

CAROTENÓIDES

Cores Atraentes e Ação Biológica

O Laboratório de Químico/Biotecnologia de Biomassa (LQBB) da UFPR, na década de 1990, acumulou experiência em Biotecnologia aperfeiçoando o substituto temporário de pele humana à base de celulose bacteriana para terapia de queimaduras, otimizando a produção microbiana de anidrido de difrutose a partir de inulina de raízes de dália como potencial edulcorante dietético e consolidando nova tecnologia de isolamento e purificação de acetogeninas de sementes de anonáceas (graviola) como praguicidas e antitumorais. O projeto biotecnológico ora reportado e pioneiro no Brasil visa, no interregno entre 1996 e 2000, à produção microbiana de carotenóides oxigenados (astaxantina) a partir de insumos nacionais de baixo custo (caldo de cana e uréia) para emprego em piscicultura e avicultura e o encapsulamento destes pigmentos combatentes de radicais livres (e.g., bixina de urucum) em ciclodextrinas para incremento de sua natural baixa solubilidade em água e para proteção contra o ambiente físico desfavorável (ar e luz).

Ocorrência natural

Os carotenóides compreendem uma família de compostos naturais, dos quais mais de 600 variantes estruturais estão reportadas e caracterizadas, a partir de bactérias, algas, fungos e plantas superiores. A produção natural mundial é estimada em 100 milhões de toneladas por ano, e é encabeçada pela fucoxantina das algas fotossintéticas marrons. Os mamíferos não estão bioquimicamente capacitados para a biossíntese de carotenóides, mas podem acumular e / ou converter precursores que obtêm da dieta (e.g., conversão de β -caroteno em vitamina A). No plasma humana predominam o β -caroteno e o licopeno. Os carotenóides mais comumente encontrados nos alimentos vegetais são o β -caroteno (cenoura; *Daucus carota*), licopeno (tomate; *Lycopersicon esculentum*), vári-

as xantofilas (zeaxantina, luteína e outras estruturas oxigenadas do milho, *Zea mays*; da manga, *Mango indica*; do mamão, *Carica papaya* e da gema de ovo) e a bixina (aditivo culinário e corante dérmico usado por indígenas amazônicos, obtido do urucum, *Bixa orellana*). Outras ocorrências naturais de uso culinário são a capsaxantina e capsorubina (páprica, *Capsicum annuum*) e a crocina (açafraão, *Crocus sativus*), excepcionalmente solúvel em água e um dos raros glicosídeos diterpênicos (C_{20}) encontrados em plantas.

Variabilidade estrutural e análise laboratorial

As fórmulas químicas de parte dos carotenóides acima mencionados estão representadas na figura 1. As respectivas colorações vão desde o

amarelo, passando pelo laranja, até o vermelho intenso e resultam da multiplicidade de duplas ligações conjugadas na estrutura mais freqüente do tipo C_{40} e se prestam à caracterização de cada variante estrutural por meio da espectrofotometria no visível com comprimentos de onda máximos de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) na faixa de 410 a 510 nm (Figura 2).

Os carotenóides apresentam muitas possibilidades de ocorrência de isomérica geométrica (especialmente induzida por temperatura) e ótica. Para fins de quantificação, um extrato organossolvente (clorofórmio; acetona; etanol) apresentando uma absorvância de 0,25 unidades de absorvância corresponde, aproximadamente, a uma concentração de 1 μg de carotenóide / mL em função do coeficiente de extinção $A_{1\%}^{1\text{cm}} = 2500$. Uma atmosfera de nitrogênio durante o isolamento, processamento e embalagem é, via de regra, requisitada para anular o efeito altamente daninho do oxigênio sobre a cadeia poliênica dos carotenos mais lábeis como o licopeno e β -caroteno. A inclusão de antioxidantes como BHT ("Butylated Hydroxy Toluene"), palmitato de ascorbila ou pirogalol é, por vezes, adotada como cautela protetora na fase final de formulação de preparações medicamentosas ou alimentares.

Entre as metodologias alternativas para monitoramento do isolamento, purificação e determinação quantitativa de carotenóides estão a cromatografia em camada delgada (TLC; Figura 3) acoplada à densito-

José D. Fontana

Mestre, Doutor e Professor
Titular em Bioquímica na
LQBB-UFPR – Universidade
Federal do Paraná; 11º Prêmio
Paranaense em C&T (1997)
jfontana@bio.ufpr.br

Sabrina V. Mendes

Nutricionista e Doutoranda
em Bioquímica na UFPR

Daniele S. Persike

Mestre em Bioquímica pela
UFPR

Luiz F. Peracetta

Eletrotécnico do SCB-UFPR

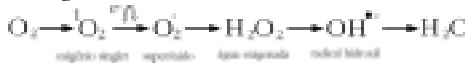
Maurício Passos

Bolsista AT-NS do CNPq

metria e a cromatografia líquida de alta pressão ou performance (HPLC; Figura 4), cujo limite de sensibilidade se situa na faixa de 5 a 10 µg de carotenóide por litro. Este tipo de análises no LQBB-UFPR tem indicado que na levedura rósea-alaranjada *Xanthophyllomyces dendrorhous* (antes *Phaffia rhodozyma*) a astaxantina varia de 27% a 63% dos carotenóides totais.

