



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**DAVID CRISTIAN RODRIGUES LUCAS**

**BIOPROSPECÇÃO DE LEVEDURAS COM  
POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE  
CAROTENOIDES PRESENTES EM UMA  
MICRORREGIÃO DO BIOMA AMAZÔNIA**

**BELÉM-PA**

**2024**

**DAVID CRISTIAN RODRIGUES LUCAS**

**BIOPROSPECÇÃO DE LEVEDURAS COM  
POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE  
CAROTENOIDES PRESENTES EM UMA  
MICRORREGIÃO DO BIOMA AMAZÔNIA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC) da Universidade Federal do Pará (UFPA), para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

**ORIENTADOR:**

Dr. Renan Campos Chisté.

**BELÉM-PA**

**2024**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará**  
**Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

---

L933b Lucas, David Cristian Rodrigues.  
Bioprospecção de leveduras com potencial para a produção de  
carotenoides presentes em uma microrregião do bioma Amazônia /  
David Cristian Rodrigues Lucas. — 2024.  
131 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Renan Campos Chisté  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,  
Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia, Belém, 2024.

1. Carotenoides. 2. Rhodotorula. 3. Biomassas. 4. Brasil. 5.  
Beta-caroteno. I. Título.

CDD 579.135

---

DAVID CRISTIAN RODRIGUES LUCAS

**BIOPROSPECÇÃO DE LEVEDURAS COM POTENCIAL PARA A  
PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES PRESENTES EM UMA  
MICRORREGIÃO DO BIOMA AMAZÔNIA**

**Data da apresentação: 14/11/2024**

**BANCA EXAMINADORA:**

---

**Dr. Renan Campos Chisté**

(PPGBIOTEC/UFPA – Orientador)

---

**Dr. Rafael Azevedo Baraúna**

(PPGBIOTEC/UFPA – Membro interno)

---

**Dra. Juliana Silva Cassoli**

(PPGBIOTEC/ICB/UFPA – membra interna)

---

**Dr. Nelson Rosa Ferreira**

(PPGCTA/ITEC/UFPA – membro externo)

Dedico essa dissertação de mestrado ao meu eu do futuro, pois essa etapa foi mais um degrau para a conquista que será alcançada mais à frente.

## **AGRADECIMENTOS**

Meus agradecimentos irão, em primeiro lugar, aos meus familiares (mãe, pai, irmã e sobrinhos), principalmente minha mãe Dilma Lucas e irmã Diane Lucas, que me ajudaram, ajudam e ajudarão sempre. Sinto-me grato pelo apoio emocional e financeiro destinados a mim, por elas, durante minha vida de pesquisador. Além deles, quero também agradecer ao meu amor, Amanda L. Dias Brasil, a mulher companheira e a quem admiro e amo, seu apoio também foi importante. Obrigado por ouvir as explicações sobre minha pesquisa. Não posso esquecer de meu honorável e sempre solícito orientador Dr. Renan Campos Chisté, um dos profissionais mais presentes, inteligentes e gentis que já tive até agora em minha carreira acadêmica. Ainda, agradeço aos professores Dr. Nelson e Dr. Gustavo, que também me ajudaram com norteamentos e esclarecimentos de algumas dúvidas ao longo deste trabalho, bem como ao meu amigo Gilson Júnior, essa amizade que surgiu durante essa pesquisa e se perdurou, muito obrigado pelos ensinamentos em microbiologia e por estar sempre disponível para me auxiliar. Obrigado aos meus colegas de LAMPBIO e LABIOTEC, pelas conversas e pela ajuda quando solicitava, destacando o Bruno Nogueira e Júnior Modesto. Meus agradecimentos aos parceiros do EngBio (Laboratório de Engenharia Genética), principalmente aos professores Dr. Artur Silva, Dr. Diego Assis e Soraya que foram fundamentais na etapa de identificação molecular, não tenho palavras para descrever esse grande ajuda, principalmente vindas da Soraya, uma mulher muito inteligente, paciente e didática. Sou grato ao PPGBIOTEC por proporcionar o aprendizado em sala de aula, à Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro imprescindível durante todo o processo. Por fim, percebe-se que todos os citados contribuíram de alguma maneira para o bom êxito dessa pesquisa, pois como sempre digo a mim mesmo e aos demais, “ninguém faz ciência sozinho”, todas as etapas e pesquisas somam para contribuírem para um mundo melhor, até mesmo as falhas momentâneas são uma forma de aprendizado e evolução constante.

“Educação não transforma o mundo.  
Educação muda as pessoas. Pessoas  
transformam o mundo”

Paulo Freire.

## RESUMO

Os carotenoides são compostos bioativos usados como pigmentos naturais e podem ser encontrados em plantas, animais, algas e microrganismos. Alguns desses compostos, como o  $\beta$ -caroteno, são precursores da vitamina A, e possuem benefícios à saúde humana como: o fortalecimento do sistema imunológico e a redução do risco de doenças crônicas degenerativas. Na indústria, a produção de carotenoides é obtida majoritariamente por síntese química ou por meio de extrato de algas e plantas, no entanto, com a crescente preocupação com o uso de aditivos químicos nos alimentos por parte de muitos consumidores, se faz pertinente o interesse em produzir carotenoides por processos biotecnológicos, e diversos microrganismos podem sintetizá-los, como por exemplo as leveduras. Neste trabalho, foi realizado um estudo de caráter exploratório focado na identificação molecular de leveduras produtoras de carotenoides, disponíveis em uma microrregião do bioma Amazônia, com foco em evidenciar microrganismos promissores para futuras aplicações industriais. Foram coletadas amostras de folhas, flores, solo e cascas de árvores, e dentre elas, 4 cepas promissoras foram isoladas e identificadas da filosfera de filodendro (*Philodendron hederaceum*): *Rhodospiridiobolus ruineniae* (PH-18<sub>(I)</sub>), *Rhynchogastrema noutii* ou *Hannaella pagnoccae* (dPH-8<sub>(I)</sub>), *Leucosporidium egoroviorum* ou *Lyomyces sp.* (dPH-8<sub>(II)</sub>), e *Rhodotorula diobovata* ou *Rhodotorula glutinis* (PH-22<sub>(II)</sub>); a cepa PH-18<sub>(I)</sub> apresentou rendimento de biomassa de 0,26 a 0,76% e teor de carotenoides totais de 139,70  $\mu\text{g/g}$  biomassa seca; a cepa dPH-8<sub>(I)</sub> apresentou rendimento de biomassa de 0,43 a 0,96% e teor de carotenoides totais de 54,26  $\mu\text{g/g}$ ; a cepa dPH-8<sub>(II)</sub> exibiu rendimento de biomassa de 0,35 a 1,12% e teor de carotenoides totais de 52,71  $\mu\text{g/g}$ ; enquanto a cepa PH-20<sub>(II)</sub> apresentou rendimento de biomassa de 11,63% e 23,67% e teor de carotenoides totais de 44,98  $\mu\text{g/g}$ . Os carotenoides identificados nesse estudo foram 13Z- $\beta$ -caroteno, (all-E)- $\beta$ -caroteno e 9Z- $\beta$ -caroteno, sendo o (all-E)- $\beta$ -caroteno o majoritário. Os resultados encontrados neste estudo destacam uma perspectiva muito promissora para futuras prospecções de leveduras produtoras de carotenoides no bioma Amazônia, sendo uma excelente alternativa para substituir o processo de obtenção dos carotenoides por via sintética ou por exploração de fontes vegetais.

Palavras-chave: Carotenoides; *Rhodotorula*; biomas; Brasil; Amazônia;  $\beta$ -caroteno.

## ABSTRACT

Carotenoids are bioactive compounds used as natural pigments and are found in plants, animals, algae and microorganisms. Some of these compounds are precursors of vitamin A and have benefits to human health such as strengthening the immune system and reducing the risk of chronic degenerative diseases. In industry, the production of carotenoids is obtained mainly by chemical synthesis or through algae and plant extracts. However, with the growing concern about utilization of chemical additives in food by many consumers, the interest in obtaining them through biotechnological processes and diverse microorganisms may synthesize them, such as yeasts. In this work, an exploration study was carried out focused on molecular identification of carotenoid-producing yeasts available in a microregion of Amazonia biome, with the aim of highlighting promising microorganisms for future industrial applications. Samples were collected from leaves, flowers, soil, and bark trees, among them, 4 promising strains were isolated and identified from phyllosphere of philodendron (*Philodendron hederaceum*): *Rhodospiridiobolus ruineniae* (PH-18<sub>(I)</sub>), *Rhynchogastrema noutii* or *Hannaella pagnoccae* (dPH-8<sub>(I)</sub>), *Leucosporidium egoroviorum* or *Lyomyces* sp. (dPH-8<sub>(II)</sub>), and *Rhodotorula diobovata* or *Rhodotorula glutinis* (PH-22<sub>(II)</sub>). The strain PH-18(I) showed a biomass yield of 0.26% to 0.76% and total carotenoid content of 139.70 µg/g of dry biomass. The strain dPH-8(I) showed a biomass yield of 0.43% to 0.96 % and total carotenoid content of 54.26 µg/g. The strain dPH-8(II) demonstrated a biomass yield of 0.35% to 1.12% and total carotenoid content of 52.71 µg/g, while the strain PH-20(II) demonstrated a biomass yield of 11.63 % to 23.67 % and total carotenoid content of 44.98 µg/g. The carotenoids identified in this study were 13Z-β-carotene, (all-E)-β-carotene and 9Z-β-carotene, being (all-E)-β-carotene the majority. Results found in this study highlight a promising perspective for future applications of carotenoid-producing yeasts in the Amazonia biome, being an excellent alternative to replace the process of obtaining carotenoids by synthetic means or by exploitation of vegetal sources.

**Keywords:** Carotenoids; *Rhodotorula*; biomes; Brazil; Amazon; β-carotene.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

|                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> - Caroteno ( $\beta$ -caroteno) e uma Xantofila (Torularrodina) .....                                                                             | 23 |
| <b>Figura 2</b> - Morfologia de algumas espécies de <i>Rhodotorulas</i> .....                                                                                     | 25 |
| <b>Figura 3</b> - Via biossintética dos carotenoides em leveduras .....                                                                                           | 27 |
| <b>Figura 4</b> - Conversão de $\beta$ -caroteno em duas moléculas de vitamina A pela clivagem enzimática mediada pela $\beta$ -caroteno 15,15'-oxigenase 1 ..... | 31 |

### CAPÍTULO II

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 1</b> - Examples of <i>Rhodotorula</i> yeasts and their subglobose, ovoid, ellipsoidal and elongate forms, as visualized by microscopy. The images are authored by our research group and were taken to illustrate this review. <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>R. mucilaginosa</i> and <i>R. araucariae</i> were acquired from the André Tosello Foundation (Campinas, São Paulo, Brazil). Photo by Gilson Celso Albuquerque Chagas Junior. .... | 43 |
| <b>Figure 2</b> - Biosynthetic pathway of the carotenoid production in yeasts, adapted from (Frengova & Beshkova, 2009) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 45 |
| <b>Figure 3</b> - The main carotenoids reported for yeasts from genus <i>Rhodotorula</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 46 |
| <b>Figure 4</b> - Illustration of Brazilian export (in thousand per year) and import (in million per year) of carotenoid and their derivatives. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 51 |
| <b>Figure 5</b> - Layout of <i>Rhodotorula</i> species in Brazilian biomes.. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 59 |

### CAPÍTULO III

|                                                                                                                                                                          |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 1</b> - Amostra de solo do PCT Guamá .....                                                                                                                     | 899 |
| <b>Figura 2</b> - Placa da amostra de solo do PCT Guamá ( $10^{-3}$ ). ....                                                                                              | 90  |
| <b>Figura 3</b> - Amostras de gengibre-vermelho ( <i>A. purpurata</i> ) e de flor e folha de jambo ( <i>S. malaccense</i> ) juntamente com suas respectivas placas ..... | 90  |
| <b>Figura 4</b> - Amostra de filodendro ( <i>P. hederaceumi</i> ) .....                                                                                                  | 92  |
| <b>Figura 5</b> - Placas da amostra de solo do PCT Guamá (diluição $10^{-3}$ ) em meio PDA com cloranfenicol (100 mg/mL).....                                            | 933 |
| <b>Figura 6</b> - Placas de gengibre-vermelho ( <i>A. purpurata</i> ) em meio PDA com cloranfenicol (100 mg/mL). ....                                                    | 933 |
| <b>Figura 7</b> - Placas folha e flor de jambo ( <i>S. malaccense</i> ) em meio PDA com cloranfenicol (100 mg/mL) .....                                                  | 944 |

|                                                                                                                                                 |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>Figura 8</b> - Placas das amostras de filodendro ( <i>P. hederaceum</i> ), diluição $10^{-1}$ em meio PDA com cloranfenicol (100 mg/mL)..... | 944  |
| <b>Figura 9</b> - Placas das amostras de filodendro ( <i>P. hederaceum</i> ), diluição $10^{-2}$ em meio PDA com cloranfenicol (100 mg/mL)..... | 977  |
| <b>Figura 10</b> - Comparação da pigmentação das cepas antes e depois do processo fermentativo .....                                            | 102  |
| <b>Figura 11</b> - Mudanças fenotípicas das cepas SM-1 e PH-13 .....                                                                            | 1033 |
| <b>Figura 12</b> - Aspecto das cepas após a purificação .....                                                                                   | 1044 |
| <b>Figura 13</b> - Perfil cromatográfico dos carotenoides por HPLC-DAD.....                                                                     | 1122 |

