

PRODUÇÃO DE PIGMENTOS, A PARTIR DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA DE RHODOTORULA SP, UTILIZANDO COMO SUBSTRATO CASCA DE MARACUJÁ-AMARELO

FAPESB¹, Ana Laura Santos Sirino², Beatriz Farias Lima³, Thamilly Moreira Silva⁴, Janaina Silva De Freitas⁵.

RESUMO

Alguns microrganismos possuem a capacidade de produzir pigmentos naturais denominados carotenoides. Entre esses microrganismos, destacam-se as leveduras, que despertam grande interesse biotecnológico devido à sua facilidade de crescimento, resultando em um excelente custo-benefício. Além disso, tem sido observado o uso de resíduos industriais, como a casca de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*), como substrato para o crescimento desses microrganismos. As leveduras do gênero *Rhodotorula*, são produtoras de carotenoides, em particular as espécies *Rhodotorula Minuta* e *Rhodotorula Mucilaginoso*, foram utilizadas neste estudo. As atividades biológicas, tanto antimicrobiana quanto citotóxica, dos pigmentos produzidos foram investigadas. A atividade antimicrobiana foi avaliada por meio da determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC) contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. O efeito citotóxico foi testado contra linhagens de células tumorais HCT116, HepG2, B16-F10 e MRC-5. Observou-se que o pigmento da *R. minuta* apresentou ação bactericida contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, enquanto o pigmento produzido pela *R. mucilaginoso* apresentou efeito bactericida contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e bactericida e bacteriostático contra *Klebsiella pneumoniae*. Não identificando efeito citotóxico contra células tumorais.

PALAVRAS-CHAVE: Fermentação Submersa, Pigmentos, *Rhodotorula*, Leveduras.

PRODUCTION OF PIGMENTS FROM SUBMERGED FERMENTATION OF RHODOTORULA SP, USING YELLOW PASSION SHELL AS SUBSTRATE

ABSTRACT

Some microorganisms have the capacity to produce natural pigments known as carotenoids. Among these microorganisms, yeast stands out, arousing significant biotechnological interest due to its ease of growth, resulting in excellent cost-effectiveness. Furthermore, the use of industrial waste, such as the peel of yellow passion fruit (*Passiflora edulis*), has been observed as a substrate for the growth of these microorganisms. Yeasts of the *Rhodotorula* genus, particularly the species *Rhodotorula Minuta* and *Rhodotorula Mucilaginoso*, were utilized in this study. The biological activities, both antimicrobial and cytotoxic, of the produced pigments were investigated. Antimicrobial activity was assessed by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli*. The cytotoxic effect was tested against tumor cell lines HCT116, HepG2, B16-F10, and MRC-5. It was observed that the pigment from *R. minuta* exhibited bactericidal action against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, whereas the pigment produced by *R. mucilaginoso* showed bactericidal effects against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and was both bactericidal and bacteriostatic against *Klebsiella pneumoniae*. No cytotoxic effect was identified against tumor cells.

KEYWORDS: Pigments, *Rhodotorula*, Submerged Fermentation, Yeasts.

¹Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB);

²Graduação em Ciências Biológicas, pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia;

³Graduação em Ciências Biológicas, pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia;

⁴Doutora em Bioquímica Molecular, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, Bahia;

⁵Departamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia/Campus Itapetinga, Bahia.

INTRODUÇÃO

Os corantes artificiais por serem considerados mais resistentes ao processamento e a pigmentação vem sendo muito utilizados pelas indústrias,mas o desenvolvimento de indícios prejudiciais à saúde como toxicidades, hiperatividade , alergias e cânceres traz preocupações aos especialistas (Pereira *et al.*, 2017).Segundo Shahid *et al.*(2013),os pigmentos naturais vêm se sobressaindo,pois proporcionam benefícios a saúde e minimizam o efeito ambiental negativo dos corantes sintéticos.

Os carotenoides fazem parte do grupo de corantes naturais,responsáveis pelas cores amarelo,laranja e vermelho de muitos produtos.São compostos lipossolúveis presentes em animais,plantas e microrganismos (Lavecchia *et al.*, 2013; Aruselvi *et al.*, 2014).As leveduras do gênero *Rhodotorula* são ótimas produtoras de tipos de carotenoides.Por isso ,essas leveduras têm chamado atenção da indústria devido às facilidades de cultivo relacionadas ao potencial crescimento de sua biomassa em substratos de baixo custo, como resíduos agroindustriais (Silva *et al.*,2021).O Brasil destaca-se como um dos maiores produtores de maracujá do mundo e 95% deste produto é destinado as indústrias de sucos que geram muitos resíduos de cascas do fruto (Cavalcante & Melo,2019).