Apelo mercadológico e ação biológica

A sensação da cor é um quesito de valor na motivação do consumidor de carnes e ovos (lembrado também o apelo do mercado cosmetológico), além de achar-se popularizado o conceito de que os carotenóides são efetivamente saudáveis. Um exemplo convincente é a capacidade 250 vezes superior da astaxantina em combater radicais livres (espécies ativas do oxigênio) quando comparado com o α-tocoferol. A ocorrência de radicais livres refere-se ao oxigênio singlet (1O_2) e às ditas espécies reativas do oxigênio ou ERO(s) :



Estas ERO(s) são geradas no curso do metabolismo normal, mas são intensificadas após exposição a xenobióticos (e.g., pesticidas). Como efetores maléficos clivam o DNA, peroxidam lipídios insaturados, alteram a atividade enzimática e depolimerizam polisacarídeos. O efeito global é o envelhecimento e a morte celular. Compostos naturais ricos em duplas ligações conjugadas atuam, por seu efeito antioxidante, na destruição (seqüestro, varredura; “quenching”, “scavenging”) destes radicais livres. Este é exatamente o efeito mais benéfico que os carotenóides da dieta ou de formulações medicamentosas podem desempenhar no organismo humano ou animal em geral, ou seja, o seqüestro e a extinção de radicais livres.

Medidas via fotoemissão indicam que a capacidade de seqüestro de oxigênio singlet por parte de carotenos e xantofilas é máxima para o licopeno, alta para astaxantina ou cantaxantina, intermediária para β-caroteno ou bixina e menor para luteína e crocina.

A base da proteção conferida por carotenóides contra reações de fotossensibilização repousa num mecanismo de transferência de energia (“physical quenching”), que devolve o oxigênio singlet a seu estado basal, facilmente mensurável por espectroscopia de fotoemissão (através de “near-infrared”; 1270 nm)

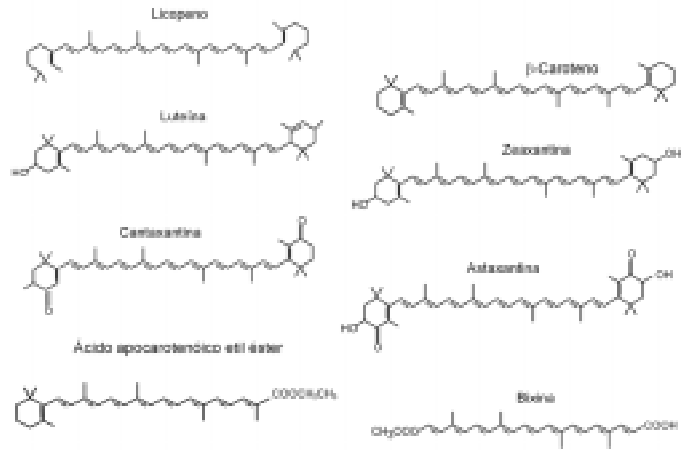
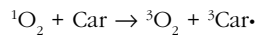
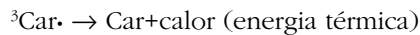


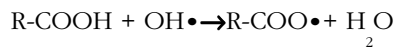
Figura 1: Estrutura química de alguns carotenóides



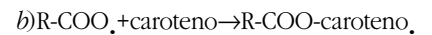
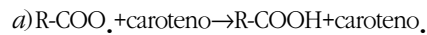
somada à capacidade que tem o carotenóide triplet de dissipar a energia incorporada na forma de calor em favor do ambiente, retornando a seu estado original:



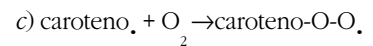
Particularmente maléfica é a geração de radicais peroxil a partir da reação entre as ERO(s) e os lipídios insaturados da arquitetura da membrana celular:



Um carotenóide pode atuar sobre estes radicais, segundo diferentes mecanismos de reação, resultando na extinção do radical livre inicial peroxil segundo as reações a ou b :



e, paralelamente, sob uma tensão adequada de oxigênio, o curso das reações se completa como abaixo:



