

Análise, por CLAE, de carotenóides de cinco linhagens de *Rhodotorula*

Fabio M. Squina, Adriana Z. Mercadante*

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas

*Um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi otimizado para a análise da composição de carotenóides de cinco linhagens de *Rhodotorula*. A extração com ruptura mecânica da parede celular da levedura com areia tratada mostrou ser mais eficiente que a ruptura química com dimetilsulfóxido. Os carotenóides foram separados e quantificados por CLAE em coluna de C_{18} utilizando como fase móvel acetonitrila/metanol (0,1% trietilamina)/acetato de etila (75:15:10) e 100% metanol (0,1% trietilamina) entre as injeções, com vazão de 1 mL/min. Em todas as linhagens, os carotenóides majoritários encontrados foram torularrodina, toruleno, γ -caroteno e β -caroteno. Os teores totais de carotenóides, em $\mu\text{g/g}$, foram de 251,7 em *R. glutinis*, 123,5 em *R. rubra*, 113,2 em *R. araucariae*, 105,8 em *R. lactosa* e de 103,7 em *R. minuta*.*

Unitermos:

- Carotenóides
- *Rhodotorula*
- CLAE

*Correspondência:

A. Z. Mercadante
Departamento de Ciência de Alimentos
Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6121
13083-970 – Campinas - SP
E-mail: azm@fea.unicamp.br

INTRODUÇÃO

Os carotenóides compõem um grupo de pigmentos naturais amplamente distribuídos na natureza com grande diversidade de estruturas e funções. Estes compostos têm sido amplamente utilizados como corantes nas indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética e de rações.

O interesse por carotenóides tem aumentado nos últimos anos devido à sua comprovada atividade pró-vitamínica A e pela evidência de outras propriedades biológicas, tais como atividades imunomoduladoras, anticarcinogênicas, prevenção de degeneração macular e de doenças cardiovasculares (Krinsky, 1994). Além disso, o mercado de corantes naturais tem se mostrado muito promissor, devido à tendência em se evitar alimentos que contenham aditivos artificiais. Os carotenóides também são fonte de pigmentação de peixes e crustáceos, sendo

este, atualmente, o setor agropecuário com maior crescimento (Meyers, 1994; Johnson, Schroeder, 1995).

Existem vários fatores que dificultam a obtenção de dados confiáveis sobre a composição de carotenóides. Por apresentarem um longo sistema de ligações duplas conjugadas com elétrons π deslocalizados, os carotenóides são altamente reativos e conseqüentemente instáveis. Além disso, número variado de carotenóides com estruturas muito diferentes pode ser encontrado em um único microrganismo. Devido a estas razões, a análise cromatográfica deste tipo de amostra é considerada complexa (Kester, 1984).

A separação dos carotenóides de *Rhodotorula* através de partição (Peterson *et al.*, 1958) ou cromatografia em coluna aberta de MgO/Hyflsuperpel (Peterson *et al.*, 1958; Simpson *et al.*, 1964; Hayman *et al.*, 1974) seguida de quantificação pelos espectros na região do visível foi

realizada em alguns trabalhos nas décadas de 60 e 70. Atualmente, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem se mostrado o método de escolha para separação e quantificação de carotenóides. Como existem poucos padrões de carotenóides disponíveis comercialmente, somente em um estudo (Nam *et al.*, 1988) foi utilizada padronização externa por CLAE para quantificar os principais carotenóides de *Rhodotorula*. Para contornar esta dificuldade outras alternativas têm sido utilizadas, como a determinação do total de carotenóides espectrofotometricamente (Martelli *et al.*, 1990; Martelli, Silva, 1993; Martin *et al.*, 1993; Shih, Hang, 1996), das porcentagens relativas dos principais pigmentos por CLAE (Frengova *et al.*, 1994, 1995; Buzzini, Martini, 1999) ou da quantidade de β -caroteno (Perrier *et al.*, 1995).

Outra dificuldade encontrada está relacionada ao fato dos carotenóides nos microrganismos estarem localizados na parede celular, requisitando o isolamento da biomassa celular para posterior extração dos pigmentos por solventes orgânicos. A rigidez da parede celular de leveduras limita a extratibilidade dos carotenóides, sendo necessária a aplicação de métodos mecânicos (Simpson *et al.*, 1964; Haard, 1988; Nam *et al.*, 1988), químicos (Sedmak *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1993) ou enzimáticos (Johnson *et al.*, 1978; Okagbue, Lewis, 1984) para recuperação desses pigmentos.

O objetivo deste trabalho foi a otimização de um método analítico para a determinação por CLAE da composição de carotenóides de leveduras *Rhodotorula*. O método foi utilizado para determinar a composição de carotenóides de cinco linhagens deste gênero.

MATERIAL E MÉTODOS

Manutenção das Linhagens e Condições de Cultivo dos Microrganismos

As linhagens da levedura *Rhodotorula glutinis* (CCT 2186), *R. minuta* (CCT 2187), *R. araucariae* (CCT 2123) e *R. lactosa* (CCT 2057) foram cedidas pela Fundação Tropical de Pesquisas "André Tosello". A linhagem de *R. rubra* foi obtida da coleção do Laboratório de Toxinas Microbianas da Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP. Todas as cepas foram mantidas por repiques mensais em meios inclinados em tubos de ensaio contendo meio YM (Difco).

