassa (B) de cada ensaio. Entre parênteses encontra-se o tempo no qual foi obtido o valor máximo. Média ± desvio padrão (n = 3). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre os ensaios (p≤0,05) pelo teste de Tukey.



Comparando-se os valores máximos de concentração de biomassa em todos os ensaios, o melhor resultado ($7,23 \text{ g L}^{-1}$ em 72 h) foi obtido com aplicação de CM durante todo o cultivo (CM 0-168). Esse mesmo ensaio foi estatisticamente igual ao ensaio CM 120-144 com concentração de $6,79 \text{ g L}^{-1}$, diferindo estatisticamente dos demais ($p < 0,05$). Na maioria dos ensaios houve decréscimo na concentração de biomassa ao final do cultivo variando de $4,98$ a $5,80 \text{ g L}^{-1}$, com exceção dos ensaios CM 120-144 e CM 144-168 (Fig. 11 e 12), que no final do cultivo diferiram significativamente ($p < 0,05$) dos outros ensaios, com concentrações de $6,25$ e $6,54 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente (Apêndice 3).

Alguns estudos utilizando *P. rhodozyma* para a produção de carotenoides, mostraram concentrações de biomassa inferiores aos encontrados nesse estudo. Urnau (2018), em cultivos com meio agroindustrial e processo em batelada alimentada (adição de 50 mL de fonte de carbono a cada 12 h), alcançou $4,88 \text{ g L}^{-1}$ em 96 h de cultivo. Xiao et al. (2015), utilizando meio de cultivo suplementado com vitaminas B1 e B6, obtiveram $7,2 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa em 60 h, resultado similar ao encontrado nos ensaios controle e com aplicação de CM (CM 0-168) em meio YM, sem nenhuma suplementação no meio.

Cipolati et al. (2015) estudaram a produção de biomassa e de carotenoides por *P. rhodozyma* em meio YM e condições similares ao ensaio controle deste estudo. Ao final de cultivo (168 h) a máxima concentração de biomassa foi $4,42 \text{ g L}^{-1}$, resultado inferior ao ensaio controle desse estudo ($6,37 \text{ g L}^{-1}$ em 96 h).

A maior concentração de biomassa observada no ensaio CM 0-168, chegou a ser superior em 38,8% comparado aos dados encontrados na literatura, sendo que maiores concentrações de biomassa são atrativas durante o processo, pois os principais compostos de interesse, os carotenoides, são compostos intracelulares.

Os CM influenciaram positivamente o crescimento celular até 96 h de cultivo. De acordo com Goodman e Blank (1995) e Dobsinsky e Jedlicka (2017), as células respondem ao magnetismo como um estresse ambiental, resultando na alteração do metabolismo celular aumentando a produção de biomassa. Esse comportamento também foi observado nos ensaios com aplicação de CM após 120 h de cultivo onde o efeito magnético resultou no aumento da produção de biomassa, alcançando concentrações de $6,25$ e $6,54 \text{ g L}^{-1}$, diferindo significativamente dos demais ensaios (Apêndice 3).

Sabe-se que as diferenças entre as concentrações de biomassa nos ensaios com CM dependem do tempo de aplicação do CM e o período de incubação do micro-organismo. Santos et al. (2010) obtiveram aumento na concentração de biomassa de *Saccharomyces cerevisiae* de 43,1 e 19,8% em relação ao ensaio controle quando aplicado 25 mT até 48 ou 72 h de cultivo,

respectivamente. Canli et al. (2011) observaram aumento de 28,6% na produção de biomassa por *R. glutinis* em relação ao ensaio controle com aplicação de 7 mT durante 72 h de cultivo.

Estudos com aplicação de CM em cultivo de microalgas também reportam o aumento da concentração de biomassa. Deamici, Santos e Costa (2018) no cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18, obtiveram aumento de 16,3% na produção de biomassa sob a influência de 25 mT (24 h d⁻¹) em 11 d de cultivo. Já no estudo de Bauer et al. (2017) no cultivo de *Chlorella kessleri*, observaram aumento de 82,9% na concentração de biomassa sob a influência de 60 mT (1 h d⁻¹) em 10 d de cultivo.

No que se refere à produtividade em biomassa, de acordo com a Figura 14, observou-se máximos variando de 0,11 a 0,15 g L⁻¹ h⁻¹ entre 24 e 48 h de cultivo. No entanto não foi possível observar diferença significativa entre os ensaios com nível de confiança de 95%, apesar disso as produtividades foram superiores às encontradas por outros autores, demonstrando que os CM podem aumentar as produtividades dos cultivos, dependendo do tempo e intensidade aplicados. Urnau (2018) cultivando *P. rhodozyma* em meio agroindustrial, encontrou máximo de 0,05 g L⁻¹ h⁻¹ em 96 h. Já no estudo de Cipolatti et al. (2015), utilizando a mesma levedura em cultivos com meio YM, conseguiram 0,03 g L⁻¹ h⁻¹ em 168 h. Estes resultados no permite afirmar que a aplicação de CM pode influenciar a produtividade em biomassa, em resposta ao estresse ambiental causado durante os cultivos.

5.2.2 Produção de carotenoides sob a influência de campos magnéticos e determinação dos parâmetros cinéticos de cultivo

Cipolatti et al. (2019) estudaram a produção de carotenoides por *Sporidiobolus pararoseus*, *Pichia fermentans* e *Rhodotorula mucilaginosa* em cultivos com meio YM e meios agroindustriais. Diferentes comportamentos cinéticos foram observados para o mesmo micro-organismo, principalmente no que se refere à produção de carotenoides. Essa diferença na produção está relacionada as diferentes condições de cultivo, que afetam o metabolismo do micro-organismo.

Essa alteração na cinética de produção de carotenoides também foi observada nos ensaios utilizando diferentes períodos de aplicação do CM. No que se refere a produção de carotenoides específicos e volumétricos a aplicação de CM proporcionou diferentes respostas quando comparadas ao ensaio controle (sem aplicação de CM) (Fig. 5-13).

Expressivas concentrações de carotenoides específicos e volumétricos foram alcançadas nos ensaios CM 96-120 (163,76 µg g⁻¹, 976,58 µg L⁻¹) CM 120-144 (148,47 µg g⁻¹, 903,63 µg L⁻¹) e CM 144-168 (136,17 µg g⁻¹ e 890,55 µg L⁻¹) em 168 h de cultivo. No entanto,

a maior concentração de carotenoides foi alcançada quando o CM foi aplicado durante todo o cultivo (CM 0-168), com concentrações de $167,66 \mu\text{g g}^{-1}$ e $1189,81 \mu\text{g L}^{-1}$ em 96 h de cultivo, comparados ao ensaio controle com $156,80 \mu\text{g g}^{-1}$ e $811,13 \mu\text{g L}^{-1}$ em 144 h de cultivo, para carotenoides específicos e volumétricos, respectivamente. Comparando-se os maiores valores, a aplicação de CM durante todo o cultivo aumentou 6,9% a concentração de carotenoides específicos e 46,7% os carotenoides volumétricos. Além disso a maior concentração de carotenoides foi obtida em menor tempo, 96 h de cultivo no ensaio CM 0-168 e em 144 h no ensaio controle.

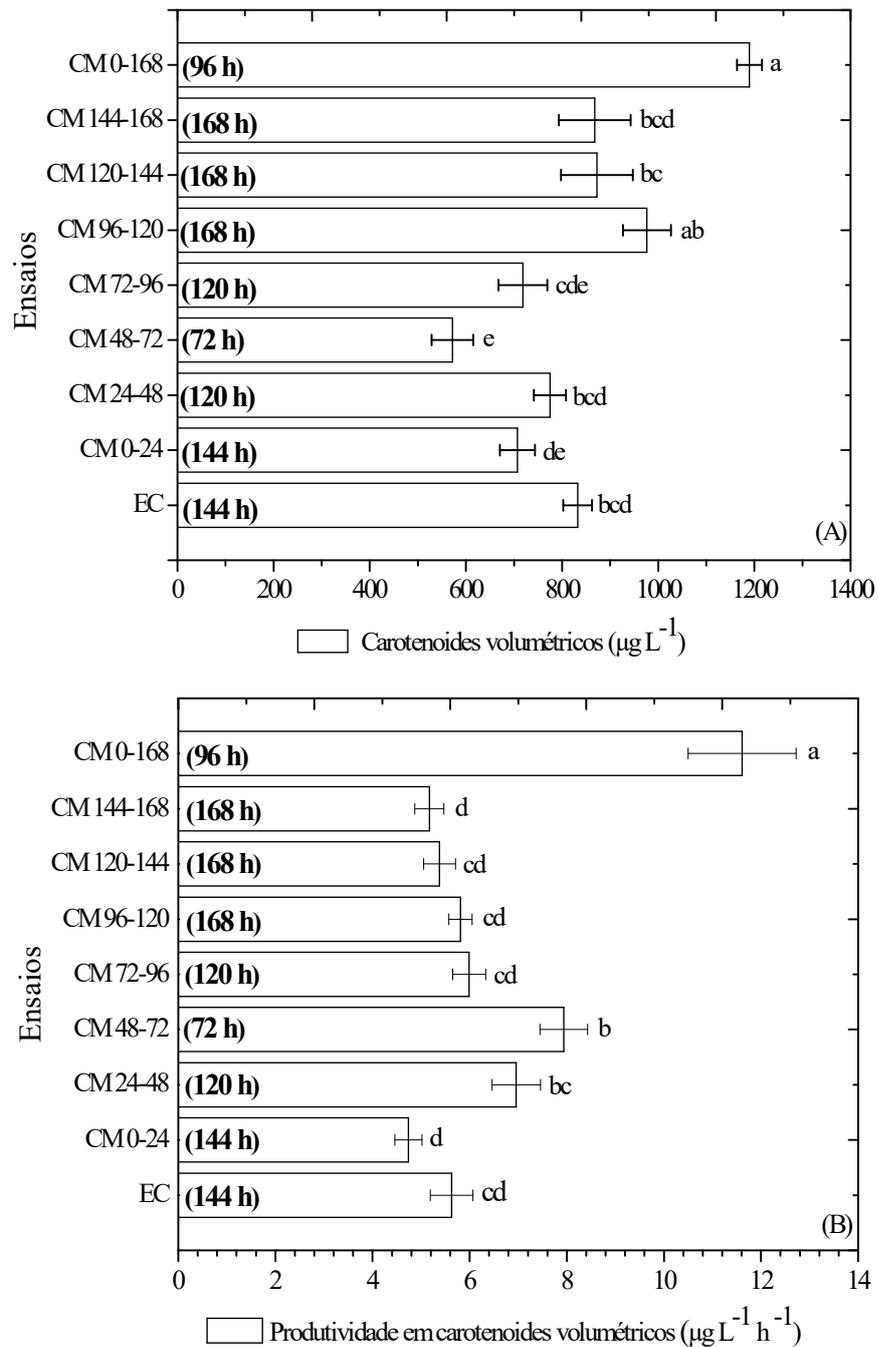
De acordo com Barredo et al. (2017), a levedura *P. rhodozyma* não requer luz para o acúmulo de carotenoides, sendo capaz de metabolizar muitos tipos de sacarídeos em condições aeróbicas e anaeróbicas e se reproduz a taxas de crescimento relativamente altas, o que acarreta um fator estressante no sistema biológico do micro-organismo pela ausência de substrato no meio. Buzzini et al. (2005) descreveram que a aplicação de CM age como um fator estressante para a célula do micro-organismo. Dessa maneira a alteração no comportamento cinético dos cultivos com CM pode ser justificado pelas alterações no metabolismo do micro-organismo em função do estresse causado pelo efeito magnético.