Um indicativo do curso destas reações é o fenômeno de descoloração (“bleaching”) experimentado pela molécula de caroteno, diretamente mensurável por espectrofotometria no visível ou acoplado-se outras reações cromogênicas como, p.ex., para o dialdeído malônico (MDA) gerado no curso da peroxidação lipídica, pois o MDA é facilmente detectável com ácido tiobarbitúrico (TBA) resultando em produto corado em

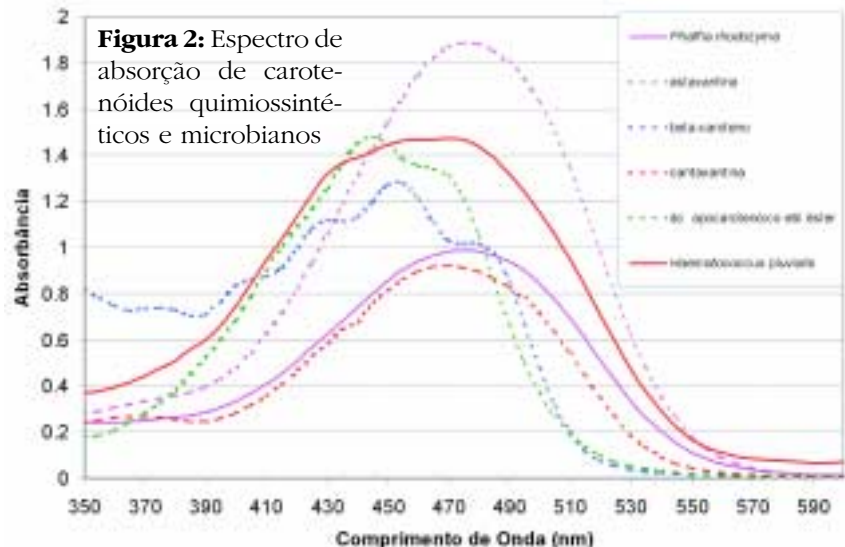


Figura 2: Espectro de absorção de carotenóides quimiossintéticos e microbianos

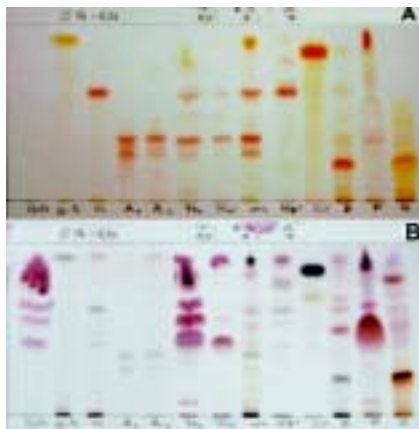


Figura 3: Cromatografia em camada delgada de carotenóides (TLC em cromatoplaça de sílica gel 60 Merck) corrida com tolueno : acetato de etila : acetona (85 : 8 : 7), inicialmente fotografada para as cores naturais (A) e depois nebulizada com o reagente de p-anisalaldeído : metanol : ácido sulfúrico (1 : 94 : 5) a quente (B) para revelação de todos componentes lipídicos. **Amostras:** OO=trioleína; β -C=beta-caroteno; C=Cantaxantina; A1 e A2=astaxantina; Pr e Pr'=extratos organosolventes cru e purificado da levedura *Xanthophyllomyces*; m=mistura dos padrões de astaxantina, cantaxantina e beta-caroteno; Hp = extrato da alga *Haematococcus* (não encistada) CY = éster etílico do ácido apocarotenóico; B = extrato de urucum; P = extrato de páprica; S = extrato de açafraão. (Notar, em B, a contaminação de gorduras neutras e fosfolipídios nas amostras Pr e P)

rosa.

A influência do número de duplas ligações conjugadas (incluindo-se as terminais das cabeças cíclicas tipo β -ionona presentes no β -caroteno, cantaxantina e astaxantina) na ação anti-oxidante e destruidora de radicais livres pode ser comparativamente medida utilizando-se um complexo do tipo heme-proteína- Fe^{2+} como gerador de radicais livres e TBA como sensor final. A astaxantina revela-se como o mais eficiente "scavenger" de radicais peroxil (dose efetiva média

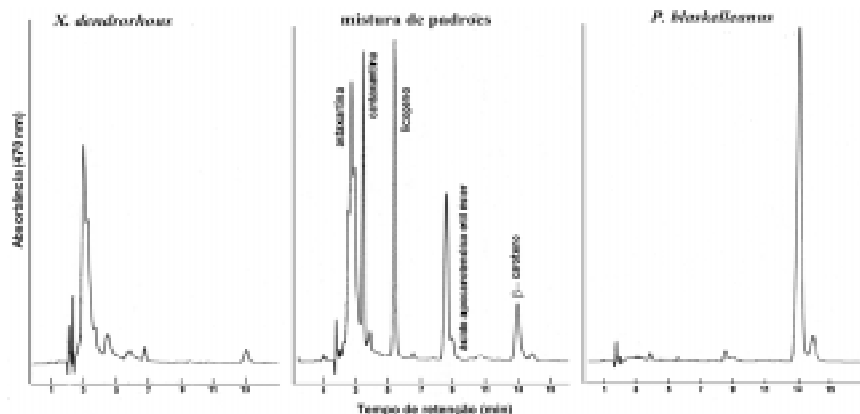
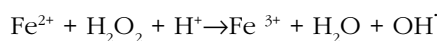