Para preparação do inóculo, frascos erlenmeyer de 500 mL, contendo 50 mL de meio líquido YM, inoculados com uma alçada das culturas em meio sólido, foram incubados a 150 rpm sob temperatura de 28 °C durante 24 h.

Para cada linhagem em estudo, frascos erlenmeyer

de 1000 mL, contendo 100 mL de meio YM acrescidos de 10 g/L de glicose foram inoculados com a suspensão de leveduras, anteriormente mencionada, correspondendo a 10% do volume total do cultivo. Estes frascos foram incubados à temperatura de 28 °C a 150 rpm de agitação, sob iluminação intensa com lâmpada fluorescente.

Após 5 dias, a massa celular de cada cultivo foi removida à velocidade de 3 000 rpm, por 15 min, em centrífuga (Sorval). Para eliminação de eventuais interferentes, a biomassa foi novamente ressuspensa em água destilada e centrifugada por mais duas vezes. As amostras de massa celular de leveduras foram congeladas, liofilizadas, pesadas e mantidas sob atmosfera de nitrogênio a -18 °C, até análise.

Extração dos Carotenóides

Com o intuito de romper a parede celular das leveduras, testou-se dimetilsulfóxido (DMSO) e o uso de areia tratada, como descrito a seguir.

Utilizou-se a metodologia descrita por Sedmak *et al.* (1990), com algumas modificações. A levedura liofilizada (50 mg) foi agitada em Vortex por 1 min com 2,5 mL de DMSO a 55 °C, em tubo de vidro. Em seguida, adicionaram-se 5 mL de um solvente mais apolar, éter etílico (Martin *et al.*, 1993), acetato de etila ou éter etílico/acetato de etila (1:1), e o tubo foi novamente agitado por 1 min e centrifugado a 3000 rpm por 5 min para separação das fases. Este procedimento foi repetido, cerca de 6 vezes, até extração exaustiva dos carotenóides. As fases apolares foram reunidas e o extrato foi lavado com água destilada em funil de separação.

O tratamento da areia foi realizado no próprio laboratório e consistiu em destruição da matéria orgânica com HCl 50%, sob aquecimento, lavagem até pH neutro, secagem, separação dos grãos de diâmetro de 0,5 mm a 1,0 mm e eliminação de metais ferromagnéticos com auxílio de um ímã. Para extração dos carotenóides, quantidades iguais de levedura seca e areia (250 mg) foram trituradas em gral e pistilo. Os carotenóides foram exaustivamente extraídos (cerca de 4 vezes) com total de 50 mL de acetato de etila, seguido de filtração em funil de filtro sinterizado.

Os extratos, obtidos pelos dois métodos, foram concentrados em evaporador rotatório (T<35 °C), seguido de completa evaporação do solvente sob fluxo de nitrogênio.

Padrões

Os padrões de all-*trans*- γ -caroteno, all-*trans*- β -caroteno e all-*trans*-torularrodina foram gentilmente cedidos pela Hoffmann-La Roche (Basel, Suíça).

O toruleno foi purificado a partir do extrato de carotenóides obtido de *R. glutinis* usando areia tratada como agente abrasivo (3 g da biomassa liofilizada de leveduras), como descrito anteriormente. Após evaporação do solvente, o extrato foi aplicado em coluna aberta de óxido de alumínio neutro (grau III). As frações 1 e 2, contendo carotenos, foram eluídas, respectivamente, com éter de petróleo e éter etílico/éter de petróleo (1:10).

A fração 2 foi separada por cromatografia em camada delgada de MgO/Kieselguhr (1:1) em 4 zonas, utilizando como fase móvel acetona/éter de petróleo (1:1). A banda correspondente ao toruleno, de cor salmão e R_f de 0,1, foi raspada e o pigmento eluído com éter etílico. Verificou-se por CLAE que o grau de pureza do padrão de all-*trans*-toruleno foi de 95%. O uso de coluna de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ para separar os isômeros *cis* do all-*trans*-toruleno não foi eficiente para aumentar a pureza do isômero all-*trans*.

Separação dos Carotenóides por CLAE

Foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (Waters, modelo 996), sistema quaternário de bombeamento de solventes (Waters, modelo Controller 600), injetor "Rheodyne" com alça de amostra de 20 μL , desgaseificador "on line" e sistema de aquisição e processamento de dados Millennium (Waters). A separação foi realizada em coluna C_{18} Novapack (4 μm , 4,6 x 300 mm), vazão de 1 mL/min e temperatura da coluna mantida em forno a 29 °C. Os espectros foram adquiridos entre 250 e 600 nm e os cromatogramas processados a 460 nm.

Após vários testes com combinações de acetonitrila, metanol, tetraidrofurano, diclorometano e acetato de etila, a composição da fase móvel utilizada para separação dos carotenóides foi 100% metanol (0,1% trietilamina) de 0 até 3,5 min, passando para acetonitrila/metanol (0,1% trietilamina)/acetato de etila (88:10:2), em 30 segundos, e mantendo esta proporção até o final da análise (fase móvel 1). Posteriormente, a fase móvel foi modificada para acetonitrila/metanol (0,1% trietilamina)/acetato de etila (75:15:10), passando metanol (0,1% trietilamina) pela coluna por 1 minuto entre as injeções (fase móvel 2).

Todos os solventes utilizados foram grau cromatográfico e previamente filtrados em sistema Millipore de filtração a vácuo, com membrana para solvente orgânico de 0,45 μm . Todas as amostras também foram filtradas em membrana de polietileno com 0,22 μm de poro.