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

|                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Table 1</b> - Brazilian import and export of carotenoids and their derivatives from 2014 to 2024. ....                           | 49 |
| <b>Table 2</b> - Overview Brazilian import and export of carotenoids and their derivatives from 2014 to 2024. ....                  | 50 |
| <b>Table 3</b> - Yeasts of genus <i>Rhodotorula</i> found in the Brazilian biomes as promising natural sources of carotenoids. .... | 54 |

### CAPÍTULO III

|                                                                                                                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 1</b> - Colônias isoladas das amostras provenientes do campus da Universidade Federal do Pará (UFPA).....                                                   | 98  |
| <b>Tabela 2</b> - Concentrações das suspensões celulares das placas purificadas antes do processo fermentativo e após o processo, e seus rendimentos percentuais..... | 101 |
| <b>Tabela 3</b> - Identificação molecular das cepas após comparação de nucleotídeos dos dados do GenBank.....                                                         | 104 |
| <b>Tabela 4</b> - Liofilização da biomassa dos fermentados.....                                                                                                       | 109 |
| <b>Tabela 5</b> - Teor de carotenoides totais nas biomassas liofilizadas de leveduras.....                                                                            | 110 |
| <b>Tabela 6</b> - Características cromatográficas, UV-visíveis e teores de carotenoides da biomassa liofilizada de leveduras, obtidos por HPLC-DAD.....               | 112 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                               |                                                                    |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| ABA                           | Ácido abscísico                                                    |
| Acetil-CoA                    | Acetil Coenzima A                                                  |
| AM                            | Amazonas state                                                     |
| BA                            | Bahia state.                                                       |
| CCD                           | Central Composite Design.                                          |
| CE                            | Ceará state                                                        |
| DMAPP                         | Dimetilalil-pirofosfato                                            |
| DNA                           | Deoxyribonucleic Acid, ácido desoxirribonucleico                   |
| SEM                           | Ethyl-methane sulfonate                                            |
| FPP                           | Farnesila-pirofosfato                                              |
| GGPP                          | Geranil geranil-pirofosfato                                        |
| GO                            | Goiás state                                                        |
| GPP                           | geranil-pirofosfato                                                |
| GPYM                          | Glucose, Peptone, Yeast extract, Malt                              |
| GYMP                          | Glucose, Yeast extract, Malt, Peptone                              |
| H <sub>2</sub> O <sub>p</sub> | Água peptonada                                                     |
| HMG-CoA                       | 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA                                      |
| HPLC                          | High Performance Liquid Chromatography                             |
| IBGE                          | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística                    |
| IPP                           | Isopentenilpirofosfato                                             |
| LED                           | <i>light-emitting diode</i>                                        |
| MG                            | Minas Gerais state                                                 |
| MGYP                          | Malt extract Glucose Yeast extract Peptone agar                    |
| MT                            | Mato Grosso state                                                  |
| MVA                           | Ácido mevalônico                                                   |
| NCBI                          | National Center for Biotechnology Information                      |
| NR                            | Not reported                                                       |
| NTG                           | N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine                               |
| PA                            | Pará state                                                         |
| PBS                           | (Phosphate-Buffered Saline - solução salina tamponada com fosfato) |
| PCR                           | Polymerase chain reaction method                                   |
| PDA                           | Potato Dextrose Agar                                               |

|      |                                                                                 |
|------|---------------------------------------------------------------------------------|
| PE   | Pernambuco state                                                                |
| PPS  | ( <i>Protein Precipitation Solution</i> – Solução de Precipitação de Proteínas) |
| RR   | Roraima state                                                                   |
| RS   | Rio Grande do Sul state                                                         |
| SDA  | Sabouraud Dextrose Agar                                                         |
| SLs  | Strigolactonas                                                                  |
| SP   | São Paulo state                                                                 |
| UFC  | Federal University of Ceará                                                     |
| YE   | Yeast Extract                                                                   |
| YEPD | Yeast Extract Peptone Dextrose                                                  |
| YM   | Yeast Malt                                                                      |
| YMA  | Yeast Mannitol Agar                                                             |
| YPD  | Yeast Peptone Dextrose                                                          |
| YPG  | Yeast Extract Peptone Glycerol                                                  |

## SUMÁRIO

|             |                                                                                                                                                              |           |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>    | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                                      | <b>18</b> |
| <b>2</b>    | <b>OBJETIVOS .....</b>                                                                                                                                       | <b>20</b> |
| <b>2.1.</b> | <b>Objetivo Geral .....</b>                                                                                                                                  | <b>20</b> |
| <b>2.2.</b> | <b>Objetivos Específicos .....</b>                                                                                                                           | <b>20</b> |
| <b>3</b>    | <b>ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO .....</b>                                                                                                                      | <b>21</b> |
|             |                                                                                                                                                              |           |
|             | <b>CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA I.....</b>                                                                                                             | <b>22</b> |
| <b>1.</b>   | <b>CAROTENOIDES.....</b>                                                                                                                                     | <b>23</b> |
| <b>2.</b>   | <b>PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS CAROTENOIDES .....</b>                                                                                                        | <b>24</b> |
| <b>3.</b>   | <b>PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR MICRORGANISMOS.....</b>                                                                                                      | <b>24</b> |
| <b>4.</b>   | <b>LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Rhodotorula</i> .....</b>                                                                                                          | <b>25</b> |
| <b>5.</b>   | <b>BIOSSÍNTESE DE CAROTENOIDES.....</b>                                                                                                                      | <b>26</b> |
| <b>6.</b>   | <b>PRINCIPAIS CAROTENOIDES.....</b>                                                                                                                          | <b>28</b> |
| <b>6.1.</b> | <b>β-caroteno .....</b>                                                                                                                                      | <b>28</b> |
| <b>6.2.</b> | <b>γ-caroteno .....</b>                                                                                                                                      | <b>29</b> |
| <b>6.3.</b> | <b>Toruleno.....</b>                                                                                                                                         | <b>29</b> |
| <b>6.4.</b> | <b>Torularrodina.....</b>                                                                                                                                    | <b>29</b> |
| <b>6.5.</b> | <b>Astaxantina.....</b>                                                                                                                                      | <b>30</b> |
| <b>7.</b>   | <b>MERCADO DE CAROTENOIDES .....</b>                                                                                                                         | <b>30</b> |
| <b>8.</b>   | <b>CONCLUSÃO.....</b>                                                                                                                                        | <b>31</b> |
| <b>9.</b>   | <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                                                                                     | <b>33</b> |
|             |                                                                                                                                                              |           |
|             | <b>CAPÍTULO II – REVISÃO DE LITERATURA II.....</b>                                                                                                           | <b>39</b> |
|             | <b>YEASTS OF GENUS <i>Rhodotorula</i> FOUND IN THE BRAZILIAN BIOMES AS PROMISING NATURAL SOURCES FOR THE BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF CAROTENOIDS.....</b> | <b>39</b> |

|                                                                                                                                        |               |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                                                                                  | <b>41</b>     |
| <b>1. INTRODUCTION .....</b>                                                                                                           | <b>42</b>     |
| <b>2. YEASTS OF GENUS <i>Rhodotorula</i> .....</b>                                                                                     | <b>43</b>     |
| <b>3. MAIN CAROTENOIDS PRODUCED BY YEASTS FROM GENUS <i>Rhodotorula</i> .....</b>                                                      | <b>44</b>     |
| <b>4. CAROTENOID MARKET.....</b>                                                                                                       | <b>48</b>     |
| <b>5. YEASTS OF GENUS <i>Rhodotorula</i> FOUND IN THE BRAZILIAN BIOMES.....</b>                                                        | <b>51</b>     |
| <b>6. OTHER RELEVANT INSIGHTS.....</b>                                                                                                 | <b>62</b>     |
| <b>7. CONCLUSION AND FUTURE PERSPECTIVES.....</b>                                                                                      | <b>64</b>     |
| <b>8. REFERENCES .....</b>                                                                                                             | <b>66</b>     |
| <br><b>CAPÍTULO III – ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>                                                                                      | <br><b>77</b> |
| <b>BIOPROSPECÇÃO DE LEVEDURAS COM POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES, PRESENTES EM UMA MICRORREGIÃO DO BIOMA AMAZÔNIA .....</b> | <b>77</b>     |
| <b>RESUMO.....</b>                                                                                                                     | <b>78</b>     |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                             | <b>79</b>     |
| <b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                                                                      | <b>81</b>     |
| <b>2.1. Coleta de amostras e prospecção de leveduras produtoras de carotenoides.....</b>                                               | <b>81</b>     |
| <b>2.2. Isolamento e purificação das leveduras .....</b>                                                                               | <b>82</b>     |
| <b>2.3. Manutenção das cepas.....</b>                                                                                                  | <b>82</b>     |
| <b>2.4. Ensaio de viabilidade celular .....</b>                                                                                        | <b>83</b>     |
| <b>2.5. Reativação das cepas e preparo para extração de DNA .....</b>                                                                  | <b>84</b>     |
| <b>2.6. Identificação molecular .....</b>                                                                                              | <b>84</b>     |
| <b>2.6.1. Extração de DNA .....</b>                                                                                                    | <b>84</b>     |
| <b>2.6.2. Quantificação e preparo para a eletroforese.....</b>                                                                         | <b>85</b>     |
| <b>2.6.3. PCR.....</b>                                                                                                                 | <b>86</b>     |
| <b>2.6.4. Reação de sequenciamento .....</b>                                                                                           | <b>86</b>     |
| <b>2.6.5. Precipitação da reação .....</b>                                                                                             | <b>86</b>     |

|                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.6.6 Análise de sequenciamento .....                                         | 87  |
| 2.7. Preparo do inóculo e produção de carotenoides .....                      | 87  |
| 2.8. Determinação da biomassa de leveduras.....                               | 88  |
| 2.9. Determinação do teor de carotenoides totais por espectrofotometria ..... | 88  |
| 2.10. Determinação do perfil de carotenoides por cromatografia .....          | 88  |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                               | 89  |
| 3.1. Prospeção de leveduras em amostras coletadas no microbioma da UFPA.....  | 89  |
| 3.2. Viabilidade das leveduras isoladas antes e após a fermentação .....      | 100 |
| 3.3. Mudanças morfológicas observadas para colônias selecionadas .....        | 103 |
| 3.4. Identificação molecular das leveduras isoladas .....                     | 104 |
| 3.5. Rendimento de biomassa das leveduras isoladas.....                       | 109 |
| 3.6. Teor de carotenoides totais produzido pelas leveduras isoladas .....     | 110 |
| 3.7. Perfil de carotenoides produzido pelas leveduras isoladas .....          | 111 |
| 4. CONCLUSÃO.....                                                             | 116 |
| 5. REFERÊNCIAS .....                                                          | 118 |

## 1 INTRODUÇÃO

Os carotenoides são compostos bioativos lipossolúveis usados como pigmentos naturais, que são encontrados em plantas, animais, algas e microrganismos. Mais de 750 carotenoides foram relatados nas literaturas, em sua grande maioria são constituídos por oito unidades de isoprenos com um esqueleto de 40 carbonos, formando os terpenoides. Além disso, eles podem ser divididos em dois grandes grupos: os carotenos, formado por compostos com hidrocarbonetos, e xantofilas (Igreja et al., 2021; Maoka, 2020).

Alguns desses compostos são precursores da vitamina A, possuem efeito potencial contra o estresse oxidativo, sequestrando importantes espécies reativas de oxigênio para o sistema fisiológico e alimentício, como o radical peroxila ( $\text{ROO}\bullet$ ), e o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) e possuem benefícios associados ao fortalecimento do sistema imunológico e redução do risco de doenças crônicas degenerativas, como o câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular, catarata, inflamação e outros. Logo, devido a essas propriedades, eles possuem aplicação tecnológica e industrial na área farmacêutica, química, cosmética, alimentícia e biotecnológica (Frengova & Beshkova, 2009; Igreja et al., 2021; Vila et al., 2008).