De acordo com Frengova e Beshkova (2009), a produção de carotenoides acontece durante a fase estacionária, funcionando como um mecanismo de defesa celular ao estresse causado pela baixa concentração da fonte de carbono no meio. Observa-se que nos ensaios CM 96-120, CM 120-144 e CM 114-168 em que a aplicação do CM ocorreu após 96 h de cultivo, houve o estímulo da produção de carotenoides específicos e volumétricos, diferindo significativamente dos demais ensaios ($p < 0,05$) em 168 h de cultivo (Apêndice 3). De acordo com Dobsinský e Jedlicka (2017), é possível aumentar a produção de compostos de interesse por alterações sofridas no metabolismo celular do micro-organismo devido à ausência da fonte de carbono e outros fatores como a ação de CM, o que pode justificar a produção de carotenoides nos ensaios citados acima, como resposta ao segundo fator estressante sofrido pelas células.

No ensaio CM 0-168, observou-se que a levedura se adaptou à condição de estresse causada pela exposição permanente ao CM, possivelmente causando a eletro-ativação de alguns sistemas enzimáticos ou caminhos metabólicos favorecendo positivamente a produção de alguns compostos intracelulares, conforme descrito por Fologea et al. (1998). Sendo assim, esses resultados se mostraram promissores no que se refere a produção de carotenoides pela levedura *P. rhodozyma*.

Para analisar a diferença na produção de carotenoides volumétricos entre os cultivos controle e com aplicação de CM, é possível observar na Figura 15 que os valores máximos da concentração de carotenoides volumétricos e da produtividade em carotenoides variaram entre 72 e 168 h cultivo.

Figura 15 – Valores máximos da concentração de carotenoides volumétricos (A) e de produtividade em carotenoides (B) de cada ensaio. Entre parênteses encontra-se o tempo no qual foi obtido o valor máximo. Média \pm desvio padrão ($n = 3$). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre os ensaios ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.



Comparando-se os valores máximos da concentração de carotenoides, com aplicação de CM durante todo o cultivo (CM 0-168) foi obtido o melhor resultado, 1189,81 $\mu\text{g L}^{-1}$ em 96 h. Esse mesmo ensaio foi estatisticamente igual ao ensaio CM 96-120 que alcançou concentração de 976,57 $\mu\text{g L}^{-1}$, diferindo estatisticamente dos demais ($p < 0,05$). Na maioria dos ensaios houve decréscimo na concentração de carotenoides volumétricos após 144 h de cultivo variando de 327,89 a 453,23 $\mu\text{g L}^{-1}$, com exceção dos ensaios CM 96-120, CM 120-144 e CM 144-168 (Fig. 10-12), que no final do cultivo diferiram significativamente ($p < 0,05$) dos outros ensaios com concentrações de 976,58, 903,63 e 890,55 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Apêndice 3).

Alguns estudos utilizando *P. rhodozyma*, mostraram resultados similares de produção de carotenoides. Urnau (2018) conseguiu, em cultivos com meio agroindustrial e processo em batelada alimentada (adição de 50 mL de fonte de carbono a cada 12 h), máxima concentração de carotenoides de 1162,07 $\mu\text{g L}^{-1}$ em 72 h de cultivo, resultado similar ao encontrado no ensaio com aplicação de CM (CM 0-168) em meio YM.

Xiao et al. (2015), estudando a produção de carotenoides pela mesma levedura e com meio de cultivo suplementado com diferentes sais e vitaminas B1 e B6, obtiveram 1740 $\mu\text{g L}^{-1}$ em 60 h de cultivo, sendo essa concentração 31,6% superior do que a encontrada neste trabalho. Dessa maneira se faz necessário a análise econômica de ambos os processos para verificar qual seria a melhor opção para a produção desses biocompostos.

Com a aplicação de CM ao longo de todo o cultivo conseguiu-se incrementar 20,4% a produção de carotenoides em relação ao observado por Cipolati et al. (2015) que obtiveram 946 $\mu\text{g L}^{-1}$ após 168 h de cultivo, usando a mesma cepa em meio YM e condições similares ao ensaio controle deste estudo.

No que se refere a produtividade em carotenoides, na maioria dos ensaios não houve diferença significativa entre os valores máximos e o ensaio controle, exceto o ensaio CM 0-168, no qual a produtividade (12,39 $\mu\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) foi 55% maior, diferindo significativamente dos demais ensaios ($p < 0,05$). A mudança nas condições de cultivo é um fator que afeta a produtividade de produção de carotenoides, isto foi observado por Rodrigues et al. (2019), que obtiveram aumento de 55,7% na produtividade em carotenoides volumétricos em cultivos com a levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, variando de 6,2 para 14,0 $\mu\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ no meio de cultivo com glicerol em relação ao meio de cultivo com melaço de cana de açúcar, respectivamente.

O cálculo de eficiência do CM foi feito para as respostas dos cultivos com CM em relação ao cultivo controle que diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$). Sendo assim, foi

possível observar o efeito magnético positivo de 20,4% na concentração volumétrica de carotenoides para o ensaio CM 96-120 e o aumento de 39,7 e 42,9% na concentração específica e volumétrica, respectivamente, do ensaio CM 0-168 em relação ao controle. Observou-se também com aplicação de CM ao longo de todo o cultivo aumento de 47,8% na produtividade em carotenoides, sendo esse o mais eficiente em todas as respostas avaliadas em relação ao ensaio controle.

Alguns trabalhos já vêm estudando a aplicação de CM na produção de pigmentos por micro-organismos. Zhang et al. (2014a) obtiveram pigmentos amarelos e vermelhos utilizados em alimentos por fermentação em estado sólido com o fungo *Monascus purpureus* em farelo de arroz, aplicando CM de 0,4 mT. Aumento significativo de 65,4 e 59,2% dos pigmentos amarelo e vermelho, respectivamente, foi observado no ensaio com CM em relação ao controle após 192 h de cultivo. A aplicação de CM influenciou diretamente no sistema biológico do micro-organismo aumentando a produção destes metabólitos secundários.

Bauer et al. (2017) estudaram a produção de pigmentos com aplicação de CM em cultivos de *Chlorella kessleri*. Ao aplicar 60 mT por 1 h d⁻¹ houve estímulo de 38,9% e 59,1% na concentração de clorofila *a* e clorofila *b*, e 25% na concentração de carotenoides totais, sendo que a aplicação de CM nesse estudo foi considerada uma alternativa econômica para estimular a síntese de biomoléculas de alto valor agregado produzidos por microalgas. As produtividades também foram calculadas e observaram aumento de 44% na clorofila *a* e de 25% na produtividade em carotenoides totais em relação ao ensaio controle.

Deamici, Costa e Santos (2016) e Deamici et al. (2019a) explicaram que esse estímulo positivo em algumas respostas dos cultivos com CM pode ser justificada pela alteração nos níveis das enzimas e movimentos de elétrons e íons no interior da célula, bem como alterações no crescimento celular do micro-organismo estimulando a produção de diferentes metabólitos, que destacados através da produtividade máxima do produto de interesse, tendem a definir as melhores condições de processo.

A Tabela 8 apresenta os fatores de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$), substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) e biomassa em produto ($Y_{P/X}$) do ensaio controle (EC) e dos ensaios com aplicação de CM. O fator de conversão $Y_{P/S}$ para os ensaios CM 96-120, CM 120-144 e CM 144-168 diferiram significativamente dos demais ensaios ($p < 0,05$). Em relação ao fator de conversão $Y_{P/X}$, o valor máximo de 28,57 $\mu\text{g g}^{-1}$ foi obtido no ensaio CM 96-120, diferindo estatisticamente dos outros ensaios. Para o fator de conversão $Y_{X/S}$ não houve diferença significativa entre os ensaios ($p > 0,05$) variando de 0,46-0,59 g g^{-1} .