Como antioxidantes,esses compostos possuem mecanismo de ação para neutralizar os efeitos de espécies reativas de oxigênio,que causam danos as proteínas, lipídios,DNA e RNA (Mesquita *et all*,2017).Portanto,doenças como:catarata,esclerose,podem ser prevenidas. Nesse contexto,objetivou-se realizar a investigação dasatividades biológicas (antimicrobiana e citotoxicidade) de pigmentos obtidos através de *R. minuta* URM 5197 e *R. mucilaginosa* URM 7409, utilizando a casca de maracujá- amarelo(*Passiflora edulis*),como substrato, para crescimento dos microrganismos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas leveduras da Coleção de Cultura de Microrganismos da Universidade Federalde Pernambuco - Micoteca URM - UFPE.Cultivadas com meio de cultivo Yeast Malt, transferido para o meio de cultura com casca de maracujá - amarelo(*Passiflora edulis*) em água destilada estéril.Ficando nessas condições por 5 dias para a produção do pigmento.Na extração,o líquido obtido da filtração foi centrifugado,o sobrenadante desprezado,adicionou-se água destilada,agitou-se em vórtex e centrifugou-se.O sobrenadante desprezado,sobrando o "pellet".Adicionou-se o DMSO,agitando no vórtex,seguido do banho-maria.Posteriormente centrifugada,sobrenadante retirado e armazenado em tubos.Colocou-se acetona,repetindo o processo.Por fim,as frações de acetona e DMSO foram unidas,com éter de petróleo e solução de NaCl.A fase coletada e armazenada,ficando em temperatura ambiente até a evaporação e obtenção do extrato.Para determinação da Atividade Antimicrobiana,utilizou-se cepas bacterianas de:*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853,*Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*.A atividade antibacteriana das amostras de

pigmento determinada pela concentração inibitória mínima (MIC) e a concentração bactericida mínima (MBC).As bactérias foram expandidas em caldo cérebro coração (BHI).A suspensão de bactérias foi diluída em caldo BHI estéril, até uma absorbância.Incubadas com uma solução do extrato de pigmento.As bactérias foram plaqueadas.Utilizando um controle negativo ,foi empregado para dissolver o pigmento.O MBC observou-se a menor concentração de cada amostra sem crescimento visível de colônias em placas de ágar.Posteriormente foi feito o Ensaio Antiproliferativo.Os efeitos antiproliferativos foram determinados nas linhagens de células HCT116,HepG2,B16- F10 e MRC.No Ensaio de citotoxicidade,avaliou-se a citotoxicidade dos pigmentos,realizando o ensaio do alamar blue.O cálculo da porcentagem feito com programa Prismaversão 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antimicrobiana dos pigmentos das duas leveduras foram determinadas por ensaios de microdiluição,a Concentração Inibitória Mínima (MIC) e a Concentração Bactericida Mínima (MBC) mostradas na (**Tabela 1**).O extrato da *R.minuta* URM 5197 mostrou atividade moderada contra a cepa de *Klebsiella pneumoniae*.Com *Staphylococcus aureus* apresentou atividade fraca e *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* não apresentou atividade.O MIC para o extrato da *R.mucilaginosa* URM 7409,teve atividade moderada contra *Escherichia coli*,com *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* apresentou atividade moderada,para a *Pseudomonas aeruginosa* não apresentou atividade.Segundo Faria (2012) quando a razão MBC/MIC considerando qualquer composto, está entre 1:1 e 2:1 essa substância pode ser bactericida,se essa relação for maior ou igual 2:1 pode ser bacteriostático.O extrato da *R.minuta* apresentou proporção de 1:1 característica de antibacteriano e ação bactericida nas cepas de *Staphylococcus aureus*.Já o pigmento da *R.mucilaginosa* mostrou a proporção de 1:1 para *Staphylococcus aureus* demonstrando ação bactericida e 2:1 para *Klebsiella pneumoniae* indicando ação bactericida e bacteriostática para essa cepa.O melhor perfil antimicrobiano dos pigmentos das leveduras é verificado quando são testados contra cepas de bactérias gram-positivas,devido a essas bactérias possuem lipopolissacarídeos na parede celular e isso impediria o influxo desses compostos ativos para a membrana citoplasmática das bactérias (McKeegan *et al.*, 2002).Nesse estudo foi identificado potencial bacteriostático e bactericida contra bactérias gram-negativas e bactericida para bactéria gram-positiva em menores concentrações,indicando uma possível ação antimicrobiana dos pigmentos obtida em pequenas concentrações.