Na indústria, a produção de carotenoides é obtida majoritariamente por síntese química ou por meio de extrato de algas e plantas (Frengova & Beshkova, 2009). Os valores para a produção de carotenoides como astaxantina varia entre \$1000 e \$7000/kg, para o  $\beta$ -caroteno entre \$343,54 e \$499,59/Kg (Igreja et al., 2021; Khoo et al., 2019; C. Zhang et al., 2020). Não obstante, com a crescente preocupação com o uso de aditivos químicos nos alimentos e o aumento de consumidores desejando consumi-los de forma natural alinhada a possibilidade de baratear ainda mais o processo de obtenção de carotenoides, se faz pertinente o interesse de obtê-los por processos biotecnológicos.

De acordo com a BCC Research (2022), o mercado global de carotenoides atingiu cerca de US\$ 2 bilhões, com previsão de alcançar US\$ 2,7 BI em 2027, com a taxa de crescimento anual de 5,7%. Entre os principais carotenoides comercializados globalmente estão: annatto, astaxantina,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -apo-8-carotenal,  $\beta$ -apo-8-carotenal-ester, cantaxantina, capsantina, luteína, licopeno, zeaxantina. No Brasil, de acordo com os dados estatísticos do Comércio Exterior do Brasil (2023), em exportações foram adquiridos US\$1.321.334,00 e gastos US\$ 95.565.654,00 em importações no período de 2012 até maio de 2022. Todavia há um cenário desfavorável ao Brasil, uma vez que o país é detentor de uma grande diversidade, podendo esta possuir plantas e microrganismos capazes de sintetizar carotenoides, contribuindo assim, para

o crescimento das exportações, aumentando o lucro brasileiro e invertendo o quadro nesse mercado.

Como mencionado anteriormente, os carotenoides, em sua maioria (90%), são produzidos via síntese química, entretanto, a demanda de consumidores por produtos com corantes naturais vem crescendo, e a aplicabilidade dos carotenoides não se limita somente a indústria de alimentos, mas abrange-se para a avicultura como aditivos alimentares; na farmacologia com a utilização contra a fotossensibilidade, diabetes, distúrbios neurológicos e na cosmética como intensificador e prolongador do bronzeado (Mesquita et al., 2017; Vila et al., 2008). Há uma grande limitação e um alto custo da produção de carotenoides via síntese química e pela extração de plantas (Mata-Gómez et al., 2014), nesse sentido, a utilização de microrganismos para a obtenção de carotenoides surge como uma alternativa para preencher essa lacuna na indústria.

Diversos microrganismos podem sintetizar carotenoides, como é o caso de algumas leveduras. Dentre elas as do gênero *Rhodotorula*, que consiste em uma levedura membra dos basidiomicetos, é aeróbica estrita, e em sua fase estacionária de crescimento produz grandes quantidades de lipídios e carotenoides. Podem estar presentes no ar e no solo assim como na pele humana, comida, frutas e fezes. Muitas espécies basidiomicéticas são conhecidas apenas em sua fase assexuada, sendo classificadas em gêneros anamórficos heterogêneos, as quais podem ser distribuídas em dois subfilos: Pucciniomycotina e Ustilagomycotina (Biswas et al., 2001; Mokhtari et al., 2011; Yurkov et al., 2015).

As *Rhodotorulas* que produzem os carotenoides os acumulam intracelularmente, o teor deles pode variar entre as diferentes ou até entre as mesmas espécies, haja vista que os fatores: bioma, condição de crescimento, procedimentos de extração, temperatura, pH, agitação e taxa de aeração e irradiação da luz, afetam consideravelmente a produção. Os principais carotenoides produzidos por elas são o  $\beta$ -caroteno, toruleno, toularodina e astaxantina (Buzzini et al., 2007; Igreja et al., 2021).

Em virtude disso, considerando que o Brasil é rico em biodiversidade, alguns estudos relataram a presença de *Rhodotorulas* no Cerrado (W. R. C. Machado, 2018), na Mata Atlântica (Alvarado-Huallanco & Maugeri-Filho, 2010), na Caatinga (Castelo-Branco et al., 2021), na Amazônia (Salvadori et al., 2014, 2017), porém não foi feita uma investigação exploratória em nenhuma dessas regiões, existindo ainda, a possibilidade de uma vasta presença de seres capazes de biotransformar esses carotenoides. A presente proposta tem por objetivo fazer um trabalho de caráter exploratório para identificar as leveduras do gênero *Rhodotorula* disponíveis

no bioma Amazônia e avaliar a eficiência e o perfil de produção de carotenoides para futuras aplicações no setor alimentício.

## **2 OBJETIVOS**

Os objetivos traçados para essa pesquisa foram cuidadosamente pensados a fim de se conseguir extrair o máximo de cada etapa que será executada, podendo ocorrer a modificação de alguns objetivos específicos.

### **2.1 Objetivo Geral**

Bioprospectar espécies de leveduras presentes no bioma Amazônia com potencial para a produção de elevados teores de carotenoides para futuras aplicações no setor alimentício.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Isolar as leveduras com características carotenogênicas nas amostras;
- Identificar as leveduras utilizando a técnica de sequenciamento do DNA;
- Cultivar as leveduras identificadas para determinar o teor e o perfil de carotenoides produzidos;
- Comparar a eficiência e o perfil da produção de carotenoides entre as leveduras identificadas objetivando a construção de uma biblioteca.

### 3 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação foi organizada da seguinte maneira: o **Capítulo I** apresenta o manuscrito de revisão de literatura I; o **Capítulo II** apresenta o manuscrito a ser submetido para publicação no formato artigo de revisão intitulado “Yeasts of genus *Rhodotorula* found in the Brazilian biomes as promising natural sources for the biotechnological production of carotenoids”; e por último, o **Capítulo III** apresenta o manuscrito da dissertação completo com os resultados e discussões.

## **CAPÍTULO I – MANUSCRITO DE REVISÃO DE LITERATURA I**

## 1. CAROTENOIDES

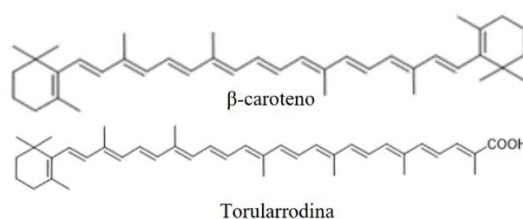
Os carotenoides são terpenoides de 40 carbonos derivados da biossíntese de duas unidades de pirofosfato de geranyl-geranyl transferase, são solúveis em solvente não polares e são encontrados, geralmente, em gotículas lipídicas intracelulares (Mannazzu et al., 2015; Mata-Gómez et al., 2014). A importância desses compostos bioativos é devido ao aumento da resposta imune que eles proporcionam além de suas conversões em vitamina A (Frengova & Breshkova, 2009).

Esses pigmentos naturais podem ser encontrados em plantas e microrganismos (archeas, bactérias, cianobactérias, fungos, leveduras), já os animais obtêm os carotenoides pela ingestão de alimentos (Mohan *et al.* 2018). Cerca de 60 carotenoides foram identificados em frutas e vegetais consumidos por humanos, além disso, eles podem ser encontrados em alimentos como ovos, milho, cenouras (Fraser & Bramley, 2004), até o ano de 2018 cerca de 850 carotenoides foram reportados em literaturas, eles apresentam ações fotoprotetivas, antioxidante, e são atrativos de cor (Maoka, 2020).

Os carotenoides fornecem cores às frutas, aos legumes e aos vegetais, enquanto nos animais, as cores características dos carotenoides são fornecidas, justamente, devido a ingestão de alimentos ricos em carotenoides (Fraser & Bramley, 2004). A clivagem dos carotenoides produz compostos com atividade biológica como os hormônios ácido abscísico (ABA) e strigolactonas (SLs) (Morelli & Rodriguez-Concepcion, 2023).

Os exemplos de carotenoides são  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, luteína, licopeno, toruleno, torularrodina entre outros. Eles podem ser classificados em dois grupos: os carotenos (compostos hidrocarbonados) e xantofilas (derivados oxigenados dos carotenos) (Paul et al., 2023) (**Figura 1**).

**Figura 1** - Caroteno ( $\beta$ -caroteno) e uma Xantofila (Torularrodina)



Fonte: Autor

## 2. PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS CAROTENOIDES

Uma vez que os carotenoides são precursores da vitamina A, eles possuem um importante valor comercial e nutricional. Logo, esses compostos seriam de grande importância para a saúde, pois a baixa ingestão de vitamina A é o principal problema em regiões mundiais subdesenvolvidas. Isso resulta em deficiência de produção de lágrimas, cegueira, além de morte pré-matura em crianças (B. D. Ribeiro et al., 2011). Assim, a vitamina A apresenta, também, benefícios sistêmicos como crescimento e eficiência reprodutiva, além de conservar a pele. As moléculas de carotenoides fornecem propriedades antioxidantes, melhoramento da imunidade, redução de riscos de doenças degenerativas como câncer, doenças cardíacas, catarata e degeneração macular. Proporcionam, ainda, proteção contra raios solares quando há aumento da ingestão dos carotenoides e, conseqüentemente aumento deles no sistema sanguíneo (Mata-Gómez et al., 2014).

## 3. PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR MICRORGANISMOS

A produção industrial de carotenoides naturais acontece das seguintes maneiras: (1) extração sólido-líquido a partir de plantas; (2) usando fungos, bactérias, microalgas e leveduras em processos biotecnológicos; ou (3) através da síntese química (Mata-Gómez et al., 2014; Voutilainen et al., 2006). Todavia, algumas dessas formas apresentam algumas desvantagens. No caso da síntese química, seu processo resulta em resíduos e rejeitos perigosos ao meio-ambiente, em relação a produção vegetal, esse método depende de sazonalidade e viabilidade geográfica. Já a produção por microrganismos tem sua vantagem de não depender de fatores que a produção por plantas possui, além de não produzir resíduos e rejeitos nocivos. Acrescenta-se outra vantagem, o rendimento dos pigmentos produzidos por microrganismos pode ser melhorado com o uso de substratos de baixo custo (Buzzini et al., 2007; Cheng & Yang, 2016; Ungureanu et al., 2013).

Os carotenoides são amplamente distribuídos nos microrganismos incluindo bactérias, fungos, algas e leveduras (Igreja et al., 2021), devido as vantagens já citadas, a produção comercial desses pigmentos por esses seres tende a aumentar e substituir gradativamente os carotenoides sintéticos.

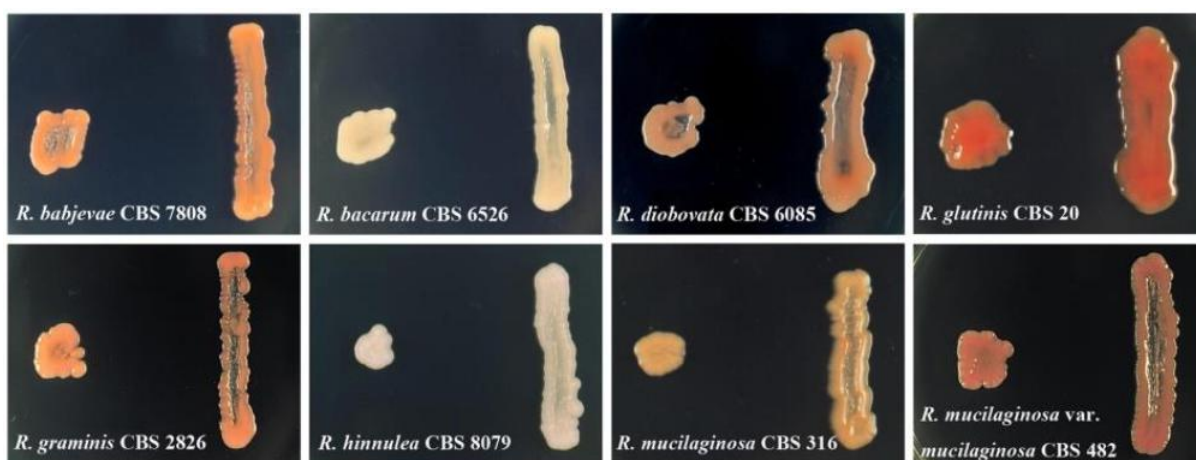
Muitos estudos relataram alguns carotenoides sintetizados por fungo como *Blakeslea trispora*, que produziu  $\beta$ -caroteno (Papaioannou & Liakopoulou-Kyriakides, 2010); por bolor (*Phycomyces blakesleeanus*) também com  $\beta$ -caroteno (Almeida & Cerdá-Olmedo, 2008); por

bactéria (*Flavobacterium sp.*) produziu Zeaxantina (Ram et al., 2020) e por leveduras (*Rhodotorula mucilaginosa*) com  $\beta$ -caroteno, torularrodina e toruleno (Kot et al., 2021). Entre os seres relatados, os do gênero *Rhodotorula*, os quais serão mais trabalhados nessa pesquisa, podem produzir uma gama variada de pigmentos naturais. Essa síntese varia conforme a espécie, o meio de cultivo utilizado e as condições de cultivo (Igreja et al., 2021; Mata-Gómez et al., 2014), podendo suas produções de carotenoide variarem de  $100 \mu\text{g.g}^{-1}$  para até mais de  $500 \mu\text{g.g}^{-1}$  (Aksu & Eren, 2007; Borowitzka et al., 1991; Davoli et al., 2004; Kobayashi et al., 1991; Sarada et al., 2002).