Tabela 8 - Parâmetros cinéticos dos cultivos de *P. rhodozyma* sob a influência de CM.

Ensaio	$Y_{P/S}$ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	$Y_{X/S}$ (g g^{-1})	$Y_{P/X}$ ($\mu\text{g g}^{-1}$)
EC	6,43±0,50 ^b	0,49±0,02 ^a	12,73±0,91 ^d
CM 0-24	7,44±0,27 ^b	0,46±0,01 ^a	15,91±0,99 ^{cd}
CM 24-48	7,11±0,66 ^b	0,48±0,07 ^a	14,85±1,13 ^d
CM 48-72	6,78±1,44 ^b	0,46±0,08 ^a	15,63±0,92 ^d
CM 72-96	8,44±0,42 ^b	0,51±0,01 ^a	17,55±1,27 ^{cd}
CM 96-120	15,47±1,30 ^a	0,51±0,04 ^a	28,57±2,23 ^a
CM 120-144	14,09±2,20 ^a	0,56±0,02 ^a	24,50±2,55 ^b
CM 144-168	12,60±0,96 ^a	0,59±0,02 ^a	21,41±1,09 ^{bc}
CM 0-168	8,29±0,42 ^b	0,48±0,03 ^a	17,43±0,17 ^{cd}

Média ± desvio padrão (n = 3).

Letras diferentes na mesma coluna correspondem a diferenças significativas entre os ensaios ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

A melhor condição para produzir carotenoides pela levedura *Phaffia rhodozyma* é aplicar o CM durante todo o cultivo. Pois a levedura se adaptou ao efeito magnético causado pelos ímãs, propiciando o aumento da produção de biomassa e carotenoides, alcançando suas maiores concentrações em 96 h de cultivo. Levando em consideração que o máximo valor de produtividade em carotenoides também foi encontrado neste mesmo ensaio, mostra-se a potencialidade de se definir como padrão o emprego de CM durante o cultivo para produzir carotenoides.

A literatura cita que a máxima produção de carotenoides ocorre durante a fase estacionária em condições de estresse devido à ausência da fonte de carbono e em 144 h de cultivo. Sendo assim, a aplicação de CM durante o todo o cultivo do inóculo e para a produção de carotenoides estimula a produção desses compostos reduzindo o tempo de processo em 72 h. Se tornando assim uma alternativa de baixo custo e de possível interesse pela indústria, por se tratar de um composto oriundo de um micro-organismo com certificação GRAS e de fácil comercialização.

5.3 AVALIAÇÃO DOS ENSAIOS DE RUPTURA QUÍMICA COM DMSO E DE PRÉ-TRATAMENTOS NA BIOMASSA PARA A EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES

A partir da definição das melhores condições de cultivo com CM para a produção de biomassa e carotenoide, foi realizado a avaliação do processo de ruptura celular com DMSO e extração de carotenoides, sendo os resultados apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Ensaios de extração de carotenoides em relação ao processo de ruptura celular com DMSO.

Ensaio	Carotenoides específicos ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Carotenoides volumétricos ($\mu\text{g L}^{-1}$)
A	108,26 \pm 5,63 ^c	777,33 \pm 33,05 ^c
B	185,86 \pm 11,94 ^a	1334,45 \pm 59,21 ^a
C	51,18 \pm 8,96 ^d	367,48 \pm 32,34 ^d
D	144,68 \pm 11,50 ^b	1038,84 \pm 57,44 ^b

Média \pm desvio padrão (n = 3).

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05) avaliando a extração de carotenoides em função da ruptura celular com DMSO.

Com relação ao processo de ruptura celular com DMSO, o ensaio com 2 ciclos de ruptura celular (Ensaio D), considerado o método padrão utilizado no item 5.2 deste trabalho para o acompanhamento cinético dos cultivos, diferiu significativamente de todos os ensaios. Nos Ensaios A e C quantidades menores de carotenoides foram extraídas. No entanto, o melhor resultado foi alcançado quando repetiu-se 3 vezes o processo de ruptura celular seguida de extração com acetona (Ensaio B), com concentrações de 185,86 \pm 11,94 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 1334,45 \pm 59,21 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os carotenoides específicos e volumétricos, respectivamente, diferindo significativamente ao nível de confiança de 95% dos demais ensaios.

Os resultados do Ensaio B estão diretamente ligados com a quantidade de solvente, o número de repetições utilizados no processo de extração e o coeficiente de partição da extração dos carotenoides, que de acordo com Silva et al. (2006) e Mota et al. (2010), se trata um parâmetro termodinâmico que relaciona o grau de solubilidade entre solventes imiscíveis em processos de extração e separação de líquidos, onde para que seja extraído o máximo do composto de interesse, seja realizado a repetição do processo de extração com maiores quantidades de solvente.

Autores como Fonseca et al. (2011), Lopes (2014) e Michelon et al. (2012), estudaram diferentes técnicas de ruptura celular (mecânicas, químicas e enzimáticas) em leveduras produtoras de carotenoides intracelulares. De forma geral o processo de ruptura química com DMSO se mostrou um método analítico eficiente para a extração de carotenoides. Dessa maneira, este estudo no processo de ruptura celular com DMSO visou a adaptação do método para diminuir o tempo gasto no processo e aumentar a recuperação dos carotenoides produzidos. A adaptação na metodologia (Ensaio B) aumentou 22,2% a concentração de carotenoides extraídos se comparados ao Ensaio D, até o presente momento usado como o padrão.

Após definido o melhor método para o processo de ruptura celular com DMSO e extração de carotenoides, foram testados diferentes pré-tratamentos na biomassa de modo a definir o melhor protocolo para quantificação dos carotenoides, conforme mostra a Tabela 10.

Tabela 10 - Diferentes pré-tratamentos na biomassa para extração de carotenoides pelo processo de ruptura celular com DMSO.

Ensaio	Processo padrão		Processo adaptado	
	Carotenoides Específicos ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Carotenoides volumétricos ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Carotenoides específicos ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Carotenoides volumétricos ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	100,54±11,33 ^{c,A}	737,95±57,91 ^{c,A}	119,32±13,33 ^{b,A}	875,84±59,92 ^{b,A}
2	85,71±5,65 ^{c,B}	629,1±33,87 ^{c,B}	100,48±6,29 ^{b,A}	737,52±37,74 ^{b,A}
3	117,02±13,09 ^{bc,B}	858,91±23,95 ^{bc,B}	220,76±26,08 ^{a,A}	1620,38±69,34 ^{a,A}
4	148,34±18,53 ^{b,B}	1088,81±69,10 ^{b,B}	196,49±29,13 ^{a,A}	1442,22±71,92 ^{a,A}
5	199,24±14,56 ^{a,B}	1462,45±67,30 ^{a,B}	231,09±15,43 ^{a,A}	1696,18±89,60 ^{a,A}

Média ± desvio padrão (n = 3).

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) avaliando a extração de carotenoides com diferentes pré-tratamentos na biomassa. Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na linha diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$) comparando o método de extração padrão com o método adaptado.

Liofilizando a biomassa (Ensaio 5) antes da extração consegue-se obter as maiores concentrações de carotenoides específicos e volumétricos em ambos os processos de extração. Sendo que no processo padrão para a extração de carotenoides, o Ensaio 5 apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) dos demais ensaios. Já para o processo de extração adaptada, utilizando a biomassa que foi seca (24 h)/ congelada (24 h), seca (48 h)/congelada (48 h) ou liofilizada os resultados de extração não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$).

Observa-se também que o processo de extração adaptada foi mais eficiente, sendo que as concentrações de carotenoides extraídas foram 47, 24,5 e 13,8% maiores que com o processo de extração padrão para os Ensaios 3, 4 e 5, respectivamente. Desta forma a melhor opção de pré-tratamento da biomassa é secar a biomassa durante 24 h e posteriores mantê-la congelada por 24 h, pois reduz o tempo de processo com maior recuperação dos carotenoides intracelulares.

A literatura consultada mostra que autores utilizando a levedura *P. rhodozyma*, realizaram o estudo do pré-tratamento da biomassa para melhor o processo de extração de carotenoides. Fonseca et al. (2011), alcançaram as melhores concentrações de carotenoides ($164,5 \mu\text{g g}^{-1}$) com a biomassa seca (48 h)/congelada (48 h). O mesmo foi observado por Cipolatti et al. (2015) que conseguiram $215 \mu\text{g g}^{-1}$ ao submeter a biomassa nas mesmas condições. Sendo assim, a metodologia no pré-tratamento da biomassa descrito por Fonseca et

al. (2011) vem sendo comumente utilizada para o desenvolvimento de estudos de extração de carotenoides com a levedura *P. rhodozyma*.

Na Tabela 11 tem-se a comparação dos tempos de processo utilizados para a obtenção de extratos carotenogênicos do processo padrão e do processo adaptado.

Tabela 11 – Tempo gasto no processo para obtenção dos extratos carotenogênicos com concentrações máximas de carotenoides.