Identificação e Quantificação dos Carotenóides

Para a identificação dos carotenóides, utilizaram-se

as informações provenientes do comportamento cromatográfico desses pigmentos nos diferentes sistemas cromatográficos, co-cromatografia com padrões e comparação dos λ_{max} dos espectros de absorção no UV-visível com valores da literatura (Davies, 1976; Britton, 1995). A estrutura fina do espectro (%III/II) dos carotenóides foi calculada traçando como linha base o valor mínimo entre os picos III e II e medindo a altura do pico de maior comprimento de onda (III) e a altura do pico de absorção do meio (II), λ_{max} para a maioria dos carotenóides, em relação à linha base (Britton, 1995).

A quantificação foi realizada pelo método do padrão externo. Foram construídas curvas-padrão com 5 diferentes concentrações para all-*trans*-toruleno (de 6,8 a 86,4 $\mu\text{g/mL}$), all-*trans*-torularrodina (de 3,2 a 40,5 $\mu\text{g/mL}$), all-*trans*- β -caroteno (de 6,6 a 84,8 $\mu\text{g/mL}$) e all-*trans*- γ -caroteno (de 3,3 a 42,2 $\mu\text{g/mL}$). As curvas obtidas dos padrões foram lineares nas faixas estudadas e as concentrações dos carotenóides nas amostras analisadas estavam dentro os valores das curvas-padrão. A quantificação dos carotenóides foi realizada por comparação da área do pico da amostra com o do padrão, injetado diariamente. O 16-hidroxi-toruleno foi quantificado através dos valores de área obtidos para o toruleno.

Avaliação do Método

A precisão entre injeções foi verificada através de cinco injeções do mesmo extrato. A precisão do método também foi avaliada para todas as cepas.

Como não há padrão de referência certificado para carotenóides nesta matriz, a exatidão do método foi verificada através da adição à massa liofilizada de *R. glutinis* de β -caroteno nas quantidades de 5,7 μg e 11,5 μg e de torularrodina nos níveis de 5,6 μg e 11,2 μg .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extração

O DMSO mostrou-se bastante eficiente para baixas quantidades de amostra. Entretanto, quando maiores quantidades de levedura foram utilizadas, houve a formação de uma interface pigmentada e insolúvel, indicativa de extração incompleta. Este inconveniente já havia sido previamente relatado (Sedmak *et al.*, 1990). No presente estudo, a utilização de éter etílico/acetato de etila (1:1) como solvente extrator mostrou maior eficiência e facilitou as etapas subsequentes de centrifugação e lavagem.

A utilização de DMSO para liberação dos pigmentos das leveduras tem sido descrita em trabalhos envolven-

do linhagens de *Rhodotorula rubra* (Martin *et al.*, 1993), *Rhodotorula glutinis* (Buzzini, Martini, 1999) e *Phaffia rhodozyma* (Parajó *et al.*, 1998), sendo considerado como método rápido e reprodutível (Sedmak *et al.*, 1990). De fato, no presente trabalho o método empregando DMSO foi utilizado com sucesso para extração dos carotenóides de *R. glutinis* e *R. rubra*. Entretanto, não foi eficiente para extração exaustiva dos pigmentos de *R. minuta*, além do fato de que o uso de solvente a 55 °C para o rompimento das leveduras pode ser crítico, uma vez que os carotenóides são instáveis à temperatura.

Diferenças na eficiência de extração de diferentes linhagens de *Rhodotorula* também foram reportadas no estudo conduzido por Peterson *et al.* (1958). A extração com acetona sob agitação vigorosa foi completa para *R. glutinis* variedades *rubescens* e *flava*, enquanto que a eficiência foi de 80 a 90% para *R. mucilaginoso* e *R. glutinis*, de 50 a 60% para *R. rubra*, e muito baixa para *R. minuta* e *R. aurantiaca* (Peterson *et al.*, 1958).

No presente estudo, a trituração da biomassa seca de leveduras com areia tratada promoveu a extração exaustiva de até 2 g de amostra seca com acetato de etila, sem necessidade de aquecimento, e foi eficiente para todas as cepas estudadas. Comparativamente, este método propiciou a extração de maiores quantidades de carotenóides, utilizando menores quantidades de solvente e foi o escolhido para a análise subsequente das diferentes cepas. Embora Haard (1988) também tenha utilizado areia para extração de carotenóides de *Phaffia rhodozyma*, são raros os trabalhos que utilizam este tipo de método para extração de carotenóides de leveduras.

Separação por CLAE

A separação dos carotenóides utilizando gradiente (fase móvel 1) ocorreu em 60 minutos, além de serem necessários mais 15 minutos para acondicionamento da coluna. Por outro lado, a fase móvel 2 apresentou separação similar em 40 minutos de corrida (Figura 1a). A identificação dos picos e as estruturas dos carotenóides estão apresentadas na Tabela I e Figura 2, respectivamente.

Cabe ressaltar que foi necessário adicionar, no mínimo, 80% de metanol na composição da fase móvel para eluição da torularrodina. Como mostra a Figura 1b, não houve eluição deste carotenóide utilizando a fase móvel 2 sem condicionamento da coluna com metanol. Possivelmente, a formação de ligações de hidrogênio entre o grupo carboxílico da torularrodina e o metanol justifique tal comportamento cromatográfico. Não foi observada diferença nas concentrações de carotenóides quando os carotenóides foram separados com as diferentes fases móveis (Tabela II).