Figura 4: Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC) em coluna Supelcosil LC-18 com solvente isocrático acetonitrila : clorofórmio : metanol : água (60 : 25 : 10 : 5, v/v/v) a 0,5 mL/min e pressão de 650 psi. (Notar a dominância de astaxantina e de β -caroteno respectivamente nos extratos organosolventes da levedura *X. dendrobous* e do fungo *P. blaskeleeanus*)

ou $ED_{50} = 0,2 \mu M$), seguida, em ordem decrescente de eficiência, por zeaxantina, cantaxantina, luteína, tunaxantina e β -caroteno ($ED_{50} = 0,4$ a $1,0 \mu M$) atuando o α -tocoferol, como composto referencial, ainda menos eficientemente ($ED_{50} = 3,0 \mu M$).

Várias outras reações atestam a polivalência reacional protetora dos carotenóides, tais como a geração de radicais cátion ($Car^{\bullet+}$) e sua dismutação ($Car + Car^{\bullet+}$), adição ($Car-OOR_{\bullet}$) e simples doação de hidrogênio para inativar radical hidroxila.

O íon ferroso (Fe^{2+}), ainda que essencial para a estruturação de cromoproteínas fundamentais no transporte de gases e elétrons (hemoglobina e mioglobina; citocromos), exerce eficiente catálise na decomposição da água oxigenada, gerando ERO ainda mais danosa do que o próprio peróxido: o radical hidroxila:



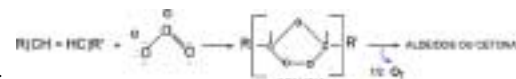
Esta é a clássica reação de Fenton, particularmente eficiente na degradação oxidativa de carboidratos. No curso das reações de interação entre β -caroteno e radicais livres, vários produtos do tipo epóxido podem ser gerados (e.g., 5,6-epoxi- β , β -caroteno e o 5,6,5',6'-diepoxi- β , β -caroteno).

A título de ensaios para acompanhar a eficiência comparativa de carotenóides selecionamos, por um lado, a difenilpicrilhidrazina (DPPH; um radi-

cal livre relativamente estável de forte coloração azulada e suficientemente solúvel nos álcoois miscíveis com água (e.g., isopropanol 25%):



sendo que mesmo uma solução clorofórmica 0,5 mM de DPPH, num intervalo de 10 min, é progressivamente descolorada pela adição de igual volume de solução isomilimolar de bixina. Alternativamente, construímos um ozonizador, no qual o O_3 é gerado numa cuba envoltória para aquela que contem a solução de carotenóide, propiciando o contato da atmosfera de gás oxidante e evitando a imersão dos eletrodos na cuba reacional central. Abaixo está esquematizada uma das possíveis reações iniciais entre carotenóide e o ozônio:



Por ação do arco gerador de ozônio (3 kVolts), no interregno total de tempo de 25 minutos, a eficiência de ozonólise foi maior com astaxantina ($t_{1/2} = 6$ min) do que com bixina ($t_{1/2} = 14$ min, amplificado para > 28 min quando a bixina é pré-encapsulada em α -ciclo-dextrina como "capa" protetora molecular).

Nos animais, a concentração de carotenóides coloridos em determinados tecidos (pele, plumas, carapaça), além da proteção anti-oxidante, inte-