	Reativação do Micro-organismo (h)	Pré- Inóculo (h)	Inóculo (h)	Cultivo (h)	Pré-tratamento na biomassa (h)	Total do processo (h)
Processo Padrão	48	48	48	144	96	384
Processo Adaptado	48	48	24	96	48	264

De acordo com a literatura consultada os extratos carotenogênicos são obtidos após 384 h de processo (desde a reativação do micro-organismo até o final do processo de extração). Ao final deste trabalho, observa-se como promissora a adaptação no método, conforme os resultados obtidos em cada etapa do estudo (aplicação de CM no inóculo e no cultivo, estudos de extração e pré-tratamentos na biomassa), reduzindo o tempo de processo para a obtenção dos extratos carotenogênicos para 264 h. Até o presente momento, não encontrou-se na literatura consultada, estudos com a aplicação de CM relacionando o cultivo e a extração de carotenoides produzido por esta levedura GRAS.

6. CONCLUSÃO

Em relação ao ensaio de aplicação de CM no cultivo do inóculo, após 24 h ambos os cultivos alcançaram a concentração celular mínima para iniciar o cultivo (1×10^8 cél mL⁻¹), sendo que no ensaio com CM observou-se aumento de 12,8% no crescimento celular.

O efeito magnético no cultivo de *Phaffia rhodozyma* NRRL Y-17268 foi mais eficaz na produção de carotenoides quando aplicado durante todo tempo o cultivo, pois as maiores concentrações de biomassa (7,23 g L⁻¹) e carotenoides volumétricos (1189,81 µg L⁻¹) foram obtidas entre 72 e 96 h de cultivo. A aplicação do campo magnético aumentou a produção de carotenoides em 42,9% e a produtividade em carotenoides em 47,8%.

No que se refere aos ensaios de extração é necessária a adaptação dos métodos de ruptura celular e extração de carotenoides atualmente utilizados, bem como redefinir os pré-tratamentos em que a biomassa é submetida. Dessa maneira, com o método adaptado e utilizando o pré-tratamento na biomassa seca (24 h)/congelada (24 h), alcançou-se 1620,38 µg L⁻¹ sendo 47% mais eficiente do que a metodologia padrão de extração.

Com os resultados alcançados, concluiu-se de forma promissora o desenvolvimento deste trabalho, tendo como alternativa viável a produção de carotenoides microbianos com a aplicação de campos magnéticos e redução do tempo de processo para a obtenção desses biocompostos.

7. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar através de um planejamento experimental a maximização da produção de carotenoides pela levedura *Phaffia rhodozyma* sob influência de diferentes intensidades de campos magnéticos em meio YM;
- Utilizar de coprodutos agroindustriais como fonte alternativa de carbono para avaliar a produção de carotenoides por *P. rhodozyma* sob a ação de campos magnéticos;
- Avaliar a maximização da produção de carotenoides por meio de planejamento experimental levando em consideração a aplicação de LEDs e campos magnéticos em cultivos com *P. rhodozyma*.
- Estudar métodos de extração verdes para a recuperação e aplicação de carotenoides microbianos em produtos alimentícios e/ou farmacêuticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-TURKI, A. I.; AL-HASSAN, A. A.; ABDEL-RAZIK, M. M. Isolation and characterization of carotenoid producing yeasts from Qassim region. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 14, p. 20-23, 2016.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 17 ed. Gaithersburg: AOAC International, 2000.

AUSICH, R. L. Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. **Pure & Applied Chemistry**, v. 69, n. 10, p. 2169-2173, 1997.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. New York: Ed. McGraw-Hill, 1986.

BANZATTO, D.; FREITA, L. A.; MUTTON, M. J. R. Carotenoid production by *Rhodotorula rubra* cultivated in sugarcane juice, molasses, and syrup. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, p. 14-18, 2013.

BARREDO, J.; GARCÍA-ESTRADA, C.; KOSALKOVA, K.; BARREIRO, C. Biosynthesis of astaxanthin as a main carotenoid in the heterobasidiomycetous yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 3, p. 44, 2017.

BAUER, L. M.; COSTA, J. A. V.; ROSA, A. P. C.; SANTOS, L. O. Growth stimulation and synthesis of lipids, pigments and antioxidants with magnetic fields in *Chlorella kessleri* cultivations. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1425–1432, 2017.

BAYRAKTAR, V. N. Magnetic field effect on yeast *Saccharomyces cerevisiae* activity at grape must fermentation. **Biotechnology Acta**, v. 6, n.1, p. 125-137, 2013.

BCC RESEARCH– **The Global Market for Carotenoids**. Disponível em: <https://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/the-global-market-for-carotenoids.html>. Acesso: 08 de Dezembro de 2019.

BERLOT, M.; REHAR, T.; FEFER, D.; BEROVIC, M. The influence of treatment of *Saccharomyces cerevisiae* inoculum with a magnetic field on subsequent grape must fermentation. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 27, n. 4, p. 423-429, 2013.

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

BLASKO, A.; BELAGYI, J.; DERGEZ, T.; ELI, J.; PAPP, G.; PAPP, T.; VAGVOLGYI, C.; PESTI, M. Effect of polar and non-polar carotenoids on *Xanthophyllomyces dendrorhous* membranes by EPR. **European Biophysics Journal**, v. 37, p. 1097-1104, 2008.

BONFIM, T. M. B. **Produção de astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) a partir de meios de cultura de baixo custo**. 158 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 1999.

BONOW, F. **Produção de glutatona por *Saccharomyces cerevisiae* utilizando coproduto industrial e sob ação de campos magnéticos**. 2016. 84 f. Dissertação (Mestrado em

Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2016.

BRKOVIC, S.; POSTIC, S.; ILIC, D. Influence of the field on microorganisms in the oral cavity. **Journal of Applied Oral Science**, v. 23, n. 2, p. 179-186, 2014.

BRUMANO, G. Biotecnologia aplicada ao valor nutricional dos alimentos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 5, n. 6, p.707-721, 2008.

BUZZINI, P.; INNOCENTI, M.; TURCHETTI, B.; LIBKIND, D.; BROOCK, M. V.; MULINACCI, N. Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces* and *Sporidiobolus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 8, p. 1024–1031, 2007.

BUZZINI, P.; MARTINI, A.; GAETANI, M.; TURCHETTI, B.; PAGNONI, U. M.; DAVOLI, P. Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula graminis* DBVPG 7021 as a function of trace element concentration by means of response surface analysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 5-6, p. 687-692, 2005.

CAMPOCOSÍO, A. T. **Pigments from yeast**. In: Yeasts and their products as ingredients in the food industry. Universidad Nacional de Quilmes Editorial, Bernal, 2008.

CANLI, O.; ERDAL, S.; TASKIN, M.; KURBANOGLU, E. B. Effects of extremely low magnetic field on the production of invertase by *Rhodotorula glutinis*. **Toxicology and Industrial Health**, v. 27, p. 35-39, 2011.

CANLI, O.; KURBANOGLU, E. B. Application of low magnetic field on inulinase production by *Geotrichum candidum* under solid state fermentation using leek as substrate. **Toxicology and Industrial Health**, v. 27, p. 1-7, 2011.

CARDOSO, L. A. C.; JÄCKEL, S.; KARP, S. G.; FRAMBOISIER, X.; CHEVALOT, I.; MARC, I. Improvement of *Sporobolomyces ruberrimus* carotenoids production by the use of raw glycerol. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 374-379, 2016.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CHEN, L.; WANG, J. L.; NI, H.; ZHU, M. J. Disruption of *Phaffia rhodozyma* cells and preparation of microencapsulated astaxanthin with high water solubility. **Food Science and Biotechnology**, v.28, p, 111-120, 2018.

CIPOLATTI, E. P. **Obtenção de carotenoides microbianos com atividade antioxidante a partir de coprodutos agroindustriais**. 2012. 138 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

CIPOLATTI, E. P.; REMEDI, R. D.; SÁ, C. S.; RODRIGUES, A. B.; RAMOS, J. M. G.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. Use of agroindustrial byproducts as substrate for production of carotenoids with antioxidant potential by wild yeasts. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 20, n. 101208, 2019.

- CIPOLATTI, E.; BULSING, B.; SÁ, C. S.; BURKERT, C. A. V.; FURLONG, E. B.; BURKERT, J. F. M. Carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: Antioxidant activity and stability of extracts. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 1982-1988, 2015.
- COLET, R.; DI LUCCIO, M.; VALDUGA, E. Fed-batch production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636): Kinetic and stoichiometric parameters. **European Food Research & Technology**, v. 240, p. 173-182, 2015.
- DAVIOLI, P.; MIERAU, V.; WEBER, R. W. S. Carotenoids and fatty acids in red yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 392-397, 2004.
- DEAMICI, K. M.; CARDIAS, B. B.; COSTA, J. A. V.; SANTOS, L.O. Static magnetic fields in culture of *Chlorella fusca*: Bioeffects on growth and biomass composition. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 7, p. 912-916, 2016.
- DEAMICI, K. M.; COSTA, J. A. V.; SANTOS, L. O. Magnetic fields as triggers of microalga growth: Evaluation of its effect on *Spirulina* sp. **Bioresource Technology**, v. 220, p. 62-67, 2016.
- DEAMICI, K. M.; CUELLAR-BERMUDEZ, S.P.; MUYLAERT, K.; SANTOS, L. O.; COSTA, J. A.V. Quantum yield alterations due to the static magnetic fields action on *Arthrospira platensis* SAG 21.99: Evaluation of photosystem activity. **Bioresource Technology**, v. 292, p. 121945, 2019.
- DEAMICI, K. M.; SANTOS, L. O.; COSTA, J. A. V. Use of static magnetic fields to increase CO₂ biofixation by the microalga *Chlorella fusca*. **Bioresource Technology**, v. 276, p. 103-109, 2019.
- DEAMICI, K. M.; SANTOS, L. O.; COSTA, J. A.V. Magnetic field action on outdoor and indoor cultures of *Spirulina*: Evaluation of growth, medium consumption and protein profile. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 168-174, 2018.
- DEUTMEYER, A.; RAMAN, R.; MURPHY, P.; PANDEY, S. Effect of magnetic field on the fermentation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 2, p. 207-213, 2011.
- DINI, L.; ABRRO, L. Bioeffects of moderate intensity static magnetic field on cell cultures. **Micron**, v. 36, p. 196-217, 2005.
- DOBŠINSKÝ, J.; JEDLIČKA, J. Biological effect of magnetic field on the fermentation of wine. **Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences**, v. 11, n. 1, p. 575-579, 2017.
- DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA, A. R.; TORRES-MUÑOZ, J. A. Astaxanthin hyperproduction by *Phaffia rhodozyma* (now *Xanthophyllomyces dendrorhous*) with raw coconut milk as sole source of energy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, p. 249-252, 2004.
- FILIPIC, J.; KRAIGHER, B.; TEPUS, B.; KOKOL, V.; MANDIC-MULEC, I. Effects of low-density static magnetic fields on the growth and activities of wastewater bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. **Bioresource Technology**, v. 120, p. 225-232, 2012.