É interessante ressaltar a presença de isômeros *cis* de todos os carotenóides em todas as linhagens analisadas. Apesar da forma *trans* possuir maior estabilidade, a presença de isômeros *cis* é justificada pelo cultivo ter sido realizado sob intensa iluminação, uma vez que é amplamente conhecido que a luz é um dos principais catalisadores na reação de isomerização de carotenóides.

Recentemente, os carotenóides de *Rhodotorula glutinis* foram separados por CLAE em coluna de C₁₈ (Nam *et al.*, 1988; Frengova *et al.*, 1994; Perrier *et al.*, 1995; Buzzini, Martini, 1999). Entretanto, o cromatograma foi apresentado somente no trabalho de Nam *et al.* (1988), que não separou os isômeros geométricos da torularrodina, toruleno, γ -caroteno e β -caroteno.

Desempenho do Método

A área de cada carotenóide foi obtida pela soma das áreas dos seus isômeros geométricos *cis* e *trans*. Os valores do coeficiente de variação (CV) entre cinco injeções foram de 0,9% para torularrodina, 1,0% para toruleno, 1,5% para γ -caroteno e 0,7% para β -caroteno. Estes valores de CV foram menores que os apresentados por Nam *et al.* (1988) para triplicatas de injeções, cujos valores de CV foram de 13% para torularrodina, 4% para toruleno, 3% para γ -caroteno e 0,4% para β -caroteno.

Como esperado, o CV entre duplicatas de extrações foi maior, sendo 3,5% para torularrodina, 6,2% para toruleno, 4,3% para γ -caroteno e 4,5% para β -caroteno.

A recuperação do β -caroteno foi de 96% e 97% nos níveis de menor e maior concentração, respectivamente. A recuperação da torularrodina foi de 94% no nível de menor concentração e de 83% no nível de maior concentração.

Os valores de CV das análises estão bem abaixo dos relatados na literatura para carotenóides de frutas (Hamano, Mercadante, 2001; Assunção, Mercadante, 2003), cenoura (Bushway, Wilson, 1982) e vegetais (Scott *et al.*, 1996); e a recuperação de β -caroteno está na faixa descrita (Assunção, Mercadante, 2003). O desempenho dos métodos utilizados na análise de carotenóides de *Rhodotorula* não foi reportado na literatura (Nam *et al.*, 1988; Frengova *et al.*, 1994; Perrier *et al.*, 1995; Buzzini, Martini, 1999).

Composição de Carotenóides de Cinco Linhagens de *Rhodotorula*

O perfil de carotenóides foi semelhante para as cinco cepas, apresentando como carotenóides majoritários β -caroteno, γ -caroteno, toruleno e torularrodina (Tabela III),