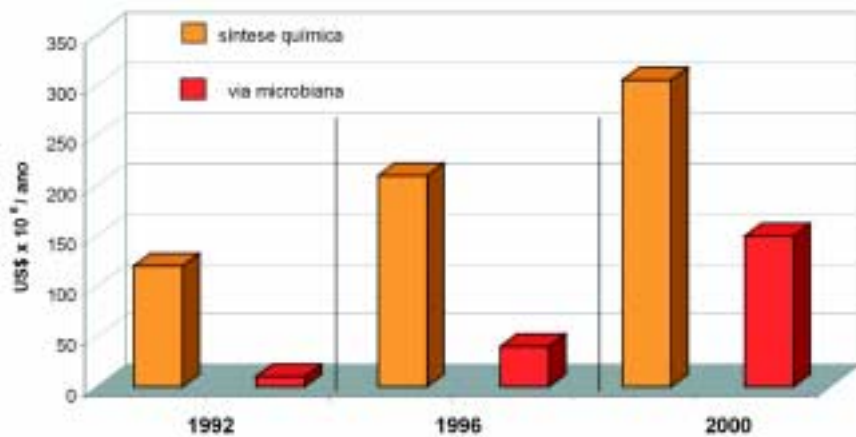


Figura 5: Avaliação de mercado em intervalos quinquenais para a produção mundial por ano de astaxantina mais cantaxantina (gráfico a partir dos dados de K. L. Dean, *Industrial Bioprocessing* 14(5): 4-5 : o incremento da via biotecnológica projetado para o ano 2000 em relação a 1996 é de 100% comparativamente a 45% alcançado pela via quimiossintética)

gra a complexa rede de sinais de comunicação envolvidos na atração, advertência e camuflagem. Como exemplo, no peixe *Gastroteus aculeatus*, a progressiva pigmentação alaranjada do abdômen no macho indica para a fêmea a aptidão para o acasalamento, enquanto que, para outros machos, é sinal de advertência de defesa de uma base territorial. A vitamina A ou retinol (derivado direto do β -caroteno mediante cisão e oxidação) está envolvida no processo de visão, reprodução e desenvolvimento normal da pele. Nos vegetais, concentrados nos cloroplastos, os carotenóides estão envolvidos na captação e transferência da energia luminosa no processo de fotossínte-

se. Diferentemente do β -caroteno, uma xantofila como a astaxantina (di-hidroxi-di-ceto- β -caroteno) interage fortemente com “carreadores” naturais (carotenoproteínas) através de sítios de acomodação em certos domínios da molécula proteica para as “cabeças polarizadas” (oxigenadas) do pigmento. É o caso da firme fixação da astaxantina na carne do salmão e na carapaça de crustáceos como o camarão e a lagosta. O “binding” e dissociação do pigmento são acompanhados de efeito batocrômico: as carapaças frescas de crustáceos nos parecem mais cinza-azuladas enquanto que, após o cozimento, se tingem mais fortemente em vermelho-rosado.



Figura 6: Três modelos de microrganismos carotenogênicos. (Esq.) cultivo em placa (caldo de cana + uréia) da levedura *P. rhodozyma*, hoje *X. dendrorhous* (acima) e de uma bactéria carotenogênica do solo (abaixo). (Dir.) microfotografia ótica de um cisto pigmentado da alga *H. pluvialis*

Via alternativa de obtenção: biotecnologia microbiana

O β -caroteno ou pró-vitamina A, como alternativa à síntese química, pode ser obtido de cepas geneticamente melhoradas dos fungos filamentosos *Blakeslea trispora* e *Phycomyces blakesleeanus*, um avanço biotecnológico obtido pelo grupo de E. Cerdá-Olmedo, em Sevilha, na Espanha. Dentre os carotenóides mais intensamente oxigenados destacam-se a astaxantina (3,3'-dihidroxi-4,4'-

diceto- β -caroteno), presente na levedura basidiomiceta róseo-alaranjada *Xanthophyllomyces dendrorhous* (antes *Phaffia rhodozyma*) e a cantaxantina (4,4'-diceto- β -caroteno), pigmento das plumas do flamingo, do guará maranhense e do “champignon” *Cantharellus cinnabarinus*. Somente para o par astaxantina e cantaxantina, o mercado internacional alcançará, no ano 2000, a notável cifra de US\$ 150 milhões, dada sua crescente absorção pelas atividades industriais de aquicultura (“fish farming”) e avicultura. A via microbiológica de produção de carotenóides de interesse comercial, quando comparada à contraparte oriunda de síntese química, vem alcançando progressiva aceitação expressa por uma duplicação do porte de mercado a cada quinquênio (Figura 5). Conforme demonstrado pelo LQBB da UFPR (tese de doutorado da Profa. Tania M.B. Bonfim, co-

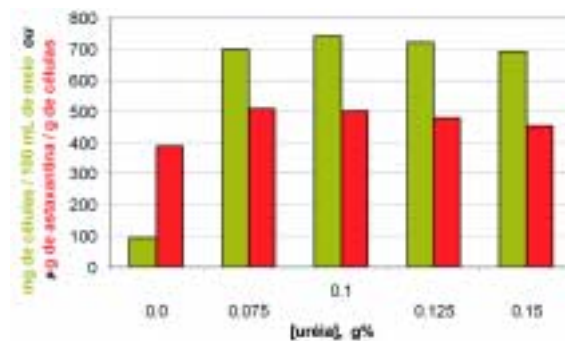


Figura 7: Crescimento (biomassa) e pigmentação celular (astaxantínogênese) da levedura basidiomiceta *X. dendrorhous* (antes *P. rhodozyma*) cultivada em meio líquido à base de caldo de cana bruto diluído a 1:10 e suplementado com concentrações crescentes de uréia, durante 5 dias a 26°C e 100 rpm de agitação.