#### 4. LEVEDURAS DO GÊNERO *Rhodotorula*

*Rhodotorula* é um gênero de levedura pigmentar unicelular, que pertence ao filo Basidiomycota, à família Cryptococcaceae, e subfamília Rhodotorulodae. A primeira *Rhodotorula* encontrada foi na década de 1930, em um queijo, pelo microbiologista canadense Charles Harrison. O nome do gênero vem das palavras *rhodos* (que em grego significa, vermelho) e *torula* (que em latin significa, protuberância). Existem mais de 164 espécies incluindo *R. glutinis*, *R. toruloides*, *R. mucilaginosa*, *R. graminis* entre outras (**Figura 2**). As células das cepas dessa levedura são polifiléticas (que descende de dois ou mais ancestrais independente), parecendo subgloboso, ovoide, elipsoidal e alongado (Barnett, 2004; Krzysciak et al., 2007; Kurtzman et al., 2011; Tang et al., 2019).

**Figura 2** - Morfologia de algumas espécies de *Rhodotorulas*



Fonte: Tang et al. (2019)

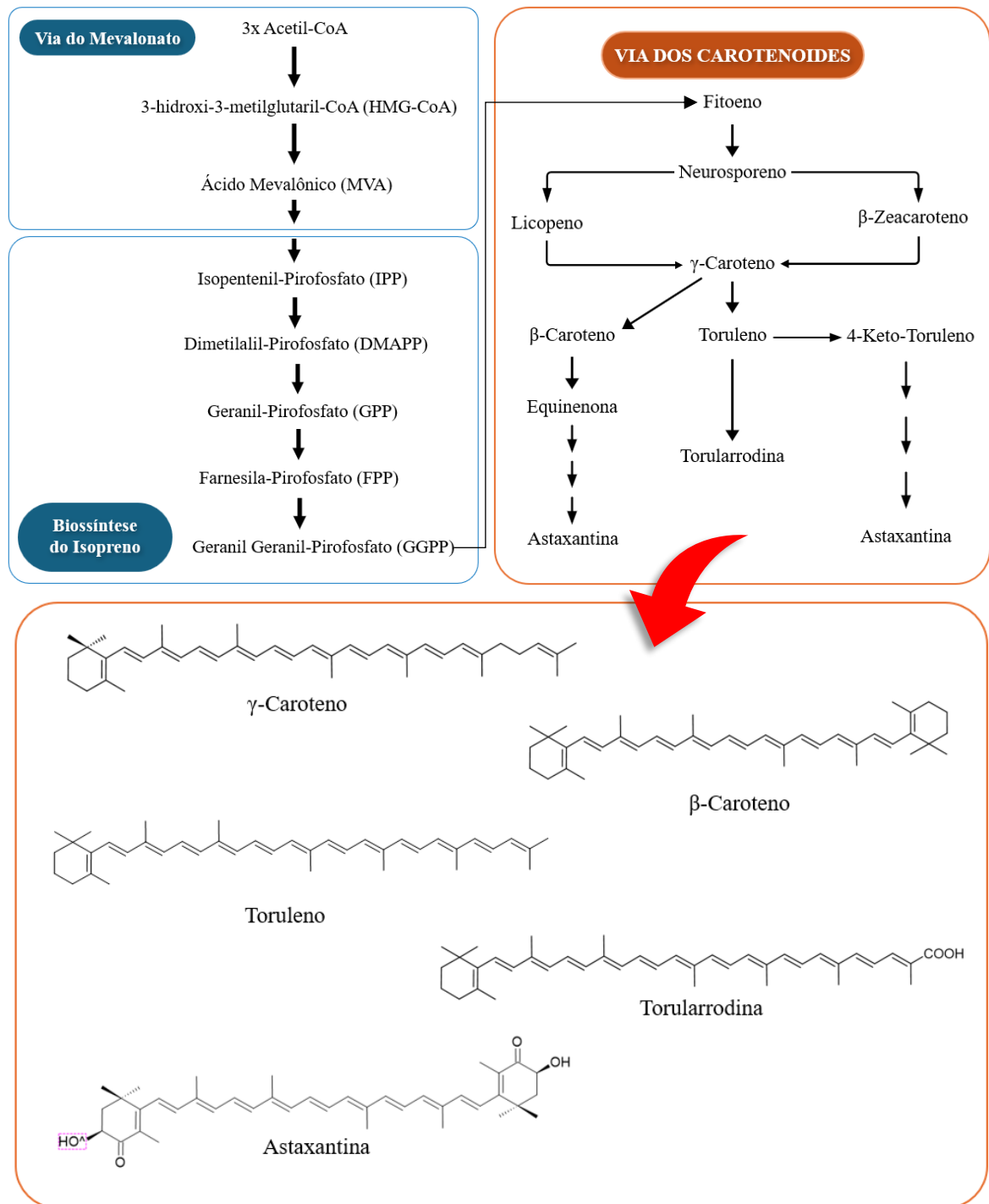
A sua reprodução é assexuada, normalmente realizada via brotamento multilateral e polar, por outro lado, também pode ser sexuada em algumas cepas ocorrendo de maneira ocasional na forma de pseudohyphae (Tang *et al.*, 2019).

As espécies são saprofíticas ubíquas (se alimentam de matéria orgânica em decomposição e estão praticamente em todos os espaços). As cepas são capazes de se desenvolverem em diferentes condições ecológicas e de substratos, até mesmo em ambientes com poucos nutrientes. Cerca de 50% da população está em águas do mar e doces (Rose & Harrison, 1987; Wirth & Goldani, 2012).

A característica mais chamativa dessas leveduras é, justamente, a biossíntese de carotenoides naturais, inclusive, sua biomassa também possui alta qualidade, uma vez que é fonte de proteína para utilização como aditivo alimentar (Tang *et al.*, 2019).

## 5. BIOSÍNTESE DE CAROTENOIDES

Para obter os carotenoides e melhorar o processo para aumentar o rendimento e resultados, necessita de um conhecimento aprofundado dos mecanismos moleculares para realmente se ter um melhoramento consciente do processo biotecnológico. Por esses motivos entre outros, que a biossíntese de carotenoides vem sendo estudada exaustivamente. Na **figura 3** mostra um esquema da via biossintética por leveduras desses compostos.

**Figura 3** - Via biossintética dos carotenoides em leveduras

Fonte: Adaptado de Frengova & Beshkova (2019)

Três moléculas de acetil-CoA são convertidas em 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) pela enzima HMG-CoA sintase na via do ácido mevalônico. HMG-CoA é catabolizado pela 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase, originando o primeiro precursor da via biossintética dos terpenoides, o ácido mevalônico (MVA). Então, o MVA sofre fosforilação,

depois pirofosforilação, descarboxilação e, então, desidratação para produzir isopentenilpirofosfato (IPP), a unidade básica da formação dos terpenos pela cinase e descarboxilase. A formação do geranyl-pirofosfato (GPP), que é a primeira etapa da biossíntese de isopreno em leveduras, se origina da reação entre o IPP e o DMAPP (dimetilalil-pirofosfato), então, sequências de IPP são adicionadas na molécula GP para formar farnesila-pirofosfato (FPP), o precursor da maioria dos sesquiterpenos. Por conseguinte, outro IPP é adicionado ao FPP formando o precursor dos diterpenos, o GGPP (geranyl geranyl-pirofosfato). Essas reações são catalisadas pela enzima prenil transferase. O FPP e o GPP sofrem dimerização para formar triterpenos (molécula com 30 carbonos) e tetraterpenos (com 40 carbonos), respectivamente. A formação do fitoeno começa com a condensação de duas moléculas de GGPP, e após desnaturação forma o fitoflueno, neurosporeno e licopeno. Como o licopeno é um composto trans, a isomerização da primeira ou segunda ligação dupla do fitoeno ocorre no mesmo estágio da reação de desnaturação. A formação do  $\beta$ -caroteno, toruleno, torularrodina, astaxantina,  $\gamma$ -caroteno e equinona começa com a ciclização do licopeno, o precursor dos carotenoides cíclicos. Na via dos carotenoides em leveduras, o agente crítico da ramificação  $\gamma$ -caroteno, age como precursor de  $\beta$ -caroteno e toruleno. E por fim, após a hidroxilação e oxidação do toruleno, se forma a torularrodina (Frengova & Beshkova, 2009; Igreja *et al.*, 2021; Tang *et al.*, 2019).

## 6. PRINCIPAIS CAROTENOIDES

### 6.1. $\beta$ -caroteno

O  $\beta$ -caroteno é um dos pigmentos mais conhecidos e mais aproveitados pelas indústrias. Ele é utilizado amplamente na medicina e também como aditivos de alimentos e rações, cosméticos, entre outros setores. Teoricamente, a partir do  $\beta$ -caroteno, é possível obter duas moléculas de vitamina A após a ingestão, devido aos seus dois anéis  $\beta$ -ionona não-substituídos, e no mínimo 11 carbonos na cadeia lateral poliênica, porém a eficiência de conversão no sistema fisiológico depende de muitos fatores relacionados ao indivíduo (Igreja *et al.*, 2021; Tang *et al.*, 2019). Os microrganismos capazes de produzi-los são *Blakeslea trispora* (Mantzouridou *et al.*, 2002), *Phaffia rhodozyma* (Liu *et al.*, 2006), *Rhodospiridium toruloides* (Dias *et al.*, 2015), *Sporidiobolus salmonicolor* (Valduga, Tatsch, Tiggemann, *et al.*, 2009; Valduga, Tatsch, Vanzo, *et al.*, 2009) e *Rhodotorula sp.* Cheng & Yang, 2016). E em relação as *Rhodotorulas*, 70% dos carotenoides existentes nelas são constituídos de  $\beta$ -caroteno (Tang *et al.*, 2019).

O consumo frequente de alimentos contendo  $\beta$ -caroteno em sua composição vem sendo associado com a diminuição no desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas como o câncer, concedendo ao seu consumidor efeitos antioxidantes para inibir ou retardar os danos oxidativos (Mayne, 1996; Peto et al., 1981), os estudos mostraram um indício de que um aumento na dose desse carotenoide pode ter associação à redução dos riscos de doença de Parkinson, principalmente em mulheres (Bourque et al., 2009; Niu et al., 2024).

## 6.2. $\gamma$ -caroteno

É um isômero do  $\beta$ -caroteno. Sua estrutura contém 11 ligações duplas conjugadas e apenas 1 anel  $\beta$ -ionona não-substituído, ao qual possui atividade provitamina A, porém podendo formar somente uma molécula de retinol. O  $\gamma$ -caroteno é resultado da ciclização do licopeno (Tang et al., 2019). Esse carotenoide pode ser encontrado em frutas amazônicas, como o buriti, a pupunha e o tucumã (de Rosso & Mercadante, 2007) possui propriedades antioxidantes; e sua produção biotecnológica foi relatada em espécies de *Rhodotorula* e *Sporobolomyces* (Cardoso et al., 2016; Sólyom et al., 2014).

## 6.3. Toruleno

Sua estrutura é composta por 40 carbonos e um anel  $\beta$ -ionona não-substituído ligado a uma cadeia lateral poliênica de 11 carbonos. O toruleno é derivado da subtração de dois hidrogênios do  $\gamma$ -caroteno, conferindo 13 ligações duplas conjugadas para a estrutura (Maldonado et al., 2008; Ungureanu et al., 2013). Teoricamente, a partir dele, uma molécula de retinol (vitamina A) pode ser sintetizada fisiologicamente após a ingestão. Dentre as leveduras do gênero *Rhodotorula*, a *R. mucilaginosa* foi reportada como a que produz o toruleno em maior quantidade em relação aos demais pigmentos (Kot et al., 2018). Devido a presença de um elevado número de ligações duplas conjugadas na cadeia, o toruleno também possui atividade antioxidante, que em estudos, confirmaram o seu efeito protetivo contra danos do estresse oxidativo em células estromais da próstata humana. Além disso, já foi reportado também a propriedade antimicrobiano para o toruleno (Du et al., 2016; Kot et al., 2018).