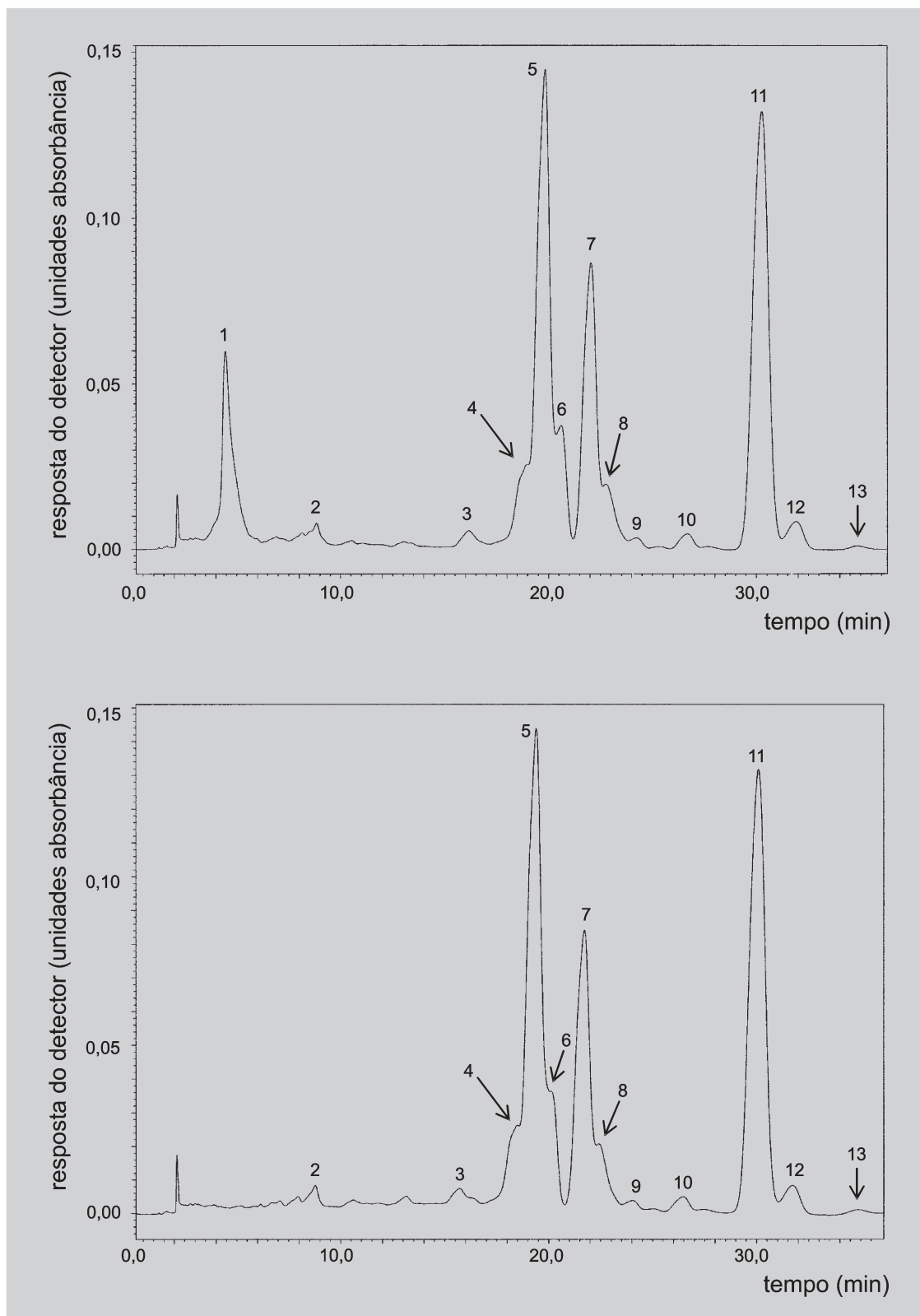


FIGURA 1 - Cromatograma, obtido por CLAE, dos carotenóides de *R. glutinis*. Condições: coluna Novapack C_{18} (4 μ m, 4.6 x 300 mm), fase móvel acetonitrila/metanol (0,1% trietilamina)/acetato de etila (75:15:10), vazão de 1 ml/min e temperatura da coluna de 29 °C; **a**- com eluição de metanol (0,1% trietilamina) por 1 minuto entre as injeções, **b**- sem eluição de metanol entre injeções. A identificação dos picos encontra-se na Tabela I.

TABELA I - Características dos carotenóides das cinco linhagens de *Rhodotorula*

nº do pico ^a	carotenóides	t _R (min) ^b	λ _{max} (nm) ^c	% III/II
1	torularrodina	4,0 - 4,6	387, (465), 492, 524	30
2	16-hidroxi-toruleno ^d	8,8 - 9,2	381, (460), 487, 520	31
3	não identificado	15,9 - 16,6	374, (450), 476, 506	28
4	neurosporeno	18,3 - 18,9	415, 442, 471	98
5	all- <i>trans</i> -toruleno	19,6 - 20,4	381, 460, 488, 521	49
6	<i>cis</i> -toruleno	20,5 - 22,0	378, (456), 482, 514	29
7	all- <i>trans</i> -γ-caroteno	21,9 - 23,0	437, 464, 493	52
8	<i>cis</i> -γ-caroteno	22,4 - 23,6	350, (432), 460, 488	23
9	ζ-caroteno	24,5 - 25,9	376, 398, 422	106
10	β-zeacaroteno	26,9 - 28,3	(406), 430, 456	53
11	β-caroteno	30,2 - 31,6	(430), 454, 481	21
12	15- <i>cis</i> -β-caroteno	31,9 - 33,3	339, (423), 448, 478	0
13	fiteno	35,0 - 36,0	(275), 287, 302	0

^aNumeração de acordo com os cromatogramas da Figura 1; ^bFaixa de 10 corridas; ^cSolvente acetonitrila/metanol/acetato de etila (75:15:10), parênteses refere-se a ombro espectral; ^dTentativamente identificado.

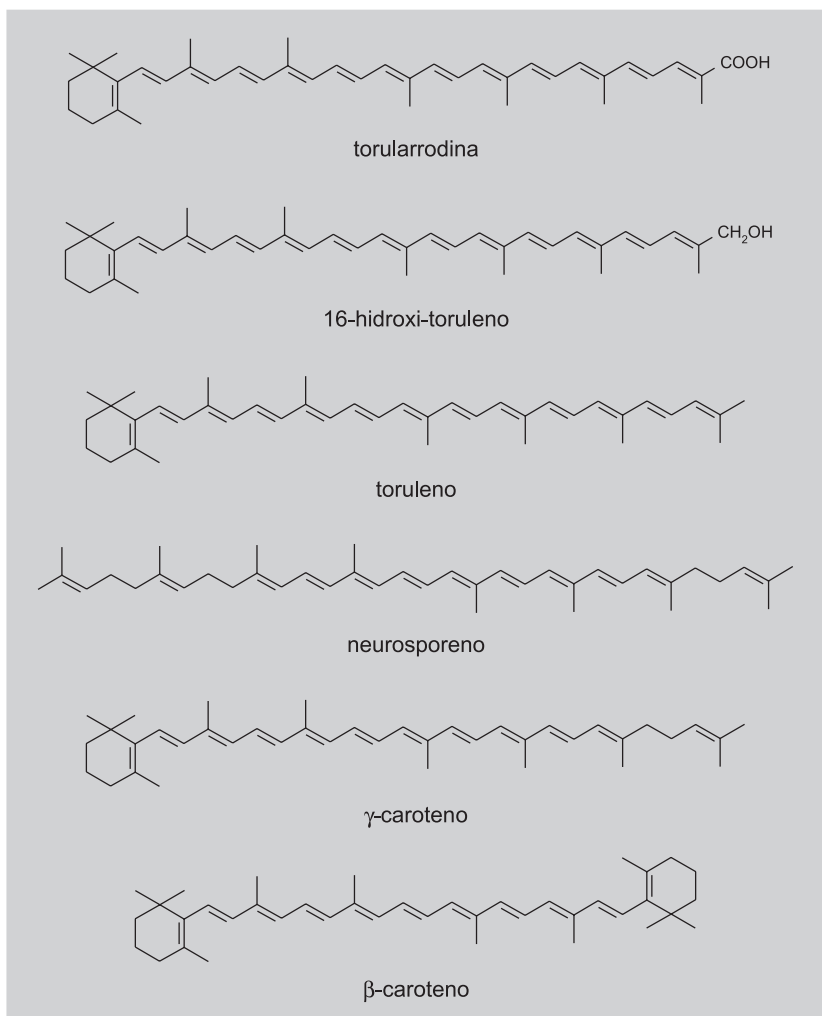
**FIGURA 2** - Estrutura dos carotenóides presentes em *Rhodotorula*.