{ Dada a forte associação do carotenóide com as células, estas, após liofilização, foram embebidas com dimetilsulfóxido (DMSO) por ½ h e, em seguida, extraídas com acetona, seguida de uma mistura de clorofórmio : metanol 2:1 para fins de quantificação espectrofotométrica dos pigmentos carotenóides }

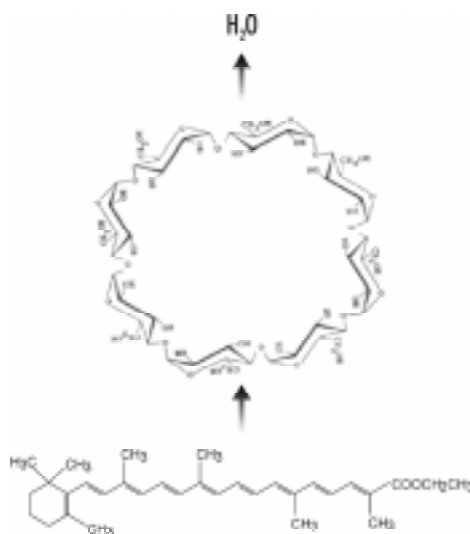


Figura 8: Esquema da complexação entre γ -ciclodextrina e do éster etílico do ácido apocarotenóico, um aditivo para rações destinadas à alimentação de frangos e ao reforço da pigmentação da carne e ovos

orientada pela Profa. Miriam B. Chociai; 1999), a levedura *Xanthophyllomyces* (Figura 6) pode ser cômoda e economicamente cultivada para a produção de astaxantina em caldo de cana bruto e uréia (Figura 7) ou em bagaço de cana hidrolisado. Mesmo a vinhaça, um subproduto poluidor da indústria sucroalcooleira, tem um efeito benéfico no incremento da biossíntese de astaxantina. Nos cultivos adicionados de 0,1 a 0,5 mL% de vinhaça, o teor de astaxantina, em $\mu\text{g} / \text{g}$ células, aumenta de 120 (caldo de cana não suplementado) para 420. A possível explicação é a presença de mevalonato no vinhoto, um precursor natural de carotenóides. Estes procedimentos biotecnológicos tiram vantagem de duas enzimas-chaves abundantes na levedura, a invertase e a urease, e também da excepcional habilidade bioquímica desta levedura, qual seja, a capacidade de fermentação de vários dissacarídeos presentes ou derivados de biomassa, tais como lactose, celobiose, xilobiose e maltose. Outro resultado relevante encontrado no LQBB-UFPR foi o incremento ainda maior da astaxantinogênese quando o caldo de cana é suplementado com pequeno teor ($< 0,1\text{g}\%$) de grupos-chaves de aminoácidos glicogênicos ou cetogênicos. Em relação à suplementação com 0,1% de uréia + fosfato de sódio, as misturas de aminoácidos vali-

na / treonina / metionina / leucina ou de tirosina / triptofano / cisteína propiciam pigmentação carotenóide 10% ou 50% superiores, respectivamente. Noutra simplificação experimental, 0,1g% de glutamato (e.g., molhos do tipo “Shoyu”) resultou em pigmentação equivalente à obtida com a mistura 0,1% de extrato de levedura + extrato de malte, dois insumos de custo elevado para fermentações industriais. Também como alternativa válida para substituir a proteose / peptona como fonte de N (suplemento caro) consolidamos a farinha de soja ou aparas de couro (subproduto de curtume, de baixíssimo custo). Interessante ressaltar que tais aparas, a exemplo de outros resíduos colagenosos, são ricas em glicina (ca. 30%), um aminoácido exclusivamente glicogênico. Como derradeira alternativa para suprir nitrogênio à levedura foi também empregada a “milhocina” (CSL = Corn Steep Liquor), um subproduto do processamento do milho contendo 40% de sólidos totais e correspondendo à água de lavagem e embebição dos grãos quando do fracionamento em amido e germe (óleo). Em relação ao caldo de cana não suplementado, a milhocina pode duplicar ou triplicar o teor da carotenóides totais se adicionada na base de 0,1 ou 0,2mL%.