## 6.4. Torularrodina

Derivada do toruleno, a torularrodina possui 40 carbonos, um anel  $\beta$ -ionona e um grupo de ácido carboxílico em sua estrutura (Zoz et al., 2015). Devido a presença de maior número de ligações duplas conjugadas, a torularrodina possui maior atividade antioxidante, em relação ao  $\beta$ -caroteno, para o sequestro de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), assim como maior eficiência na desativação do oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) (Sakaki et al., 2002). De acordo com Moliné et al. (2010), a torularrodina apresentou mecanismos de fotoproteção contra os raios UV-B. Em geral, as mesmas atividades e efeitos reportados para o Toruleno citados anteriormente, podem ser extrapolados para a Torularrodina.

### 6.5. Astaxantina

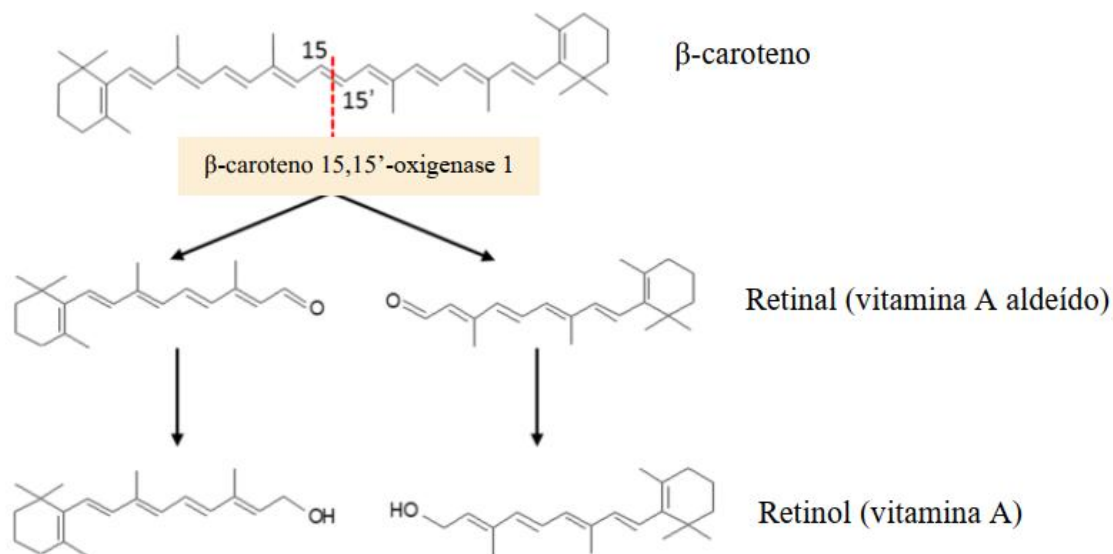
O carotenoide astaxantina possui 40 carbonos, uma longa cadeia de poliênica com 13 ligações duplas conjugadas e ambos os anéis  $\beta$ -ionona possuem ligações duplas com grupos hidroxila e cetona, sendo assim, essa molécula não possui atividade provitamina A. A astaxantina é responsável pela coloração de peixes como salmão, truta, de crustáceos e pássaros (BCC Research, 2022; Maoka, 2020).

A astaxantina corresponde à 26% das vendas de carotenoides no mundo. Em 2022 foram alcançados valores de US\$ 629,1 milhões no mercado global. A taxa anual de crescimento é de 8,1% para o período entre 2022 e 2027. Assim ela aparece como o segundo carotenoide mais relevante comercialmente (BCC Research, 2022).

## 7. MERCADO DE CAROTENOIDES

Em 2017, o mercado global de carotenoides atingiu cerca de US\$ 1,5 bilhões, e a última estatística do ano de 2022 mostrou a tendência de aumento do mercado, cerca de US\$ 2 bilhões com previsão de alcançar US\$ 2,7 BI em 2027, com taxa de crescimento anual de 5,7% (BCC Research, 2022). Tal fato se deve aos efeitos benéficos dos carotenoides para a saúde, como a redução de doenças oculares, cardíacas, efeitos antioxidantes, além da capacidade de alguns desses compostos serem convertidos em vitamina A, mostrado na **figura 4** (Britton, 2020; D. Ribeiro et al., 2018).

**Figura 4** - Conversão de  $\beta$ -caroteno em duas moléculas de vitamina A pela clivagem enzimática mediada pela  $\beta$ -caroteno 15,15'-oxigenase 1



Fonte: (Igreja et al., 2021)

No Brasil, de acordo com os dados estatísticos do Comércio Exterior do Brasil (Ministério da Indústria, 2023), em exportações foram adquiridos US\$1.321.334,00 e gastos US\$ 95.565.654,00 em importações no período de 2012 até maio de 2022.

Aproximadamente 90% dos carotenoides são produzidos via síntese química. Entretanto, a demanda de consumidores por produtos com corantes naturais vem crescendo e a aplicabilidade dos carotenoides não se limita somente a indústria de alimentos, mas se abrange para a avicultura como aditivos alimentares, na farmacologia na utilização contra a fotossensibilidade, diabetes, distúrbios neurológicos e na cosmética como intensificador e prolongador de bronzeamento (Mesquita et al., 2017; Vila et al., 2008). Ainda, há uma limitação e um alto custo da produção de carotenoides via síntese química e pela extração de plantas (Mata-Gómez et al., 2014), nesse sentido, a utilização de microrganismos para a obtenção de carotenoides surge como uma alternativa para preencher essa lacuna na indústria.

## 8. CONCLUSÃO

O Brasil detém uma enorme biodiversidade de plantas e microrganismos produtores de carotenoides, e com base nos dados e informações mostrados, fica claro que o Brasil importa grande quantidade de carotenoides para aplicações industriais, provavelmente devido à falta de iniciativas e investimentos no setor industrial para desenvolver o mesmo setor.

A produção de carotenoides por leveduras é uma estratégia promissora e viável, mais ainda ao se falar de indústrias. Logo, esta revisão contribui com a discussão de um cenário em que haja fortalecimento do mercado brasileiro de carotenoides, considerando alternativas de nossa biodiversidade para a produção deles, resultando em aumento das exportações e diminuição das importações. Para atingir esse objetivo, pesquisas científicas sistemáticas devem ser estimuladas com abordagens tecnológicas e biotecnológicas para encobrir novas fontes vegetais ou microbianas, bem como processos sustentáveis para produzir altos rendimentos de carotenoides.

## 9. REFERÊNCIAS

- AKSU, Z., & EREN, A. T. (2007). Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochemical Engineering Journal*, 35(2), 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.01.004>
- ALMEIDA, E. R. A., & CERDÁ-OLMEDO, E. (2008). Gene expression in the regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Current Genetics*, 53(3), 129–137. <https://doi.org/10.1007/s00294-007-0170-x>
- ALVARADO-HUALLANCO, M. B., & MAUGERI-FILHO, F. (2010). Kinetics and modeling of fructo-oligosaccharide synthesis by immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula sp.* *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(12), 1654–1662. <https://doi.org/10.1002/jctb.2477>
- BARNETT, J. A. (2004). A history of research on yeasts 8: taxonomy. *Yeast*, 21(14), 1141–1193. <https://doi.org/10.1002/yea.1154>
- BCC RESEARCH. (2022). The Global Market for Carotenoids. <https://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/the-global-market-forcarotenoids.html>
- BISWAS, S. K., YOKOYAMA, K., NISHIMURA, K., & MIYAJI, M. (2001). Molecular phylogenetics of the genus *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeasts inferred from the mitochondrial cytochrome b gene. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), 1191–1199. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-1191>
- BOROWITZKA, M. A., HUISMAN, J. M., & OSBORN, A. (1991). Culture of the astaxanthin producing green alga *Haematococcus pluvialis* 1. Effects of nutrients on growth and cell type. *Journal of Applied Phycology*, 3(4), 295–304. <https://doi.org/10.1007/BF02392882>
- BOURQUE, M., DLUZEN, D. E., & DI PAOLO, T. (2009). Neuroprotective actions of sex steroids in Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 30(2), 142–157. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2009.04.014>
- BRITTON, G. (2020). Carotenoid research: History and new perspectives for chemistry in biological systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865(11), 158699. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158699>
- BUZZINI, P., INNOCENTI, M., TURCHETTI, B., LIBKIND, D., VAN BROOCK, M., & MULINACCI, N. (2007). Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, and *Sporidiobolus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(8), 1024–1031. <https://doi.org/10.1139/W07-068>
- CARDOSO, L. A. C., JÄCKEL, S., KARP, S. G., FRAMBOISIER, X., CHEVALOT, I., & MARC, I. (2016). Improvement of *Sporobolomyces ruberrimus* carotenoids production by the use of raw glycerol. *Bioresource Technology*, 200, 374–379. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.108>

CASTELO-BRANCO, D. DE S. C. M., GRAÇA-FILHO, R. V. DA, OLIVEIRA, J. S. DE, ROCHA, M. G. DA, ARAÚJO, G. DOS S., ARAÚJO NETO, M. P. DE, CORDEIRO, R. DE A., PEREIRA-NETO, W. DE A., SIDRIM, J. J. C., BRILHANTE, R. S. N., & ROCHA, M. F. G. (2021). Yeast microbiota of free-ranging amphibians and reptiles from Caatinga biome in Ceará State, Northeast Brazil: High pathogenic potential of *Candida famata*. *Ciência Rural*, 51(7). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200742>

CHENG, Y.-T., & YANG, C.-F. (2016). Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 61, 270–275. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2015.12.027>

DAVOLI, P., MIERAU, V., & WEBER, R. W. S. (2004). Carotenoids and Fatty Acids in Red Yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40(4), 392–397. <https://doi.org/10.1023/B:ABIM.0000033917.57177.f2>

DE ROSSO, V. V., & MERCADANTE, A. Z. (2007). Identification and Quantification of Carotenoids, By HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5062–5072. <https://doi.org/10.1021/jf0705421>

DIAS, C., SOUSA, S., CALDEIRA, J., REIS, A., & LOPES DA SILVA, T. (2015). New dualstage pH control fed-batch cultivation strategy for the improvement of lipids and carotenoids production by the red yeast *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921. *Bioresource Technology*, 189, 309–318. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.009>

DU, C., LI, Y., GUO, Y., HAN, M., ZHANG, W., & QIAN, H. (2016). The suppression of torulene and torularhodin treatment on the growth of PC-3 xenograft prostate tumors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 469(4), 1146–1152. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.112>

FRASER, P. D., & BRAMLEY, P. M. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, 43(3), 228–265. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2003.10.002>

FRENGOVA, G. I., & BESHKOVA, D. M. (2009). Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(2), 163–180. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0492-9>

IGREJA, W. S., MAIA, F. DE A., LOPES, A. S., & CHISTÉ, R. C. (2021). Biotechnological Production of Carotenoids Using Low Cost-Substrates Is Influenced by Cultivation Parameters: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8819. <https://doi.org/10.3390/ijms22168819>

KHOO, K. S., LEE, S. Y., OOI, C. W., FU, X., MIAO, X., LING, T. C., & SHOW, P. L. (2019). Recent advances in biorefinery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 288, 121606. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121606>

KOBAYASHI, M., KAKIZONO, T., & NAGAI, S. (1991). Astaxanthin production by a green alga, *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 71(5), 335–339. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(91\)90346-I](https://doi.org/10.1016/0922-338X(91)90346-I)

- KOT, A. M., BŁAŻEJAK, S., BRZEZIŃSKA, R., SĘK, W., & KIELISZEK, M. (2021). Effect of Selected Cations and B Vitamins on the Biosynthesis of Carotenoids by *Rhodotorula mucilaginosa* Yeast in the Media with Agro-Industrial Wastes. *Applied Sciences*, 11(24), 11886. <https://doi.org/10.3390/app112411886>
- KOT, A. M., BŁAŻEJAK, S., GIENTKA, I., KIELISZEK, M., & BRYŚ, J. (2018). Torulene and torularhodin: “new” fungal carotenoids for industry? *Microbial Cell Factories*, 17(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0893-z>
- KRZYSCIAK, P., HALSKA, A., & MACURA, A. B. (2007). Występowanie i chorobotwórczość grzybow *Rhodotorula spp.* Postępy Mikrobiologii, 46(4), 291–300. <https://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmeta1.element.agro-article-7ecca2d-68c9-45c7-b095-5dd18554f7c5>
- KURTZMAN, C. P., FELL, J. W., & BOEKHOUT, T. (2011). The Yeasts, a Taxonomic Study. In C. P. KURTZMAN, J. W. FELL, & T. BOEKHOUT (Eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study* (5th ed., pp. 233–234). Taylor & Francis. <https://www.sciencedirect.com/book/9780444521491/the-yeasts#book-info>
- LIU, Y.-S., WU, J.-Y., & HO, K. (2006). Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 27(3), 331–335. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.08.031>
- MACHADO, W. R. C. (2018). Bioprospecção de levedura para a produção de carotenoides microbianos [Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”]. <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/22c8edd7-e921-4938-94aa-534d59217fa2/content3>
- MALDONADE, I. R., RODRIGUEZ-AMAYA, D. B., & SCAMPARINI, A. R. P. (2008). Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. *Food Chemistry*, 107(1), 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.075>
- MANNAZZU, I., LANDOLFO, S., DA SILVA, T. L., & BUZZINI, P. (2015). Red yeasts and carotenoid production: outlining a future for non-conventional yeasts of biotechnological interest. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(11), 1665–1673. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1927-x>
- MANTZOURIDOU, F., ROUKAS, T., & KOTZEKIDOU, P. (2002). Effect of the aeration rate and agitation speed on  $\beta$ -carotene production and morphology of *Blakeslea trispora* in a stirred tank reactor: mathematical modeling. *Biochemical Engineering Journal*, 10(2), 123–135. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(01\)00166-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(01)00166-8)
- MAOKA, T. (2020). Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*, 74(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01364-x>
- MATA-GÓMEZ, L. C., MONTAÑEZ, J. C., MÉNDEZ-ZAVALA, A., & AGUILAR, C. N. (2014). Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-12>