FOLOGEA, D.; VASSU-DIMOV, T.; STOICA, I.; CSUTAK, O.; RADU, M. Increase of *Saccharomyces cerevisiae* plating efficiency after treatment with bipolar electric pulses. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 46, n. 2, p. 285-287, 1998.

FONSECA, R. A. S.; RAFAEL, R. S.; KALIL, S. J.; BURKERT, A. V. BURKERT, J. F. M. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 7, p. 1165-1171, 2011.

FOOD AND DRUG REGULATION. **List of Acts and Regulations**. Disponível em: <https://www.inspection.gc.ca/about-the-cfia/acts-and-regulations/list-of-acts-and-regulations/eng/1419029096537/1419029097256>, Department of justice, Canada, 2005. Acesso: 18 de Dezembro de 2019.

FRAZREB, M.; SIEMANN-HERZBERG, M.; HOBLEY, T. J.; THOMAS, O. R. T. Protein purification using magnetic adsorbent particles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 5, p. 505-516, 2006.

FRENGOVA, G. I.; BESHKOVA, D. M. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: Yeasts of biotechnological importance. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 163-180, 2009.

GAO, M.; ZHANG, J.; FENG, H. Extremely low frequency magnetic field effects on metabolite of *Aspergillus niger*. **Bioelectromagnetics**, v. 32, p.73-78, 2011.

GASMALLA, M. A. A.; YANG, R.; NIKOO, M.; MAN, S. Production of ethanol from sudanese sugar cane molasses and evaluation of its quality. **Journal of Food Processing and Technology**, v. 3, n. 7, p. 1-3, 2012.

GECIOVA, J.; BURY, D.; JELEN, P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry - a review. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 541-553, 2002.

GÓMEZ-LUNA, L.; MENÉNDEZ, J.; ÁLVAREZ, I.; FLORES, I. Efecto de diferentes protocolos de aplicación de un campo magnético (0.03T) sobre el crecimiento, viabilidad y composición pigmentaria de *Haematococcus pluvialis* en suficiencia y ausencia de nitrógeno. **Biología Vegetal**, v. 9, n. 2, p. 105-118, 2009.

GOODMAN, R.; BLANK, M. Biosynthetic stress response in cells exposed to electromagnetic fields. **Advances in Chemistry**, v. 250, p. 423-436, 1995.

GOUVEIA, L.; RAYMUNDO, A.; BATISTA, A.P.; SOUSA, I.; EMPIS, J. *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as coloring and antioxidant in food emulsions. **European Food Research and Technology**, v. 222, p. 362-367, 2006.

GRANADO-LORENCIO, F.; BLANCO-NAVARRO, I.; PÉREZ-SACRISTÁN, B.; HERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, E. Biomarkers of carotenoid bioavailability. **Food Research International**, v. 99, p. 902-916, 2017.

HRISTOV, J.; PEREZ, V. H. Critical analysis of data concerning *Saccharomyces cerevisiae* free-cell proliferations and fermentations assisted by magnetic and electromagnetic fields. **International Review of Chemical Engineering**, v. 3, p. 1-18, 2011.

- HUNT, R. W.; ZAVALIN, A.; BHATNAGAR, A.; CHINNASAMY, S.; DAS, K. C. Electromagnetic biostimulation of living cultures for biotechnology, biofuel and bioenergy applications. **Internacional Journal of Molecular Science**, v. 10, p. 4719–4722, 2009.
- JOHNSON, E. A.; GIL- HWAN, A. N. Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Microbiology and Serology**, v. 57, p. 191-202, 1991.
- KLEIN, M.; SWINNEN, S.; THEVELEIN, J. M.; NEVOIGT, E. Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: Established knowledge and ambiguities. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 878–893, 2017.
- KUSDIYANTINI, E.; GAUDIN, P.; GOMA, G.; BLANC, P. J. Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 20, n.10, p. 929-934, 1998.
- KTHIRI, A.; HIDOURI, S.; WIEM, T.; JERIDI, R.; SHEEHAN, D.; LANDOULS, A. Biochemical and biomolecular effects induced by a static magnetic field in *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence for oxidative stress. **Plos One**, v. 14, n. 209843, 2019.
- LIU, Y. S.; WU, J. Y. Optimization of cell growth and carotenoid production of *Xanthophyllomyces dendrorhous* through statistical experimental design. **Biochemical Engineering Journal**, v. 36, p. 182-189, 2007.
- LOPES, N. A. **Recuperação de carotenoides microbianos por diferentes técnicas de ruptura celular**. 2014. 96f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, 2014.
- LOPES, P. **Influência de campos magnéticos em fermentação alcoólica descontínua**. 2008. 124f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, 2008.
- MALDONADE, I. R. **Produção de carotenoides por leveduras**. 2003. 141 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
- MALDONADE, I. R.; SCAMPARINI, A. R. P.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38 p. 65-70, 2007.
- MALISORN, C.; SUNTORNSUK, W. Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM 28 in fermented radish brine. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 7, p. 2281–2287, 2008.
- MARGALITH, P. Z. Production of ketocarotenoids by microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 431-438, 1999.
- MATA-GÓMEZ, L. C.; MONTANEZ, J. C.; MÉNDEZ-SAVALA, A.; AGUILAR, C. N. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: An overview. **Microbial Cell Factories**, v. 13, p. 13-23, 2014.
- MAY, A. E.; SNOUSSI, S. Effects of static magnetic field on cell growth, viability, and differential gene expression in *Salmonella*. **Foodborne**, v. 6, p. 547-552, 2009.

- MESQUITA, G. F.; TORQUILHO, H. S. O uso dos carotenoides para promoção da saúde. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v. 8, n. 2, p. 1-28, 2016.
- MESQUITA, S. S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; SERVULO, E. F. C. Carotenoides: Propriedades, aplicações e mercado. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, p. 672-688, 2017.
- MEZZOMO, N.; FERREIRA, S. R. S. Carotenoids functionality, sources, and processing by supercritical technology: A Review. **Journal of Chemistry**, v. 16, p. 1-16, 2016.
- MICHELON, M.; BORBA, T. M.; RAFAEL, R. S.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. Extraction of carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: A comparison between different techniques of cell disruption. **Food Science and Biotechnology (Seoul)**, v. 21, p. 1-8, 2012.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-429, 1959.
- MILLER, M. W.; YONEYAMA, M.; SONEDA, M. *Phaffia*, a new yeast genus in the *Deuteromycotina (Blastomycetes)*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 26, n. 2, p. 286-291, 1976.
- MONKS, L. M.; RIGO, A.; MAZUTTI, M. A.; VLADIMIR, J. O.; VALDUGA, E. Use of chemical, enzymatic and ultrasound-assisted methods for cell disruption to obtain carotenoides. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 165-169, 2013.
- MOTA, M. M. P.; ZUNIGA, A. D. G.; PINEDO, A. A.; CARREIRO, S. C. Desacidificação do óleo de babaçu (*Orbignya phalerata* mart.) pelo processo de extração líquido-líquido visando seu uso na produção de biodiesel. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, n.11, p. 1-13, 2010.
- MOTTA, M. A. MUNIZ, J. B. F.; SCHULER, A.; MOTTA, M. Static magnetic fields enhancement of *Saccharomyces cerevisiae* ethanolic fermentation. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 393-396, 2004.
- MUNIZ, J. B.; MARCELINO, M.; MOTTA, M.; SCHULER, A.; MOTTA, M. A. Influence of static magnetic fields on *Saccharomyces cerevisiae* biomass growth. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 515-520, 2007.
- NAGY, P.; FISCHL, G. Effect of static magnetic field on growth and sporulation of some plant pathogenic fungi. **Bioelectromagnetics**, v. 25, p. 316-318, 2004.
- NI, H.; CHEN, Q.; HE, G.; WU, G.; YANG, Y. Optimization of acidic extraction of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Zhejiang University**, v. 9, n. 1, p. 51-59, 2008.
- NOGUEIRA, M. B. **Encapsulação e estabilidade de extratos carotenogênicos obtidos por *Phaffia rhodozyma* NRRL Y-17268**. 2017. 161 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2017.
- NOGUEIRA, M. B.; PRESTES, C. F.; BURKERT, J. F. M. Microencapsulation by lyophilization of carotenoids produced by *Phaffia rhodozyma* with soy protein as the encapsulating agent. **Food Science and Technology**, v. 37, p. 1-4, 2017.

NOVÁK, J.; STRASÁK, L.; FOJT, L.; SLANINOVÁ, I.; VETTERL, V. Effects of low frequency magnetic fields on the viability of yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Bioelectrochemistry, v. 70, p. 115-121, 2007.