TABELA II - Composição de carotenóides de *R. glutinis*

Carotenóides	concentração (µg/g de massa seca) ^a	
	FM1	FM2
torularrodina	33,2 ± 1,6	26,0 ± 3,5
16-hidroxi-toruleno ^b	2,6 ± 0,1	2,7 ± 0,7
toruleno + neurosporeno	111,6 ± 4,2	108,1 ± 7,5
γ-caroteno	34,1 ± 1,2	48,5 ± 4,0
β-caroteno	69,9 ± 0,6	66,4 ± 3,8
total	251,3 ± 7,7	251,7 ± 19,5

FM1: fase móvel 1, 100% metanol (0,1% trietilamina) de 0 até 3,5 min, passando para acetonitrila/metanol (0,1% trietilamina)/acetato de etila (88:10:2) em 30 segundos, e mantendo esta proporção até o final da análise.

FM2: fase móvel 2, acetonitrila/metanol (0,1% trietilamina)/acetato de etila (75:15:10), eluindo a coluna por 1 minuto com metanol (0,1% trietilamina) entre as injeções.

^aOs valores correspondem à média e desvio-padrão de duplicatas de extração e de quantificação por CLAE.

^bTentativamente identificado.

TABELA III - Composição de carotenóides (µg/g de massa seca) de quatro linhagens de *Rhodotorula*

Carotenóides	<i>R. rubra</i>	<i>R. araucariae</i>	<i>R. lactosa</i>	<i>R. minuta</i>
torularrodina	63,3 ± 7,8	31,5 ± 24	23,8 ± 0,3	35,6 ± 0,8
16-hidróxi-toruleno ^a	2,2 ± 0,4	1,6 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1,2 ± 0,1
toruleno + neurosporeno	40,9 ± 5,0	49,3 ± 1,4	56,8 ± 2,1	47,4 ± 4,7
γ-caroteno	1,2 ± 0,3	6,2 ± 0,2	6,3 ± 0,1	5,3 ± 0,1
β-caroteno	15,9 ± 1,9	24,6 ± 0,5	17,5 ± 0,2	14,2 ± 1,7
total	123,5 ± 14,9	113,2 ± 4,7	105,8 ± 2,9	103,7 ± 7,4

Os valores correspondem à média e desvio-padrão de duplicatas de extração e de quantificação por CLAE, utilizando como fase móvel acetonitrila/metanol (0,1% trietilamina)/acetato de etila (75:15:10) e eluição por 1 minuto com metanol (0,1% trietilamina) entre as injeções. ^aTentativamente identificado

que são característicos deste gênero (Simpson *et al.*, 1964; Britton, 1998). Os carotenóides minoritários detectados no presente trabalho, ζ-caroteno, β-zeacaroteno, neurosporeno e fitoeno, são intermediários da via biossintética (Peterson *et al.*, 1958; Britton, 1998).

O total de carotenóides assim como as quantidades relativas dos pigmentos individuais variaram em função da cepa de *Rhodotorula* e das diferentes condições do meio de cultivo (Squina *et al.*, 2002).

As porcentagens de torularrodina (10%), toruleno (43%), γ-caroteno (19%) e β-caroteno (26%) em *R. glutinis*, obtidas no presente estudo, apresentaram concordância com outros estudos utilizando meios de cultivo de leveduras comuns em laboratórios de microbiologia, que apresentaram para os respectivos carotenóides citados teores variando de 24 a 29%, 27 a 37%, 9 a 12% e 15 a 27% (Peterson *et al.*, 1958; Simpson *et al.*, 1964). Em outro estudo (Squina

et al., 2002) envolvendo o cultivo de *R. glutinis* da mesma procedência em diferentes composições de meio de cultura contendo caldo de cana-de-açúcar, as porcentagens variaram de 5 a 16% de torularrodina, de 26 a 46% de toruleno, de 5 a 17% de γ-caroteno e de 33 a 50% de β-caroteno. Utilizando diferentes fontes alternativas de carboidratos, as porcentagens variaram de 74 a 85% de torularrodina, de 7,9 a 14,8% de toruleno e de 0 a 25% de β-caroteno em relação ao total de carotenóides de *R. glutinis* (Buzzini, Martini, 1999). Dois tipos de perfis de carotenóides para *R. glutinis* são encontrados na literatura, sendo um com níveis de torularrodina acima de 55% (Peterson *et al.*, 1958; Frengova *et al.*, 1994, 1995; Buzzini, Martini, 1999), e outro com níveis deste pigmento abaixo de 40% (Peterson *et al.*, 1958; Simpson *et al.*, 1964; Hayman *et al.*, 1974; Nam *et al.*, 1988; Squina *et al.*, 2002), sendo que Nam *et al.* (1988) obtiveram níveis de 2% deste pigmento.