Para contemplar, num país que colhe > 200 milhões de toneladas de cana de açúcar por ano-colheita, uma visão biotecnológica integral do emprego desta *agrocommodity*, bagaço de cana (125 kg de peso seco por ton de cana fresca; alto excedente nas usinas de açúcar) foi separado em cerne e casca previamente hidrolisados com enzimas celulolíticas comerciais (Celluclast[®]). Os



Figura 9: Hidrossolubilidade do éster etílico do ácido apocarotenóico induzida pela complexação com γ -ciclodextrina. (A) o carotenóide insolúvel em água; (B) solução de γ -ciclodextrina; (C) complexo hidrossolúvel carotenóide / ciclodextrina

açúcares simples derivados da celulose e hemicelulose (glucose, celobiose; xilose, xilobiose), foram utilizados como fonte de C alternativa à sacarose do caldo de cana. A casca resultou em padrão de pigmentação levemente superior ao miolo do bagaço e ambos os resultados foram similares aos obtidos com o caldo. Final e curiosamente, o açúcar mascavo (cristais de castanho a marrom, obtidos na cocção e concentração do caldo de cana nativo), na mesma concentração, resulta em produção de astaxantina cerca de 20% superior em relação ao caldo de cana nativo que lhe dá origem. O melaço de cana (água-mãe da cristalização da sacarose) igualmente se presta ao cultivo e pigmentação de *Xanthophyllomyces*. Outros microrganismos passíveis de exploração para astaxantina são a alga clorofícea unicelular *Haematococcus pluvialis* (figura 6-dir.) e a bactéria marinha *Agrobacterium aurantiacum*. Na alga, tratamos de induzir o encistamento, pois, nesta fase, é onde dispara a biossíntese de astaxantina.

Valorização biotecnológica

Como regra geral, os carotenóides são lipossolúveis. No plasma de mamíferos são transportados em associação às lipoproteínas. Excepcionalmente adquirem alguma hidrossolubilidade como resultado de processos oxidativos ou derivatizações naturais como no caso da norbixina do urucum (ambas funções carboxilas terminais demetiladas) e dos carotenóides sulfatados de organismos marinhos. Do ponto de vista biotecnológico, a obtenção de derivados hidrossolúveis de carotenóides é uma interessantíssima perspectiva comercial e no LQBB-UFPR tais complexos têm sido obtidos por meio do encapsulamento em α , β ou γ -ciclodextrinas (Figura 8) ou seja hexa-, hepta ou octa-maltossacarídeos cíclicos derivados do amido que ainda podem ser modificadas quimicamente (metilação, hidroxipropilação) para incremento de propriedades como a hidrossolubilidade e capacidade de captação de substâncias lipofílicas de interesse farmacológico, cosmético ou culinário. Em nossa experiência, a RAMEB (“Random Methylated β -CycloDextrin”) e a HP- β -CD (“HydroxyPropyl- β -CycloDextrin”) têm se revelado as estruturas mais aptas

na captação oclusiva de pigmentos carotenóides de interesse médico-farmacêutico. Nas figuras 8 e 9 representa-se o fenômeno do encapsulamento e a consequência desejável: formulações caracterizadas pela hidrossolubilidade e que, absorvidas a partir da dieta, podem, lenta e progressivamente, liberar o pigmento dentro do organismo consumidor.

A estratégia de encapsulamento, além da liberação modulada do princípio carotenóide retido na cavidade funcional da ciclodextrina, propicia mecanismo protetor de alta eficiência justamente contra os fatores ambientais que são altamente destrutíveis à estrutura nativa e livre dos carotenos: vapores ácidos ou oxidantes, luz, calor e oxigênio. A combinação destes fatores leva, indubitavelmente, à geração de alterações estruturais, as quais, não obstante a manutenção da cor (ainda que alterada) podem não mais responder pela propriedade biológica otimizada desejada. Na figura 10 estão nossos dados quanto à estabilidade da bixina de urucum frente a diferentes ambientes físicos: a combinação oxigênio (ar) e luz é a mais deletéria. O urucum é uma fonte fitofarmacêutica cujo plantio e exploração experimental crescimento no país e, para alguns preparados comerciais (“anatto”), atribui-se também uma ação hiperglicemiante.

No Brasil, uma iniciativa de produção de ciclodextrinas acha-se em avanço no grupo de Engenharia Química da FUEM (Maringá, PR), o que pode viabilizar uma indústria nacional de novos biofármacos, já que a matéria-prima (amido de mandioca) é intensamente cultivada nesta zona geográfica.