PENNINCKX, M. J. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stress. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 737-742, 2000.

PONKA, R.; FOKOU, E.; KANSCI, G.; BEAUCHER, E.; PIOT, M.; LEONIL, J.; GAUCHERON, F. Amino acids, major carotenoids and vitamin A activity of some traditional sauces consumed in the Far North Region of Cameroon. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 43, p. 88-95. 2015.

RIOS, D. A. S.; BORBA, T. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, J. F. M. Parboiling wastewater in the maximization of carotenoids bioproduction by *Phaffia rhodozyma*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 39, n. 4, p. 401-410, 2015.

RODRIGUES, T. V. D. **Processos em batelada e batelada alimentada em frascos agitados para produção de carotenoides em meio agroindustrial por *Rhodotorula mucilaginosa***. 2018. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2018.

RODRIGUES, T. V. D.; AMORE, T. D.; TEIXEIRA, E. C.; BURKERT, J. F. M. Carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa* in batch and fed-batch fermentation using agroindustrial byproducts. **Food Technology and Biotechnology**, v. 57, n. 3, p. 388, 2019.

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

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Update on natural food pigments - A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. **Food Research International**, v. 124, p. 200-205, 2019.

RUIZ-GÓMEZ, M. J.; PRIETO-BARCIA, M. I.; RISTORI-BOGAJO, E.; MARTÍNEZMORILLO, M. Static and 50 Hz magnetic fields of 0.35 and 2.45 mT have no effect on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioelectrochemistry**, v. 64, p. 151-155, 2004.

SANDMANN, G. Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis: Strategies, problems and achievements. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 14-17, 2001.

SANTOS, L. O.; ALEGRE, R. M.; GARCIA-DIEGO, C.; CUELLAR, J. Effects of magnetic fields on biomass and glutathione production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1362-1367, 2010.

SANTOS, L. O.; DEAMICI, K. M.; MENESTRINO, B. C.; GARDA-BUFFON, J., COSTA, J. A. V. Magnetic treatment of microalgae for enhanced product formation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 169, 2017.

SANTOS, L. O.; GONZALES, T. A.; ÚBEDA, B. T.; ALEGRE, R. M. Glutathione production using magnetic fields generated by magnets. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 6, p. 921-926, 2012.

SILVA, C. M.; BORBA, T. M.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. Carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* using raw glycerol as an additional carbon source. **International Journal of Food Engineering**, v. 8, n. 4, p. 1-15, 2012.

SILVA, C. M.; BORBA, T. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, J. F. M. Raw glycerol and parboiled rice effluent for carotenoid production: Effect of the composition of culture medium and initial pH. **Food Technology and Biotechnology**, v. 54, p. 489-496, 2016.

SILVA, C.M. **Produção de carotenoides pela levedura *Phaffia rhodozyma* cepa NRRL Y-17268: valoração da glicerina (derivada da síntese do biodiesel) e da água de parboilização do arroz**. 2010. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2010.

SILVA, D. A. **Maximização da produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrohous*) utilizando água de parboilização do arroz**. 2009. 93 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

SILVA, M. B. **Alterações na biossíntese de carotenoides em leveduras induzidas por agentes químicos**. 2004. 134 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

SILVA, M. C. H.; SILVA, L. H. M.; PAGGIOLI, F. J.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A. Sistema aquoso bifásico: uma alternativa eficiente para extração de íons. **Química Nova**, v. 29, p. 1332–1339, 2006.

SOUZA, E. M. M. **Contribuição ao conhecimento do comportamento da flora microbiana em resposta ao condicionamento magnético de águas de irrigação de roseiras**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, 2006.

TAN, L.; SHAO, Y.; MU, G.; NING, S.; SHI, S. Enhanced azo dye biodegradation performance and halotolerance of *Candida tropicalis* SYF-1 by static magnetic field (SMF). **Bioresource Technology**, v. 225, n. 122283, 2019.

TREVAN, M. D.; BOFFEY, S.; GOULDING, K. H.; STANBURY, P. **Biotecnologia: Princípios Biológicos**. Acribia: Zaragoza, 1990.

URNAU, L. **Utilização de resíduos agroindustriais na produção de carotenoides por *Phaffia rhodozyma* Y-17268 em biorreator batelada simples e alimentada**. 2018. 118f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2018.

URNAU, L.; COLET, R.; REATO, P. T.; BURKERT, J. F. M.; RODRIGUES, E.; GOMES, R.; STEFFENS, C. Use of low-cost agro-industrial substrate to obtain carotenoids from *Phaffia rhodozyma* in a bioreactor. **Industrial Biotechnology**, v. 15, p. 25–34, 2019.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; LUCCIO, M. D. Carotenoids production: Microorganisms as source of natural dyes. **Química Nova**, v. 32, p. 2429-2436, 2009.

XIAO, A.; JIANG, X.; NI, H.; YANG, Q.; CAI, H. Study on the relationship between intracellular metabolites and astaxanthin accumulation during *Phaffia rhodozyma* fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, p. 148-153, 2015.

WAGNER, J. R.; RAMBLA, M. A. O.; LEGARRETA, I. G. **Las levaduras y sus productos derivados como ingredientes en la industria de alimentos**. 1ª ed. Bernal: Universidad Nacional de Quilmes, 2008.

YANG, G. J.; WANG, J.; MEI, Y.; LUAN, Z. Effect of magnetic field on protein and oxygen production of *Chorella vulgaris*. **Mathematics for Physical Science and Engineering**, v. 9, p. 116-126, 2011.

ZAPATA, J. E.; MORENO, G.; MÁRQUEZ, E. J. Efectos de los campos magnéticos sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*. **Interciencia**, v. 27, p. 544- 550, 2002.

ZENI, J. **Screening de micro-organismos produtores de carotenoides e polilacturonases**. 2009. 131 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2009.

ZHANG, J.; LI, Q. R.; ZHANG, M. H.; YOU, Y.; WANG, Y.; WANG, Y. H. Enhancement of carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma* PR106 under stress conditions. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 83, p. 1–11, 2019b.

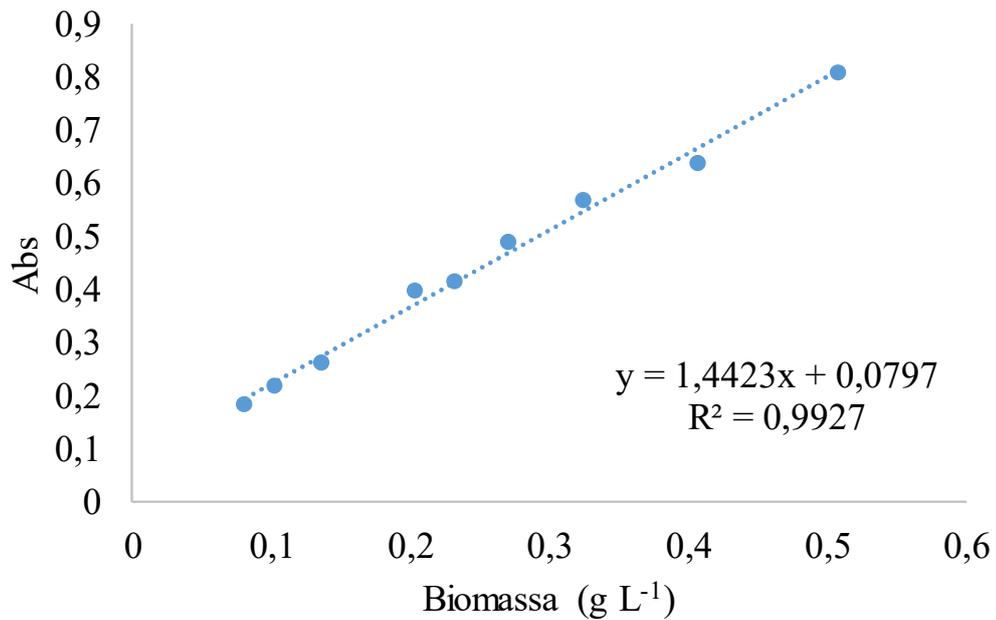
ZHANG, J.; ZENG, D.; XU, C.; GAO, M. Effect of low-frequency magnetic field on formation of pigments of *Monascus purpureus*. **European Food Research and Technology**, v. 240, p. 577–582, 2014a.

ZHANG, J.; ZHOU, K.; WANG, L.; GAO, M. Extremely low frequency magnetic fields affect pigment production of *Monascus purpureus* in liquid state fermentation. **European Food Research and Technology**, v. 238, p. 157-162, 2014b.