O total de carotenóides (251,7 µg/g) obtido no presente estudo para *R. glutinis* foi próximo ao obtido por Simpson *et al.* (1964) utilizando substratos microbiológicos (235,2 e 256,7 µg/g). Porém, o total produzido por esta cepa no presente estudo foi menor que o obtido por Peterson *et al.* (1958) (332,0 e 494,0 µg/g) e maior que os obtidos por Perrier *et al.* (1995) (70 µg/g) e Nam *et al.* (1988) (79,5 µg/g), também utilizando meios comuns de cultivo para leveduras.

A Tabela III apresenta a composição para *R. rubra*, cujos resultados para as porcentagens dos pigmentos torularrodina (51%), toruleno (33%), γ -caroteno (1%) e β -caroteno (13%) foram similares às verificadas no estudo de Peterson *et al.* (1958), que apresentou, respectivamente, 49%, 28%, 9% e 15%. O total de pigmentos por peso seco obtido no presente trabalho (123,5 µg/g) foi próximo ao total obtido para *R. rubra* NRRL-15596 cultivada em salmoura produzida na fermentação do repolho (130 µg/g) (Shih, Hang, 1996). A mesma linhagem de *R. rubra* do presente estudo produziu de 60,0 a 426,6 µg/g de carotenóides totais, dependendo da composição do meio de cultivo (Squina *et al.*, 2002).

Embora a quantidade de β -caroteno de *R. araucariae* obtida no presente estudo (Tabela III) tenha sido próxima da determinada por Perrier *et al.* (1995) (30 µg/g), o total de carotenóides foi quase o triplo do reportado (40 µg/g) por este autores.

A cepa *R. lactosa* avaliada no presente trabalho (Tabela III) apresentou cerca de um terço do conteúdo de β -caroteno (17,5 µg/g) e total de carotenóides (105,8 µg/g) superior aos teores encontrados por Perrier *et al.* (1995), respectivamente, de 55 e 75 µg/g. O total de carotenóides desta levedura cultivada em soro de leite foi de 86,7 µg/g (Frengova *et al.*, 1994).

Em relação a *R. minuta* (Tabela III), as porcentagens relativas obtidas neste trabalho para torularrodina (34%), toruleno (46%), γ -caroteno (5%) e β -caroteno (14%) foram similares às relatadas previamente por Peterson *et al.* (1958) (38%, 41%, 7% e 14% para os respectivos carotenóides). O total de carotenóides obtido para esta cepa no presente trabalho (104 µg/g) foi também próximo ao reportado por Peterson *et al.* (1958) (93,4 µg/g) e maior que o teor relatado por Perrier *et al.* (1995) (40 µg/g).

CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que, além do método otimizado de análise ser preciso e exato, os cultivos foram bem controlados e reproduzidos. Todos os pigmentos quantificados apresentaram-se ao redor da média com um intervalo de confiança de 90%.

Das cepas avaliadas, *R. glutinis* foi a que apresentou a maior concentração de carotenóides, seguido da *R. rubra*. Os carotenóides principais encontrados foram torularrodina, toruleno, γ -caroteno e β -caroteno em todas as linhagens. Entretanto, as cepas apresentaram diferenças quantitativas marcantes para os principais pigmentos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES, pela bolsa de Mestrado ao primeiro autor, e ao CNPq e Roche Vitamins Ltd., pelo auxílio financeiro.

ABSTRACT

HPLC analysis of carotenoids from five *Rhodotorula* strains

*A method for extraction and HPLC separation of carotenoids from five Rhodotorula strains was optimized. The extraction by mechanical disruption of the yeast cell wall with fine treated sand was shown to be more efficient than chemical disruption with dimethylsulfoxide. The carotenoids were separated and quantified by HPLC on a C₁₈ column using as mobile phase acetonitrile/methanol (0.1% triethylamina)/ethyl acetate (75:15:10) with 100% methanol (0.1% triethylamine) between the injections, at a flow rate of 1.0 mL/min. In all strains, the major carotenoids found were torularhodin, torulene, γ -carotene and β -carotene. The total carotenoid contents, in µg/g, obtained were 251.7 for *R. glutinis*, 123.5 for *R. rubra*, 113.2 for *R. araucariae*, 105.8 for *R. lactosa* and 103.7 for *R. minuta*.*

UNITERMS: Carotenoids. *Rhodotorula*. HPLC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSUNÇÃO, R. B.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale* L). *Food Chem.*, Amsterdam, v.81, p.495-502, 2003.
- BRITTON, G. Overview of carotenoid biosynthesis. In: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H., eds. *Carotenoids: biosynthesis and metabolism*. Basel: Birkhäuser Verlag, 1998. v.3., p.13-147.
- BRITTON, G. UV/Visible spectroscopy. In: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H., eds. *Carotenoids: spectroscopy*. Basel: Birkhäuser Verlag, 1995. v.1B, p.13-62.