Como o projeto de pesquisa aplicada que está sendo desenvolvido no LQBB-UFPR pretende o domínio de uma vertente biotecnológica que contemple, além do pleno uso de cana-de-açúcar, também uma aplicação completa da biomassa celular de *Xanthophyllomyces*, foi avaliada a qualidade nutricional da proteína unicelular (SCP = Single Cell Protein) da levedura. Os valores encontrados para 17 aminoácidos foram similares aos obtidos com o levedo de panificação ou cervejaria (*Saccharomyces*), exceto pelo teor um pouco inferior de metionina (1.5 versus 2.2%), mas nossa análise não incluiu o

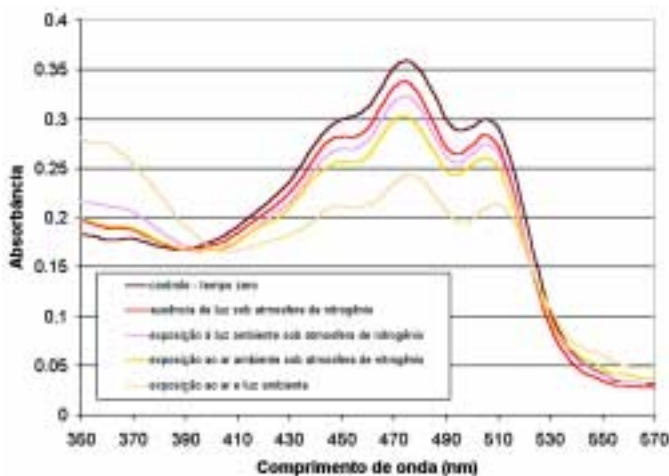


Figura 10: Influência do ambiente físico na degradação da bixina. Amostras de solução clorofórmica de bixina foram separadamente submetidas às condições físicas explicitadas na figura e as respectivas análises espectrais no campo do visível executadas ao 6º dia de experimentação. {Na exposição cumulativa e mais adversa (luz + O₂) cerca de 40% da bixina sofreu degradação}

teor específico de cisteína, o outro aminoácido sulfurado. Todos os 8 aminoácidos essenciais (não sintetizados pelo homem) mais os 2 semi-essenciais (biossintetizados aquém da necessidade diária) estão presentes nos hidrolisados da proteína de *Xanthophyllomyces*. Cromatografias preliminares (revelação com vapores de iodo, confirmando os perfis das amostras Pr versus OO da Fig. 3-B) indicam que a matéria lipídica principal da levedura (TAG = triacilgliceróis e PL = fosfolipídios) é predominantemente insaturada, outro ponto favorável para o emprego da levedura integral na formulação de rações animais para aquicultura e avicultura ou de neo-alimentos para consumo humano. Prosseguem no LQBB, como etapas sendo desenvolvidas e a vencer, dois desafios: a) obtenção de mutante de *Xanthophyllomyces* estável e hiperprodutora de astaxantina (e.g., via mutagenização com nitroso-compostos) e b) co-emprego de enzima ou complexo hidrolítico que rompa ou permeabilize a parede ce-

lular da levedura, facilitando ou incrementando o acesso ao pigmento intracelular para os animais alimentados com a mesma.

Agradecimentos

O primeiro autor agradece a colaboração da Hoffmann - La Roche (Antônio R. Chagas Lima) pela doação das amostras de carotenóides quimiossintéticos da série “Carophyll”, da CYCLO-LAB (Drs. J. Szejtli e L. Szenté; Budapest, Hungria) e da CERESTAR (Dr. R. Beck, Vilvoorde, Bélgica) pela provisão das ciclodextrinas. A colaboração pregressa da Profa. Dra. M. Baron (vice-coordenadora do projeto PAD-CT-SBIO/CNPq) e das Profas. Dras. T.M.B. Bonfim e M.B. Chociai (Departamento de Farmácia) foi importante no produtivo encaminhamento do projeto.

Referências Bibliográficas

(ordem de abordagem neste texto)

T. LATSCHA “Carotenoids – their nature and significance in animal feeds”, Department of Animal Nutrition and Health, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland, 1990.

G. BRITTON, S.LIAAEN-JENSEN & H. PFANDER “Carotenoids: isolation and analysis”, vol. 1-A, Birkhauser Verlag, Berlin, Germany, 1995.

J.D. FONTANA, M.F. GUIMARÃES, N.T. MARTINS, C.A. FONTANA & M. BARON “Culture of the astaxanthinogenic yeast *Phaffia rhodozyma* in low-cost media”. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 57/58, 413-422, 1996

J.D. FONTANA & M. BARON “Low-cost media save in astaxanthin production” *Industrial Bioprocessing*, vol. 18(9), p. 1, 8 & 9, 1996.

L. Parker (ed) “Carotenoids, Part A: Chemistry, Separation, Quantitation, and Antioxidation” *Methods in Enzymology*, vol. 213, 538p, 1992.

B. HALLIWELL & J.M.C. Gutteridge “Free Radicals in Biology and Medicine”. Oxford University Press, 3rd ed., London, 1996.

J. SZEJTLI “Cyclodextrin Technology”, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands, 437p., 1988.