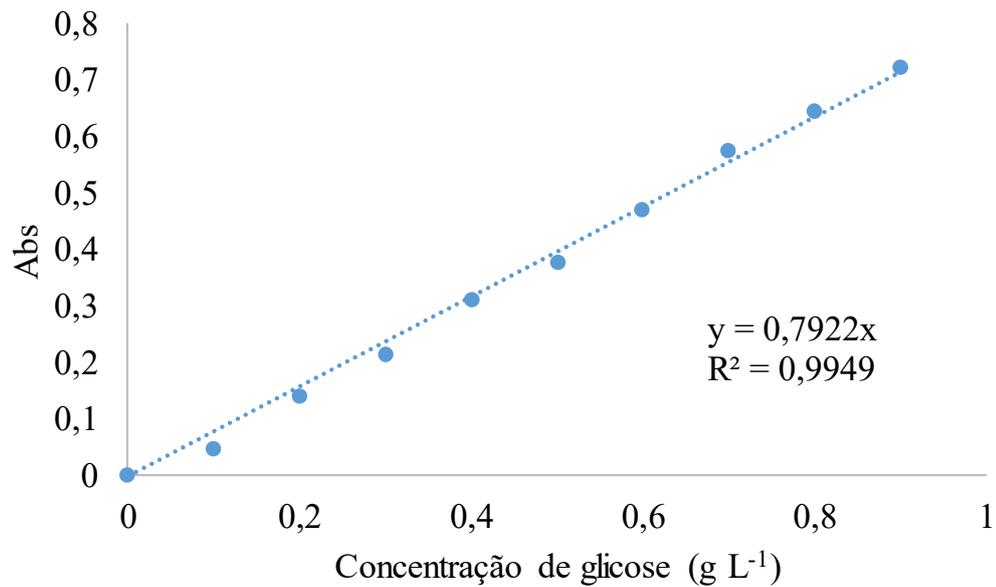
APÊNDICE 1

Neste apêndice são apresentadas as curvas padrões de biomassa e de glicose, utilizadas para a determinação da concentração de biomassa (item 4.3.1) e determinação de açúcares redutores totais (item 4.3.4).

Curva padrão de biomassa para a levedura *Phaffia rhodozyma*.



Curva padrão de glicose.



APÊNDICE 2

Neste apêndice são apresentados os acompanhamentos cinéticos de forma quantitativa dos ensaios controle e com os diferentes tempos de aplicação de CM, descritos no item 4.3. São mostrados os resultados obtidos para os valores de pH, concentração de biomassa (g L^{-1}), concentração de açúcares redutores totais (ART), concentração de carotenoides específicos ($\mu\text{g g}^{-1}$) e concentração de carotenoides volumétricos ($\mu\text{g L}^{-1}$).

Ensaio controle (sem aplicação de CM)					
Tempo (h)	pH	Biomassa (g L^{-1})	Glicose (g L^{-1})	Carotenoides Específicos ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Carotenoides Volumétricos ($\mu\text{g L}^{-1}$)
0	5,77±0,02	0,15±0,01	10,54±0,42	-	-
24	4,88±0,04	2,89±0,10	7,21±0,25	3,51±0,25	9,61±0,29
48	5,70±0,57	4,64±0,51	1,50±0,10	56,31±4,46	268,15±53,14
72	6,66±0,09	7,10±0,44	0,79±0,04	64,02±3,73	455,34±36,09
96	7,42±0,03	6,37±0,04	0,58±0,05	120,02±6,62	767,29±38,74
120	7,49±0,10	5,53±0,03	0,56±0,03	137,52±7,28	761,08±41,01
144	7,74±0,06	5,18±0,30	0,52±0,07	156,80±16,41	811,13±29,86
168	8,10±0,03	5,07±0,06	0,45±0,02	62,67±4,59	327,89±20,22

Ensaio CM 0-24 (CM aplicado de 0-24 h)					
Tempo (h)	pH	Biomassa (g L^{-1})	Glicose (g L^{-1})	Carotenoide Específicos ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Carotenoides Volumétricos ($\mu\text{g L}^{-1}$)
0	5,50±0,10	0,21±0,02	11,58±0,39	-	-
24	4,55±0,11	3,39±0,39	6,27±0,58	22,96±1,39	78,70±3,33
48	6,24±0,18	5,21±0,05	1,99±0,26	56,61±5,93	306,30±5,01
72	6,61±0,06	5,29±0,04	0,60±0,14	74,28±10,87	390,92±68,13
96	6,71±0,04	6,32±0,31	0,46±0,05	83,99±7,34	558,65±71,14
120	6,96±0,06	5,97±0,46	0,40±0,10	110,79±13,60	623,50±63,66
144	7,04±0,26	5,91±0,21	0,38±0,04	107,24±26,05	683,01±36,54
168	7,33±0,46	5,39±0,37	0,34±0,03	82,46±1,42	451,08±40,60

Ensaio CM 24-48 (CM aplicado de 24-48 h)					
Tempo (h)	pH	Biomassa (g L⁻¹)	Glicose (g L⁻¹)	Carotenoides Específicos (µg g⁻¹)	Carotenoides Volumétricos (µg L⁻¹)
0	5,54±0,05	0,20±0,02	11,52±0,22	-	-
24	4,44±0,15	3,14±0,18	8,25±0,91	14,68±1,49	45,33±5,74
48	5,63±0,34	5,73±0,51	2,41±0,24	66,03±4,41	380,41±51,40
72	6,72±0,02	6,07±0,37	0,46±0,24	106,63±3,17	648,10±57,59
96	6,93±0,10	6,22±0,24	0,41±0,31	117,48±17,62	650,84±82,93
120	7,17±0,25	6,05±0,25	0,37±0,12	134,30±4,22	835,69±33,56
144	7,27±0,33	5,74±0,38	0,32±0,10	83,52±1,97	473,77±48,50
168	7,58±0,31	5,49±0,37	0,30±0,05	78,57±4,01	433,99±31,58

Ensaio CM 48-72 (CM aplicado de 48-72 h)					
Tempo (h)	pH	Biomassa (g L⁻¹)	Glicose (g L⁻¹)	Carotenoides Específicos (µg g⁻¹)	Carotenoides Volumétricos (µg L⁻¹)
0	6,04±0,03	0,13±0,0	10,12±0,56	-	-
24	4,78±0,10	3,20±0,20	6,99±0,29	28,56±1,57	82,54±7,29
48	6,18±0,18	5,99±0,07	0,65±0,12	78,19±3,38	361,81±26,39
72	6,56±0,05	6,62±0,29	0,55±0,06	80,50±2,96	571,95±43,38
96	6,87±0,02	5,93±0,37	0,47±0,03	86,72±4,49	552,65±22,18
120	7,33±0,08	5,43±0,20	0,43±0,04	100,36±6,99	552,10±26,97
144	7,39±0,11	5,37±0,03	0,40±0,03	74,16±5,54	385,95±16,90
168	7,84±0,12	4,98±0,33	0,39±0,19	75,82±3,96	385,07±26,90

Ensaio CM 72-96 (CM aplicado de 72-96 h)					
Tempo (h)	pH	Biomassa (g L⁻¹)	Glicose (g L⁻¹)	Carotenoides Específicos (µg g⁻¹)	Carotenoides Volumétricos (µg L⁻¹)
0	6,12±0,07	0,10±0,01	10,79±0,63	-	-
24	4,81±0,20	3,48±0,18	6,56±0,31	34,67±6,50	126,04±23,11
48	6,30±0,03	6,05±0,27	0,56±0,12	80,01±3,14	484,97±17,48
72	6,70±0,15	6,37±0,17	0,54±0,02	89,74±6,87	650,52±33,54
96	6,79±0,02	6,79±0,10	0,52±0,07	95,20±5,54	631,05±80,04
120	7,26±0,03	5,52±0,12	0,46±0,01	124,55±9,66	718,61±50,57
144	7,67±0,04	5,26±0,39	0,41±0,03	81,28±9,47	465,39±69,38
168	7,69±0,03	5,16±0,40	0,30±0,04	88,82±3,60	453,23±42,89

Ensaio CM 96-120 (CM aplicado de 96-120 h)					
Tempo (h)	pH	Biomassa (g L⁻¹)	Glicose (g L⁻¹)	Carotenoides Específicos (µg g⁻¹)	Carotenoides Volumétricos (µg L⁻¹)
0	5,77±0,04	0,18±0,01	11,30±0,19	-	-
24	4,65±0,02	2,64±0,18	6,62±0,14	15,54±1,23	41,21±5,68
48	6,49±0,10	6,28±0,44	1,37±0,03	31,85±1,31	200,41±9,07
72	6,63±0,05	5,57±0,37	0,52±0,15	69,65±17,17	416,20±133,74
96	6,93±0,10	6,23±0,66	0,47±0,32	93,20±2,68	590,74±43,78
120	7,32±0,03	6,00±0,37	0,39±0,03	54,29±7,63	341,08±27,39
144	7,10±0,33	5,90±0,28	0,39±0,30	139,05±7,94	822,16±77,64
168	7,04±0,05	5,80±0,53	0,37±0,03	163,76±26,86	976,58±49,88

Ensaio CM 120-144 (CM aplicado de 120-144 h)					
Tempo (h)	pH	Biomassa (g L⁻¹)	Glicose (g L⁻¹)	Carotenoides Específicos (µg g⁻¹)	Carotenoides Volumétricos (µg L⁻¹)
0	5,82±0,03	0,19±0,1	11,10±0,31	-	-
24	4,66±0,10	2,87±0,25	7,02±0,25	15,89±0,48	50,20 ±11,05
48	6,42±0,01	6,11±0,32	1,12±0,12	37,34±1,45	228,43±16,88
72	6,63±0,03	6,75±0,29	0,56±0,03	71,87±5,95	460,67±45,38
96	6,76±0,01	6,48±0,05	0,43±0,08	99,26±1,18	643,82±8,83
120	7,29±0,02	6,12±0,24	0,41±0,04	76,85±8,18	477,04±60,17
144	7,06±0,32	5,92±0,63	0,38±0,02	90,13±3,97	474,06±39,05
168	7,01±0,02	6,25±0,16	0,39±0,02	148,47±36,20	903,63±74,65