- BUSHWAY, R. J.; WILSON, A. M. Determination of α - and β -carotene in fruit and vegetables by high performance liquid chromatography. *Can. Inst. Food. Sci. Technol. J.*, Ottawa, v.15, p.165-169, 1982.
- BUZZINI, P.; MARTINI, A. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. *Bioresour. Technol.*, Amsterdam, v.71, p.41-44, 1999.
- DAVIES, B. H. Carotenoids. In: GOODWIN, T. W., ed. *Chemistry and biochemistry of plant pigments*. 2.ed. London: Academic Press, 1976. v.2, p.38-165.
- FRENGOVA, G.; SIMOVA, E.; PAVALOVA, K.; BESHKOVA, D.; GRIGOROVA, D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, v.44, p.888-894, 1994.
- FRENGOVA, G. I.; SIMOVA, E. D.; BESHKOVA, D. M. Effect of temperature changes on the production of yeast pigments co-cultivated with lacto-acid bacteria in whey ultrafiltrate. *Biotechnol. Lett.*, Dordrecht, v.17, p.1001-1006, 1995.
- HAARD, N. F. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. *Biotechnol. Lett.*, Dordrecht, v.10, p.609-614, 1988.
- HAMANO, P. S.; MERCADANTE, A. Z. Composition of carotenoids from commercial products of caju (*Spondias luteas*). *J. Food Compos. Anal.*, Orlando, v.14, p.335-343, 2001.
- HAYMAN, E. P.; YOKOYAMA, H.; CHICHESTER, C.; SIMPSON, K. L. Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. *J. Bacteriol.*, Washington, v.120, p.1339-1343, 1974.
- JOHNSON, E. A.; SCHROEDER, W. A. Microbial carotenoids. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, Berlin, v.53, p.119-178, 1995.
- JOHNSON, E. A.; VILLA, T. G.; LEWIS, M. J.; PHAFF, H. J. Simple method for the isolation of astaxanthin from the Basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.35, p.1155-1158, 1978.
- KESTER, A. S. Computer-optimized normal-phase high-performance liquid chromatographic separation of corynebacterium poinsettiae carotenoids. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.310, p.372-378, 1984.
- KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. *Pure Appl. Chem.*, Research Triangle Park, v.66, p.1003-1010, 1994.
- MARTELLI, H.; SILVA, I. M. Beta-carotene synthesis in *Rhodotorula*. *Methods Enzymol.*, San Diego, v.214, p.386-390, 1993.
- MARTELLI, H. L.; SILVA, I. M.; SOUZA, N. O.; POMEROY, D. Production of β -carotene by a *Rhodotorula* strain grown on sugar cane juice. *Biotechnol. Lett.*, Dordrecht, v.12, p.207-208, 1990.
- MARTIN, A. M.; LU, C.; PATEL, T. R. Growth parameters for the yeast *Rhodotorula rubra* grown in peat extracts. *J. Ferment. Bioeng.*, Amsterdam, v.76, p.321-325, 1993.
- MEYERS, S. P. Developments in world aquaculture, feed formulation, and role of carotenoids. *Pure Appl. Chem.*, Research Triangle Park, v.66, p.1069-1976, 1994.
- NAM, H. S.; CHO, S. Y.; RHEE, J. S. High-performance liquid chromatographic analysis of major carotenoids from *Rhodotorula glutinis*. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.448, p.445-447, 1988.
- OKAGBUE, R. N.; LEWIS, M. J. Autolysis of the red yeast *Phaffia rhodozyma*: a potential tool to facilitate extraction of astaxanthin. *Biotechnol. Lett.*, Dordrecht, v.6, p.247-250, 1984.
- PARAJÓ, J. C.; SANTOS, V.; VAZQUEZ, M. Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xylose. *Process Biochem.*, Oxford, v.33, p.181-187, 1998.
- PERRIER, V.; DUBREUCQ, E.; GAYZY, P. Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. *Arch. Microbiol.*, Berlin, v.164, p.173-179, 1995.
- PETERSON, W. J.; LECCE, E. E.; BELL, T. A.; ETCHELLES, J. L. Quantitative determination of the carotenoids in yeasts of the genus *Rhodotorula*. *J. Bacteriol.*, Washington, v.75, p.586-591, 1958.

- SCOTT, K. J.; FINGLAS, P. M.; SEALE, R.; HART, D. J.; FROIDMONT-GÖRTZ, I. Interlaboratory studies of HPLC procedures for the analysis of carotenoids in foods. *Food Chem.*, Amsterdam, v.57, p.85-90, 1996.
- SEDMAK, J. J.; WEERASINGHE, D. K.; JOLLY, S. O. Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia Rhodozyma*. *Biotechnol. Tech.*, London, v.4, p.107-112, 1990.
- SHIH, C. T.; HANG, Y. D. Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* from sauerkraut brine. *Lebensm.-Wiss. Technol.*, London, v.29, p.570-572, 1996.
- SIMPSON, K. L.; NAKAYAMA, T. O. M.; CHICHESTER, C. O. Biosynthesis of yeast carotenoids. *J. Bacteriol.*, Washington, v.88, p.1688-1094, 1964.
- SQUINA, F. M.; YAMASHITA, F.; PEREIRA, J. L.; MERCADANTE, A. Z. Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* and *R. glutinis* in culture medium supplemented with sugar cane juice. *Food Biotechnol.*, New York, v.16, p.227-235, 2002.

Recebido para publicação em 26 de março de 2003.