MAYNE, S. T. (1996). Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. The FASEB Journal, 10(7), 690–701. <https://doi.org/10.1096/fasebj.10.7.8635686>

MESQUITA, S. DA S., TEIXEIRA, C. M. L. L., & SERVULO, E. F. C. (2017). Carotenoids: Properties, Applications and Market. Revista Virtual de Química, 9, 672–688. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170040>

MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, C. E. e S. (2023, August 2). COMEX STAT. <http://comexstat.mdic.gov.br/pt/home>

MOHAN, S., RAO, P. R., HEMACHANDRAN, H., PULLELA, P. K., DOSS C, G. P., TAYUBI, I. A., SUBRAMANIAN, B., GOTHANDAM, K., SINGH, P., & RAMAMOORTHY, S. (2018). Prospects and progress in the production of valuable carotenoids: Insights from metabolic engineering, synthetic biology, and computational approaches. Journal of Biotechnology, 266, 89–101. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.12.010>

MOLINÉ, M., FLORES, M. R., LIBKIND, D., DEL CARMEN DIÉGUEZ, M., FARÍAS, M. E., & VAN BROOCK, M. (2010). Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: the role of torularhodin. Photochemical & Photobiological Sciences, 9(8), 1145–1151. <https://doi.org/10.1039/c0pp00009d>

MORELLI, L., & RODRIGUEZ-CONCEPCION, M. (2023). Open avenues for carotenoid biofortification of plant tissues. Plant Communications, 4(1), 100466. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100466>

NIU, F., XIE, W., ZHANG, W., KAWUKI, J., & YU, X. (2024). Vitamin C, vitamin E,  $\beta$ -carotene and risk of Parkinson's disease: a systematic review and dose–response metaanalysis of observational studies. Nutritional Neuroscience, 27(4), 329–341. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2023.2192561>

PAPAIIOANNOU, E. H., & LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. (2010). Substrate contribution on carotenoids production in *Blakeslea trispora* cultivations. Food and Bioproducts Processing, 88(2–3), 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2009.03.001>

PAUL, D., KUMARI, P. K., & SIDDIQUI, N. (2023). Yeast Carotenoids: Cost-Effective Fermentation Strategies for Health Care Applications. Fermentation, 9(2), 147. <https://doi.org/10.3390/fermentation9020147>

PETO, R., DOLL, R., BUCKLEY, J. D., & SPORN, M. B. (1981). Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates? Nature, 290(5803), 201–208. <https://doi.org/10.1038/290201a0>

RAM, S., MITRA, M., SHAH, F., TIRKEY, S. R., & MISHRA, S. (2020). Bacteria as na alternate biofactory for carotenoid production: A review of its applications, opportunities and challenges. Journal of Functional Foods, 67, 103867. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103867>

RIBEIRO, B. D., BARRETO, D. W., & COELHO, M. A. Z. (2011). Technological Aspects of  $\beta$ -Carotene Production. Food and Bioprocess Technology, 4(5), 693–701. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0545-3>

- RIBEIRO, D., FREITAS, M., SILVA, A. M. S., CARVALHO, F., & FERNANDES, E. (2018). Antioxidant and pro-oxidant activities of carotenoids and their oxidation products. *Food and Chemical Toxicology*, 120, 681–699. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.060>
- ROSE, A. H., & HARRISON, J. S. (1987). *The Yeasts* (Rose A H & Harrison J S., Eds.; 2nd ed.). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2009-0-02440-4>
- SAKAKI, H., NOCHIDE, H., KOMEMUSHI, S., & MIKI, W. (2002). Effect of active oxygen species on the productivity of torularhodin by *Rhodotorula glutinis* No. 21. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93(3), 338–340. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(02\)80040-87](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(02)80040-87)
- SALVADORI, M. R., ANDO, R. A., NASCIMENTO, C. A. O., & CORRÊA, B. (2017). Dead biomass of Amazon yeast: A new insight into bioremediation and recovery of silver by intracellular synthesis of nanoparticles. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 52(11), 1112–1120. <https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1340754>
- SALVADORI, M. R., ANDO, R. A., OLLER DO NASCIMENTO, C. A., & CORRÊA, B. (2014). Intracellular biosynthesis and removal of copper nanoparticles by dead biomass of yeast isolated from the wastewater of a mine in the Brazilian Amazonia. *PLoS ONE*, 9(1), e87968. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087968>
- SARADA, R., TRIPATHI, U., & RAVISHANKAR, G. A. (2002). Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. *Process Biochemistry*, 37(6), 623–627. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00246-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00246-1)
- SÓLYOM, K., MAIER, C., WEISS, J., COCERO, M. J., MATO, R. B., CARLE, R., & SCHWEIGGERT, R. (2014). Structure–response relationship of carotenoid bioaccessibility and antioxidant activity as affected by the hydroxylation and cyclization of their terminal end groups. *Food Research International*, 66, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.004>
- TANG, W., WANG, Y., ZHANG, J., CAI, Y., & HE, Z. (2019). Biosynthetic Pathway of Carotenoids in *Rhodotorula* and Strategies for Enhanced Their Production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(4), 507–517. <https://doi.org/10.4014/jmb.1801.01022>
- TATSCH, P. O. (2008). Produção de Carotenóides em meio sintético por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS2636 em biorreator [Dissertação, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões]. [https://www.uricer.edu.br/cursos/arq\\_trabalhos\\_usuario/579.pdf](https://www.uricer.edu.br/cursos/arq_trabalhos_usuario/579.pdf)
- UNGUREANU, C., MARCHAL, L., CHIRVASE, A. A., & FOUCAULT, A. (2013). Centrifugal partition extraction, a new method for direct metabolites recovery from culture broth: Case study of torularhodin recovery from *Rhodotorula rubra*. *Bioresource Technology*, 132, 406–409. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.105>
- VALDUGA, E., TATSCH, P. O., TIGGEMANN, L., ZENI, J., COLET, R., CANSIAN, J. M., TREICHEL, H., & LUCCIO, M. (2009). Evaluation of the conditions of carotenoids production in a synthetic medium by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) in a bioreactor. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(12), 2445–2451. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02032.x>

- VALDUGA, E., TATSCH, P., VANZO, L. T., RAUBER, F., DI LUCCIO, M., & TREICHEL, H. (2009). Assessment of hydrolysis of cheese whey and use of hydrolysate for bioproduction of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(6), 1060–1065. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3556>
- VILA, M., COUSO, I., & LEÓN, R. (2008). Carotenoid content in mutants of the chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* with low expression levels of phytoene desaturase. *Process Biochemistry*, 43(10), 1147–1152. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.06.014>
- VOUTILAINEN, S., NURMI, T., MURSU, J., & RISSANEN, T. H. (2006). Carotenoids and cardiovascular health. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(6), 1265–1271. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.6.1265>
- WIRTH, F., & GOLDANI, L. Z. (2012). Epidemiology of *Rhodotorula*: An Emerging Pathogen. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2012, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2012/465717>
- YURKOV, A. M., KACHALKIN, A. V., DANIEL, H. M., GROENEWALD, M., LIBKIND, D., DE GARCIA, V., ZALAR, P., GOULIAMOVA, D. E., BOEKHOUT, T., & BEGEROW, D. (2015). Two yeast species *Cystobasidium psychroaquaticum* f.a. sp. nov. and *Cystobasidium rietchiei* f.a. sp. nov. isolated from natural environments, and the transfer of *Rhodotorula minuta* clade members to the genus *Cystobasidium*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107(1), 173–185. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0315-0>
- ZHANG, C., CHEN, X., & TOO, H.-P. (2020). Microbial astaxanthin biosynthesis: recent achievements, challenges, and commercialization outlook. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(13), 5725–5737. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10648-2>
- ZOZ, L., CARVALHO, J. C., SOCCOL, V. T., CASAGRANDE, T. C., & CARDOSO, L. (2015). Torularhodin and Torulene: Bioproduction, Properties and Prospective Applications in Food and Cosmetics - a Review. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(2), 278–288. <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201400152>

**CAPÍTULO II – MANUSCRITO DE REVISÃO DE LITERATURA II**

**YEASTS OF GENUS *Rhodotorula* FOUND IN THE BRAZILIAN BIOMES AS  
PROMISING NATURAL SOURCES FOR THE BIOTECHNOLOGICAL  
PRODUCTION OF CAROTENOIDS**

**Manuscrito em fase final de preparação para ser submetido em uma revista  
internacional indexada da área de Biotecnologia.**

**Yeasts of genus *Rhodotorula* found in the Brazilian biomes as promising natural sources  
for the biotechnological production of carotenoids**

David Cristian Rodrigues Lucas<sup>a</sup>, Renan Campos Chisté<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Graduate Program of Biotechnology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, 66075-110, Belém, Pará, Brazil.

<sup>b</sup>Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil.

**ORCID:**

David Cristian Rodrigues Lucas - <https://orcid.org/0000-0002-1980-8865>

Renan Campos Chisté - <https://orcid.org/0000-0002-4549-3297>

---

\*Corresponding author: [rcchiste@ufmg.br](mailto:rcchiste@ufmg.br) (PhD. Renan Campos Chisté)

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC), Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal do Pará (UFPA), Rua Augusto Corrêa, 01-Guamá, CEP 66075-110, Belém, Pará, Brazil.

## ABSTRACT

Carotenoids are bioactive compounds used as natural pigments and are found in plants, animals, algae, and microorganisms. Some of these compounds are precursors to vitamin A and have health benefits for humans, such as strengthening the immune system and reducing the risk of chronic degenerative diseases like cancer, cardiovascular diseases, and ocular conditions. In the industry, carotenoid production is primarily achieved through chemical synthesis or extraction from algae and plants. However, given the growing concern among consumers about the use of chemical additives in food, it is relevant to explore biotechnological processes for obtaining carotenoids without harmful substances. The global carotenoid market reached approximately US\$2 billion, with a projected growth rate of 5.7% annually to reach US\$2.7 billion by 2027. In Brazil, in exports, US\$ 1,459,821.000, representing about 24,602 kg of carotenoids and their derivatives in the period between January 2014 and September 2024, while US\$ 103,916,643.00 was spent on imports with 5,806,031 kg in the same period. Various microorganisms can synthesize carotenoids, such as certain yeasts. Among them is the genus *Rhodotorula*, a strict aerobic yeast that produces large amounts of lipids and carotenoids during its stationary growth phase. Considering Brazil's rich biodiversity, some studies have reported the presence of *Rhodotorula* yeasts in the following biomes: Pampa, Pantanal, Cerrado, Atlantic Forest, Caatinga, and Amazonia, although no further investigation has been conducted in these areas. Similarly, there is also the possibility of a wide presence of organisms capable of biotransforming these carotenoids. Therefore, this review was designed to gather systematic information about wide aspects related to carotenoid useful for interested industries, which are produce by yeasts from genus *Rhodotorula* and found in the Brazilian biomes, highlighting the Amazonia biome.

**Keywords:** Natural pigments; Amazonia; Pampa, Pantanal, Cerrado, Atlantic Forest, Caatinga;  $\beta$ -carotene.

## 1. INTRODUCTION

Carotenoids are bioactive compounds synthesized in plants, microorganisms (bacteria, algae, filamentous fungi and yeasts), but not by animals (excepting for hemipterans such as aphids, adelgids, phylloxerids), yet they can bioaccumulate them through food intake (Frengova & Beshkova, 2009; Igreja et al., 2021). Carotenoids are natural pigments, which can be mostly colored between yellow and red, and have biological properties that are very beneficial to human health, such as antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties, in addition to being some precursors of vitamin A. For these reasons, they have great value for the pharmaceutical, chemical, food and feed industries (Mannazzu et al., 2015; Mata-Gómez et al., 2014; Tinoi et al., 2005).