Quanto a atividade citotóxica dos pigmentos em linhagens de células tumorais versus não tumorais,a **tabela 2** demonstra os dados de IC₅₀ obtidos.Os pigmentos produzidos pelas suas espécies não apresentaram atividade citotóxica promissora nas concentrações estudadas,contra células normais e tumorais.O gênero *Rhodotorula* é conhecido por produzir diferentes carotenoides,dentre eles: β -caroteno, toruleno e torularodina (Moliné *et al.*,

2012),esses dois últimos são conhecidos pelas propriedades anticancerígenas (Kot *et al.*, 2018).É provável que na amostra do pigmento, as proporções desses carotenoides tenham sido menores e isso tenha afetado o resultado.

CONCLUSÃO

Conclui-se que os pigmentos produzidos por microrganismos podem apresentar composições diferentes e isso pode impactar e interferir nas atividades biológicas. Esse estudo confirmatal fato ,pois através da realização de diferentes testes ,notou-se que o pigmento produzido por leveduras do mesmo gênero, mas de espécies diferentes nas mesmas condições de cultivo vão apresentar diferentes atividades biológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARULSELVI, I.; UMAMAHESWARI, S.; KARTHIK, C.; JAYAKRISHNA, C. **Screening of yellow pigment producing bacterial isolates from various eco-climatic areas and analysis of the carotenoid produced by the isolate.** Journal of Food Processing & Technology, v. 2014, 2014.

Cavalcante, T.Q. & Melo, M. de O. (2019). **Utilização de biomassa de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) in natura como bioadsorvente para remoção de íons de Cd e Pb em meio aquoso.** In: XXIII Seminário de Iniciação Científica da UEFS. Semana Nacional de Científica e Tecnológica - 2019, 23. doi:10.13102/semic.v0i23.6380.

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

Kot, A.M., Blazejak, S. & Kurez, A. (2016). **Rhodotorula glutinis – potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries.** Applied Microbiology and Biotechnology, 100 (14), 6103-6117. doi: 10.1007/s00253-016-7611-8.

Lavecchia, T., Rea, G., Antonacci, A., Giardi, M.T. **Healthy and adverse effects of plantderived functional metabolites: the need of revealing their content and bioactivity in a complex food matrix.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 53, 198-213, 2013.

MESQUITA, S. da 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.

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

MOLINÉ, M.; LIBKIND, D.; VAN BROOCK, M. **Production of torularhodin, torulene, and β -carotene by *Rhodotorula* yeasts.** Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), v. 898, n. 1, p. 275-283, 2012. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-918-1_19. PMID:22711133.

PEREIRA, Wander Lopes et al. **CORANTES: NATURAIS E ARTIFICIAIS.** REVISTA DETRABALHOS ACADÊMICOS-UNIVERSO CAMPOS DOS GOYTACAZES, v. 2, n. 6,2017.

SHAHID, Mohammad et al. **Recent advancements in natural dye applications: areview.** Journal of Cleaner Production, v. 53, p. 310-331, 2013.

SILVA, THAMILLY MOREIRA ; SILVA NETO, A. B. ; TEIXEIRA, J. M. ; GUALBERTO, SIMONE ANDRADE ; FREITAS, J. S. **Optimization of pigment production by *Rhodotorula minuta* URM 5197 and *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409 using yellow passion fruit peel (*Passiflora edulis*).** RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT , v. 10, p. e152101724311, 2021.

Cepas Bacterianas	PRMI($\mu\text{g/mL}$)		PRMU($\mu\text{g/mL}$)	
	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100	>1000	500	1000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Escherichia coli</i>	>1000	>1000	250	1000
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	1000	1000	500	500

TABELA 1: Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (MBC) para

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

TABELA 2: Valores de IC₅₀ para a atividade citotóxica em linhagens de células