Ensaio CM 144-168 (CM aplicado de 144-168 h)					
Tempo (h)	pH	Biomassa (g L⁻¹)	Glicose (g L⁻¹)	Carotenoides Específicos (µg g⁻¹)	Carotenoides Volumétricos (µg L⁻¹)
0	5,84±0,02	0,18±0,02	11,21±0,38	-	-
24	4,65±0,08	2,94±0,13	7,14±0,11	13,49±4,40	34,21±6,42
48	6,47±0,18	6,46±0,09	1,27±0,15	37,18±3,26	240,29±19,39
72	6,76±0,12	6,37±0,33	0,52±0,05	67,49±4,06	424,70±31,65
96	6,88±0,02	6,09±0,12	0,44±0,02	93,62 ±5,53	570,81±34,61
120	7,34±0,02	5,76±0,37	0,42±0,01	74,39±4,41	435,36±20,63
144	7,07±0,03	6,26±0,24	0,39±0,01	95,31±19,47	867,93±37,72
168	6,98±0,02	6,54±0,38	0,40±0,02	136,17±10,90	890,55±61,44

Ensaio CM 0-168 (CM aplicado de 0-168 h)					
Tempo (h)	pH	Biomassa (g L⁻¹)	Glicose (g L⁻¹)	Carotenoides Específicos (µg g⁻¹)	Carotenoides Volumétricos (µg L⁻¹)
0	5,76±0,02	0,15±0,00	10,91±0,15	-	-
24	4,77±0,02	3,65±0,14	8,73±0,19	9,78±0,82	38,09±2,06
48	6,90±0,05	6,06±0,04	1,54±0,15	82,54±1,81	500,45±13,37
72	6,99±0,05	7,23±0,33	0,66±0,02	102,97±2,79	745,01±15,15
96	7,43±0,06	6,63±0,06	0,47±0,03	167,66±22,21	1189,81±26,18
120	7,67±0,10	5,77±0,04	0,44±0,02	159,81±18,31	946,63±9,11
144	7,77±0,11	5,70±0,34	0,41±0,01	153,35±12,36	871,30±27,70
168	8,12±0,02	5,15±0,31	0,39±0,01	87,15±4,96	450,11±25,45

APÊNDICE 3

Neste apêndice são apresentados os resultados para a concentração de biomassa (g L^{-1}), concentração de carotenoides específicos ($\mu\text{g g}^{-1}$) e concentrações de carotenoides volumétricos ($\mu\text{g L}^{-1}$) comparando estatisticamente ao nível de confiança de 95 % em função do tempo de cultivo, os ensaios controle e com diferentes tempos de aplicação de CM.

Tempo (h)	Concentração de biomassa (g L^{-1})								
	Controle	CM 0-24	CM 24-48	CM 48-72	CM 72-96	CM 96-120	CM 120-144	CM 144-168	CM 0-168
0	0,15±0,01 ^{cd}	0,21±0,02 ^a	0,20±0,02 ^{ab}	0,13±0,0 ^{de}	0,10±0,01 ^c	0,18±0,01 ^{bc}	0,19±0,10 ^{ab}	0,18±0,02 ^{abc}	0,15±0,00 ^{cd}
24	2,89±0,10 ^{de}	3,39±0,39 ^{abc}	3,14±0,18 ^{bcd}	3,20±0,20 ^{abcd}	3,48±0,18 ^{ab}	2,64±0,18 ^c	2,87±0,25 ^{de}	2,94±0,13 ^{cde}	3,65±0,14 ^a
48	4,64±0,51 ^c	5,21±0,05 ^{bc}	5,73±0,51 ^{ab}	5,99±0,07 ^{ab}	6,05±0,27 ^{ab}	6,28±0,44 ^a	6,11±0,32 ^{ab}	6,46±0,09 ^a	6,06±0,04 ^{ab}
72	7,10±0,44 ^a	5,53±0,04 ^b	6,07±0,37 ^{ab}	6,62±0,29 ^{ab}	6,37±0,17 ^{ab}	5,57±0,96 ^b	6,75±0,29 ^{ab}	6,37±0,33 ^{ab}	7,23±0,33 ^a
96	6,37±0,04 ^{ab}	6,32±0,31 ^{ab}	6,22±0,24 ^{ab}	5,93±0,37 ^b	6,79±0,10 ^a	6,23±0,66 ^{ab}	6,48±0,05 ^{ab}	6,09±0,12 ^{ab}	6,63±0,06 ^{ab}
120	5,53±0,18 ^a	5,97±0,46 ^a	6,05±0,25 ^a	5,43±0,20 ^a	5,52±0,12 ^a	6,00±0,37 ^a	6,12±0,24 ^a	5,76±0,37 ^a	5,77±0,04 ^a
144	5,18±0,30 ^b	5,91±0,21 ^{ab}	5,74±0,38 ^{ab}	5,37±0,03 ^{ab}	5,26±0,39 ^{ab}	5,90±0,28 ^{ab}	5,92±0,63 ^{ab}	6,26±0,24 ^a	5,70±0,34 ^{ab}
168	5,07±0,06 ^c	5,39±0,37 ^{bc}	5,49±0,37 ^{bc}	4,98±0,33 ^c	5,16±0,40 ^{bc}	5,80±0,53 ^{bc}	6,25±0,16 ^a	6,54±0,38 ^a	5,15±0,31 ^c

Concentração de carotenoides específicos ($\mu\text{g g}^{-1}$)									
Tempo (h)	Controle	CM 0-24	CM 24-48	CM 48-72	CM 72-96	CM 96-120	CM 120-144	CM 144-168	CM 0-168
24	3,51±0,25 ^e	22,96±1,39 ^{bc}	14,68±1,49 ^{cd}	28,56±1,57 ^{ab}	34,67±6,50 ^a	15,54±1,23 ^{cd}	15,89±0,48 ^{cd}	13,49±4,40 ^{de}	9,78±0,82 ^{de}
48	56,31±4,46 ^c	56,61±5,93 ^{bc}	66,03±4,41 ^b	78,19±3,38 ^a	80,01±3,14 ^a	31,85±1,31 ^d	37,34±1,45 ^d	37,18±3,26 ^d	82,54±1,81 ^a
72	64,02±3,73 ^c	74,28±10,87 ^{bc}	106,63±3,17 ^a	80,50±2,96 ^{bc}	89,74±6,87 ^{ab}	69,65±17,17 ^{bc}	71,87±5,95 ^{bc}	67,49±4,06 ^c	102,97±2,79 ^{a9}
96	120,02±6,62 ^b	83,99±7,34 ^c	117,48±17,62 ^b	86,72±4,49 ^c	95,20±5,54 ^{bc}	93,20±2,68 ^{bc}	99,26±1,18 ^{bc}	93,62 ±5,53 ^{bc}	167,66±22,21 ^a
120	137,52±7,28 ^b	110,79±13,60 ^c	134,30±4,22 ^b	100,36±6,99 ^{cd}	124,55±9,66 ^{bc}	54,29±7,63 ^e	76,85±8,18 ^{de}	74,39±4,41 ^e	163,96±11,14 ^a
144	156,80±16,41 ^a	107,24±26,05 ^{bc}	83,52±1,97 ^d	74,16±5,54 ^d	81,28±9,47 ^d	139,05±7,94 ^{ab}	90,13±3,97 ^{cd}	95,31±19,47 ^{cd}	153,35±12,36 ^a
168	62,67±4,59 ^c	82,46±1,42 ^b	78,57±4,01 ^{bc}	75,82±3,96 ^{bc}	88,82±3,60 ^b	163,76±26,86 ^a	148,47±36,20 ^a	136,17±10,90 ^a	87,15±4,96 ^b

Concentração de carotenoides volumétricos ($\mu\text{g L}^{-1}$)									
Tempo (h)	Controle	CM 0-24	CM 24-48	CM 48-72	CM 72-96	CM 96-120	CM 120-144	CM 144-168	CM 0-168
24	9,61±0,29 ^c	78,70±3,33 ^{bc}	45,33±5,74 ^d	82,54±7,29 ^b	126,04±23,11 ^a	41,21±5,68 ^d	50,20 ±11,05 ^{cd}	34,21±6,42 ^{de}	38,09±2,06 ^{de}
48	268,15±53,14 ^{de}	306,30±5,01 ^{cd}	380,41±51,40 ^b	361,81±26,39 ^{bc}	484,97±17,48 ^a	200,41±9,07 ^c	228,43±16,88 ^c	240,29±19,39 ^{de}	500,45±13,37 ^a
72	455,34±36,09 ^c	390,92±68,13 ^c	648,10±57,59 ^{ab}	571,95±43,38 ^{abc}	650,52±33,54 ^{ab}	416,20±133,74 ^c	460,67±45,38 ^{bc}	424,70±31,65 ^c	745,01±15,15 ^a
96	767,29±38,74 ^b	558,65±71,14 ^c	650,84±82,93 ^{bc}	552,65±22,18 ^c	631,05±80,04 ^{bc}	590,74±43,78 ^c	643,82±8,83 ^{bc}	570,81±34,61 ^c	1189,81±26,18 ^a
120	761,08±41,01 ^{bc}	623,50±63,66 ^{cd}	835,69±33,56 ^{ab}	552,10±26,97 ^{de}	718,61±50,57 ^{bc}	341,08±27,39 ^f	477,04±60,17 ^{de}	435,36±20,63 ^e	946,63±9,11 ^a
144	811,13±29,86 ^{ab}	683,01±36,54 ^b	473,77±48,50 ^c	385,95±16,90 ^c	465,39±69,38 ^c	822,16±77,64 ^{ab}	474,06±39,05 ^c	967,93±37,72 ^a	871,30±27,70 ^a
168	327,89±20,22 ^c	451,08±40,60 ^b	433,99±31,58 ^{bc}	385,07±26,90 ^{bc}	453,23±42,89 ^b	976,58±49,88 ^a	903,63±74,65 ^a	890,55±61,44 ^a	450,11±25,45 ^b