Commercially, carotenoids are obtained from plants and chemical synthesis (Dufossé et al., 2005). However, both these types of production face some relevant limitations. Those of plant origin face limited availability at only certain times of the year due to seasonality and geographic variety that cannot be controlled, while carotenoids that are obtained by chemical synthesis generate hazardous waste for the environment. The carotenoid market is very promising and will only grow over time. According to BCC Research (2022), the global market for these molecules reached US\$2 billion in 2022, and is expected to reach US\$2.7 billion in 2027 with an annual growth rate of 5.7%. Among the known carotenoids, the main compounds sold globally are annatto, astaxanthin,  $\beta$ -carotene,  $\beta$ -apo-8-carotenal,  $\beta$ -apo-8-carotenal-ester, canthaxanthin, capsanthin, lutein, lycopene and zeaxanthin (BCC Research, 2022). For these reasons, investigations with microorganisms that produce carotenoids in Brazilian biomes have been conducted over time, and they have shown promising perspectives to provide high yields by sustainable means (Mata-Gómez *et al.*, 2014).

Brazil hosts one of the greatest biodiversity in our planet, as well as a large supply of microorganisms that produce carotenoids with useful properties for humans. In particular, yeasts of the genus *Rhodotorula*, the microorganism targeted by this review, can be found in all the Brazilian biomes: Amazonia, Caatinga, Cerrado, Atlantic Rainforest, Pantanal, and Palpa (Cipolatti et al., 2019; Loureiro et al., 2005; W. R. M. Machado et al., 2019; Vale et al., 2021). Among the Brazilian biomes, there are still few studies with *Rhodotorula* yeasts in the Amazonia. The only study is from the northeast of Pará State (dos Santos et al., 2019). The Amazonia is a vast forested plain that stretches between the Andes Mountains and the Atlantic Ocean over more than 5 million km<sup>2</sup> in the north of the South American continent. Beyond the strict perimeter of the Amazon River watershed, the Amazon region extends to the Guiana coast

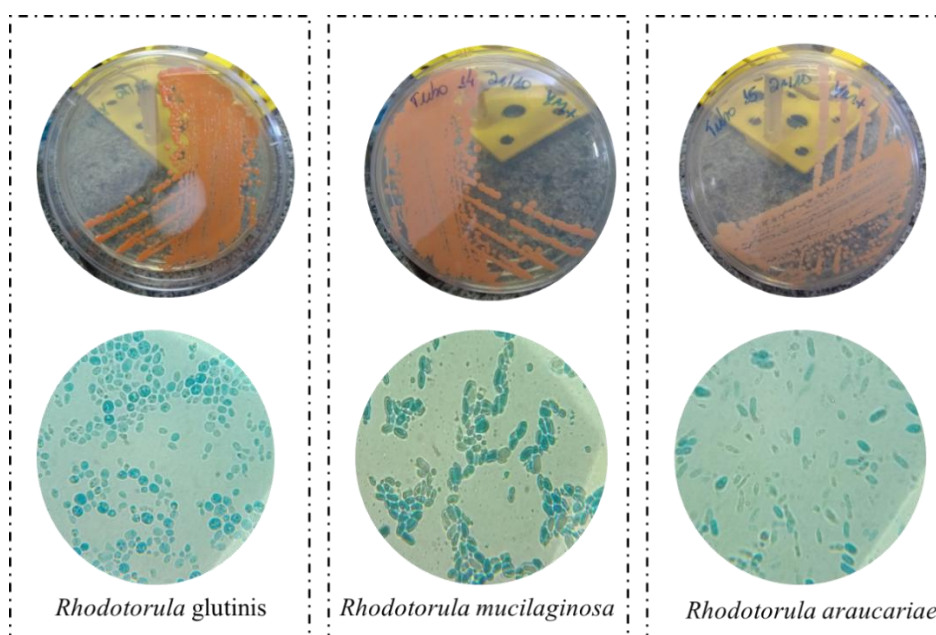
to the north. Its climate is hot and humid with plenty of clouds and rain throughout the year (Polidori et al., 2022). This climate favors the development of a diverse microbiota, which is still largely unknown (da Fonseca Meireles et al., 2022).

Therefore, this review was designed to gather systematic information about wide aspects related to carotenoid useful for interested industries, which are produce by yeasts from genus *Rhodotorula* and found in the Brazilian biomes, highlighting the Amazonia biome.

## 2. YEASTS OF GENUS *Rhodotorula*

*Rhodotorula* is a genus of unicellular pigment yeast, belonging to the phylum Basidiomycota, the family Cryptococcaceae, and the subfamily Rhodotorulodae. The first *Rhodotorula* found was in the 1930s in a cheese by Canadian microbiologist Charles Harrison (Kot et al., 2016). The name of the genus comes from the words *rhodos* (which in Greek means red) and *torula* (which in Latin means protuberance). There are more than 164 species including *R. glutinis*, *R. toruloides*, *R. mucilaginosa*, *R. graminis*, among others. The cells of *Rhodotorula* yeast strains are polyphyletic (descended from two or more independent ancestors), appearing subglobose, ovoid, ellipsoidal and elongate (Barnett, 2004; Krzysciak et al., 2007; Kurtzman et al., 2011; Tang et al., 2019), as illustrated in **Figure 1**.

**Figure 1** - Examples of *Rhodotorula* yeasts and their subglobose, ovoid, ellipsoidal and elongate forms, as visualized by microscopy. The images are authored by our research group and were taken to illustrate this review. *Rhodotorula glutinis*, *R. mucilaginosa* and *R. araucariae* were acquired from the André Tosello Foundation (Campinas, São Paulo, Brazil). Photo by Gilson Celso Albuquerque Chagas Junior.



Its reproduction is asexual, normally carried out via multilateral and polar budding, on the other hand, it can also be sexual in some strains, occurring occasionally in the form of pseudohyphae (Kurtzman et al., 2011). The species are ubiquitous saprophytes, as they feed on decomposing organic matter and are found in practically all spaces (Wirth & Goldani, 2012). The strains are capable of developing in different ecological and substrate conditions, even in environments with few nutrients. About 50% of the population can be found in salt and fresh waters (Rose & Harrison, 1987; Tang et al., 2019).

The most striking characteristic of these yeasts is, precisely, the biosynthesis of natural carotenoids, including their biomass, which is also of high quality and is a source of protein for the application as feed additives (Tang et al., 2019).

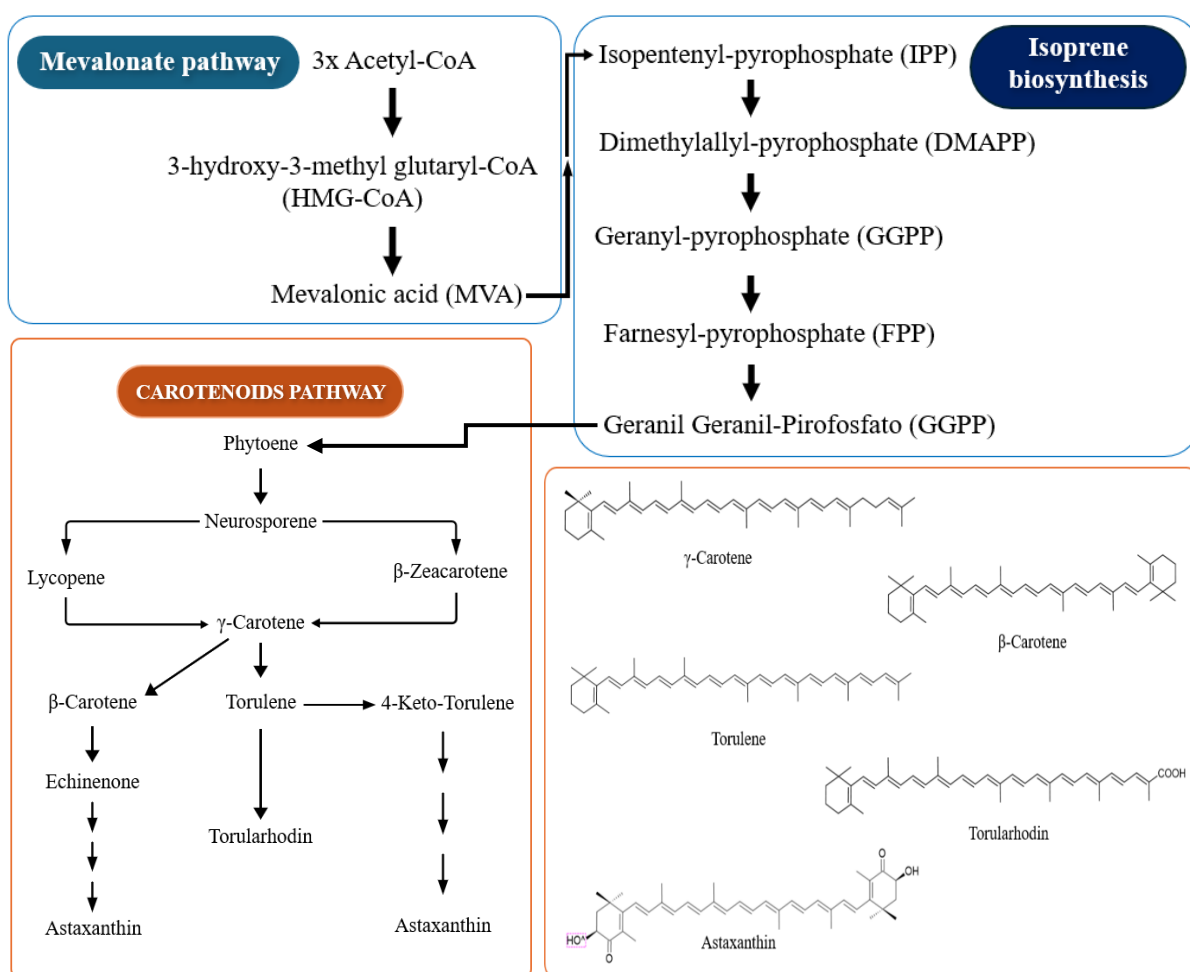
### 3. MAIN CAROTENOIDS PRODUCED BY YEASTS FROM GENUS *Rhodotorula*

More than 750 carotenoids were cataloged in the literature (Šesták et al., 2004). Most of them have an orange, reddish and yellowish color, but there are colorless structures, such as phytoene and phytofluene (Igreja et al., 2021; Mohan et al., 2018). The chemical structure of a carotenoid includes mostly isoprenoids of 40-carbons formed by 8 units of isoprene with an extensive system of conjugated double bonds that generate resonance systems of electrons ( $\pi$ ) moving throughout the polyene chain. Due to these structural characteristics, carotenoids are highly reactive and absorb electromagnetic radiation in the visible region (360-780nm) (de Rosso & Mercadante, 2007; Igreja et al., 2021).

Carotenoid biosynthesis in yeast involves three general steps, as shown in Figure 2. Briefly, (1) Conversion of Acetyl-CoA into 3-hydroxy-3-methyl glutaryl-CoA (HMG-CoA), catalyzing HMG-CoA by HMG-CoA synthase. Then HMG-CoA is converted into the first precursor of the terpenoid biosynthetic pathway, mevalonic acid (MVA). MVA is phosphorylated by MVA kinase and then undergoes decarboxylation to become isopentenyl pyrophosphate (IPP). (2) IPP isomerized into dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP) with the addition of three IPP molecules, after which it is catalyzed by prenyl transferase into geranyl geranyl pyrophosphate (GGPP). By condensation of two GGPP molecules, phytoene (the first 40 carbons of the pathway) is produced, which undergoes denaturation to form lycopene. (3) Several cyclic carotenoids are derived from lycopene, such as  $\beta$ -carotene,  $\gamma$ -carotene, torulene, torularodine and astaxanthin when it undergoes various specific enzymatic reactions. Because lycopene is a *trans* compound, the isomerization of its first or second double bond occurs at the same stage as the denaturation reaction. Thus,  $\gamma$ -carotene appears as a critical point in the

branching because it acts as a precursor to  $\beta$ -carotene and torulene in the carotenoid pathway in yeast. In turn, the hydroxylation and oxidation of torulene leads to the formation of torularhodin (Barredo et al., 2017; Henry et al., 2018; Igreja et al., 2021; Kot et al., 2018; Mata-Gómez et al., 2014; Valduga, Tatsch, Tiggemann, et al., 2009; Valduga, Tatsch, Vanzo, et al., 2009; Zoz et al., 2015).

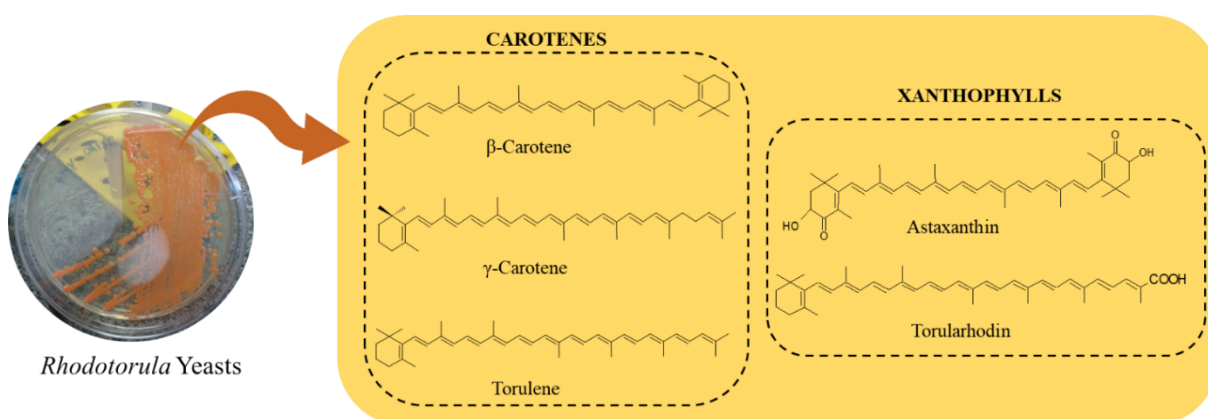
**Figure 2** - Biosynthetic pathway of the carotenoid production in yeasts, adapted from (Frengova & Beshkova, 2009)(Frengova & Beshkova, 2009)



In order to stimulate the increase of the yield of carotenoids in *Rhodotorula* yeasts, optimization procedures on cultivation conditions have been investigated in both synthetic and alternative media, highlighting the use of agroindustrial waste as substrate to accomplish sustainable approaches (Igreja et al., 2021; Rodrigues et al., 2019, 2022). Mutagenesis is referred as a conventional way to modulate carotenoid yield and composition in wild strains, including induction by UV radiation, high hydrostatic pressure,  $\gamma$ -irradiation, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) and ethyl-methane sulfonate (EMS), but engineering and

metabolic engineering manipulations using *E. coli* are the most recent approaches to produce the exogenous carotenoids (Tang et al., 2019). The chemical structures of carotenoids can change through the action of chemical reactions such as hydrogenation, dehydrogenation, cyclization, double bond migration, chain shortening or extension, rearrangement, isomerization, introduction of substituents and oxidation (Gómez-García & Ochoa-Alejo, 2013; Hernández-Almanza et al., 2014; Oliver & Palou, 2000; Très et al., 2007). Depending on the chemical structure, carotenoids can be classified into two large groups: carotenes, which are formed by hydrocarbons in their chemical structure, and xanthophylls, which are oxygenated derivatives of carotenes and may have different functional groups such as hydroxyl, ketone, carboxylic acid and epoxy (Frengova & Beshkova, 2009; Igreja et al., 2021). The most frequent carotenoids reported in *Rhodotorula* yeasts are  $\beta$ -carotene,  $\gamma$ -carotene, torulene, torularhodin and astaxanthin (Figure 3).

**Figure 3** - The main carotenoids reported for yeasts from genus *Rhodotorula*



Source: Author

$\beta$ -Carotene (Figure 3) is one of the well-known pigments in nature and widely used by industries focused on food and feed additives, but also in pharmaceutical and cosmetics, among others. After ingestion, and depending on several individual and nutritional conditions,  $\beta$ -carotene may be converted into two molecules of retinol (vitamin A) due to its two  $\beta$ -ionone rings, and at least 11 carbons in the polyene side chain (Igreja et al., 2021; Tang et al., 2019). Several fungi are capable of producing  $\beta$ -carotene, namely *Blakeslea trispora* (Mantzouridou et al., 2002), *Phaffia rhodozyma* (Liu et al., 2006), *Rhodospiridium toruloides* (Dias et al., 2015), *Sporidiobolus salmonicolor* (Valduga, Tatsch, Tiggemann, et al., 2009), and *Rhodotorula spp.* (Cheng & Yang, 2016). In relation to genus *Rhodotorula*, 70% of the carotenoids in them are made up of  $\beta$ -carotene (Perrier et al., 1995). The frequent consumption

of foods containing  $\beta$ -carotene in their composition has been associated with a reduction in the development of chronic degenerative diseases, such as cardiovascular diseases and cancer, since carotenoids contribute mainly with antioxidant effects to inhibit or delay oxidative stress and damage (Mayne, 1996; Peto et al., 1981). Studies have also shown that increased intake of  $\beta$ -carotene may reduce the risk of Parkinson's disease, especially in women (Bourque et al., 2009; Niu et al., 2024).

$\gamma$ -Carotene is formed after the enzymatic cyclization of lycopene (**Figure 2**) and considering that its structure contains 11 conjugated double bonds and only 1 unsubstituted  $\beta$ -ionone ring (**Figure 3**), this carotenoid has potential to form only one retinol molecule. This carotenoid is not frequently found in plants, but was reported in Amazonian fruits from palm species, such as buriti, peach palm and tucumã (Chisté et al., 2021; de Rosso & Mercadante, 2007; Noronha Matos et al., 2019). Both the antioxidant properties and its biotechnological production have been reported for *Rhodotorula* and *Sporobolomyces* yeasts (Cardoso et al., 2016; Sólyom et al., 2014).

Derived from the subtraction of two hydrogens from  $\gamma$ -carotene, torulene is composed of 40 carbons and an unsubstituted  $\beta$ -ionone ring linked to an 11-carbon polyene side chain, giving 13 conjugated double bonds to the structure (Maldonado et al., 2012) (**Figure 3**). Theoretically, considering this structural requirement, one retinol molecule can be physiologically synthesized after ingestion of torulene. Among the yeasts of the genus *Rhodotorula*, *R. mucilaginosa* was reported to produce torulene in greater amounts (21.45 mg/L) than other carotenoids (Kot et al., 2018). Due to the presence of a high number of conjugated double bonds in the chain, torulene was expected to exhibit higher antioxidant activity than  $\beta$ - and  $\gamma$ -carotene, which the protective effect against damages from oxidative stress in human prostate stromal cells was confirmed. Furthermore, the antimicrobial property of torulene was also previously reported (Du et al., 2016; Kot et al., 2018).

Derived from torulene, torularhodin has 40 carbons, a  $\beta$ -ionone ring and a carboxylic acid group in its structure (Zoz et al., 2015) (**Figure 3**). As observed for torulene, torularhodin shows high antioxidant activity due to the presence of a high number of conjugated double bonds, being reported as more efficient than  $\beta$ -carotene for the scavenging capacity of reactive oxygen species, such as hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) (Sakaki et al., 2002). Moreover, according to Moliné et al. (2010), torularhodin presented photoprotection mechanisms against UV-B rays. In general, the same biological activities reported for torulene are expected to be extrapolated to torularhodin, yet these inferences are gaps in the literature to overcome by future investigations.

Finally, astaxanthin has 40 carbons, a long polyene chain with 13 conjugated double bonds, and since both the  $\beta$ -ionone rings have hydroxyl and ketone groups (**Figure 3**), astaxanthin has no provitamin A activity. This carotenoid is the main responsible for the color of fishes such as salmon, trout, some crustaceans and feathers of birds (Seabra & Pedrosa, 2010). Astaxanthin is the second most commercially relevant carotenoid, which accounts for 26% of carotenoid sales worldwide, reaching US\$ 426.2 million in 2022 and is expected to reach US\$ 629.1 million in 2027 on the global market, with an annual growth rate of 8.1% for the period between 2022 and 2027 (BCC Research, 2022).

#### 4. CAROTENOID MARKET

In 2017, the global carotenoid market reached around US\$ 1.5 billion, and the latest statistics for 2022 showed the market's upward trend, around US\$ 2 billion and expected to reach US\$ 2.7 billion in 2027 with an annual growth rate of 5.7% (BCC Research, 2022).

In Brazil, according to statistical data from the Brazilian Foreign Trade (Ministério da Indústria, 2023), US\$ 1,459,821.000 were exported, representing about 24,602 kg of carotenoids and their derivatives in the period between January 2014 and September 2024 (**Table 2**), while US\$ 103,916,643.00 was spent on imports with 5,806,031 kg in the same period. **Table 1** shows the values (US\$) and exported and imported quantities of carotenoids and their derivatives. The standard nomenclature of MERCOSUL (NCM) was used, which are NCM 32041810 and NCM 32041811 (carotenoids), NCM 32041912 (preparations containing  $\beta$ -carotene, methyl or ethyl esters of 8'-apo- $\beta$ -carotenoic acid or canthaxanthin, with oils or vegetable fats, starch, gelatin, sucrose or dextrin, suitable for coloring foods) and NCM 32041919 (other preparations based on carotenoids).

**Table 1** - Brazilian import and export of carotenoids and their derivatives from 2014 to 2024.

|      | NCM 32041810      |                |                        | NCM 32041911      |                   |                              | NCM 32041912      |                   |                              | NCM 32041919      |                   |                           |
|------|-------------------|----------------|------------------------|-------------------|-------------------|------------------------------|-------------------|-------------------|------------------------------|-------------------|-------------------|---------------------------|
|      | Exports<br>(US\$) | Imports (US\$) | Net Weight<br>E+I (Kg) | Exports<br>(US\$) | Imports<br>(US\$) | Net<br>Weight<br>E+I<br>(Kg) | Exports<br>(US\$) | Imports<br>(US\$) | Net<br>Weight<br>E+I<br>(Kg) | Exports<br>(US\$) | Imports<br>(US\$) | Net<br>Weight<br>E+I (Kg) |
| 2014 | 0                 | 0              | 0                      | 83,965.00         | 1,955,531.00      | 130,551                      | 40,720.00         | 2,844,689.00      | 75,785                       | 1,850.00          | 2,386,717.00      | 1060,222                  |
| 2015 | 0                 | 0              | 0                      | 245,502.00        | 1,891,107.00      | 89,350                       | 20,538.00         | 3,654,388.00      | 99,733                       | 2,666.00          | 606,993.00        | 243,952                   |
| 2016 | 0                 | 0              | 0                      | 70,078.00         | 4,915,469.00      | 130,908                      | 240.00            | 3,947,536.00      | 122,936                      | 521.00            | 1,575,312.00      | 523,062                   |
| 2017 | 0                 | 0              | 0                      | 50,591.00         | 3,647,900.00      | 76,701                       | 53,402.00         | 4,201,783.00      | 136,082                      | 1,248.00          | 1,416,460.00      | 450,900                   |
| 2018 | 0                 | 0              | 0                      | 88,782.00         | 3,480,568.00      | 72,988                       | 124,067.00        | 5,602,962.00      | 147,316                      | 6,826.00          | 1,422,358.00      | 363,089                   |
| 2019 | 0                 | 0              | 0                      | 409.00            | 3,463,796.00      | 83,591                       | 97,077.00         | 4,099,618.00      | 114,256                      | 8,747.00          | 990,038.00        | 291,207                   |
| 2020 | 0                 | 0              | 0                      | 34,305.00         | 3,621,373.00      | 89,233                       | 12,562.00         | 5,725,106.00      | 153,306                      | 9,579.00          | 806,280.00        | 145,678                   |
| 2021 | 0                 | 0              | 0                      | 37,336.00         | 8,589,715.00      | 159,366                      | 72,574.00         | 5,932,385.00      | 152,108                      | 41,664.00         | 989,606.00        | 262,798                   |
| 2022 | 133,990.00        | 4,462,667.00   | 104,499                | 21.00             | 1,821,837.00      | 36,076                       | 625.00            | 2,593,828.00      | 77,607                       | 2,884.00          | 319,951.00        | 84,038                    |
| 2023 | 29,137.00         | 9,553,643.00   | 194,016                | 0                 | 0                 | 0                            | 0                 | 0                 | 0                            | 0                 | 0                 | 0                         |
| 2024 | 187,915.00        | 7,397,027.00   | 159,279                | 0                 | 0                 | 0                            | 0                 | 0                 | 0                            | 0                 | 0                 | 0                         |

Note = Brazilian foreign trade statistics data portal [<https://comexstat.mdic.gov.br/en/geral/112491>] NCM 32041810 and NCM 32041911 = Carotenoids. NCM 320419912 = preparations containing  $\beta$ -carotene, methyl or ethyl esters of 8'-apo- $\beta$ -carotenoic acid or canthaxanthin, with oils or vegetable fats, starch, gelatin, sucrose or dextrin, suitable for coloring foods. NCM 32041919 = other preparations based on caratenoids. E+I = Exports + Imports. Period = from January 2014 to September 2024.

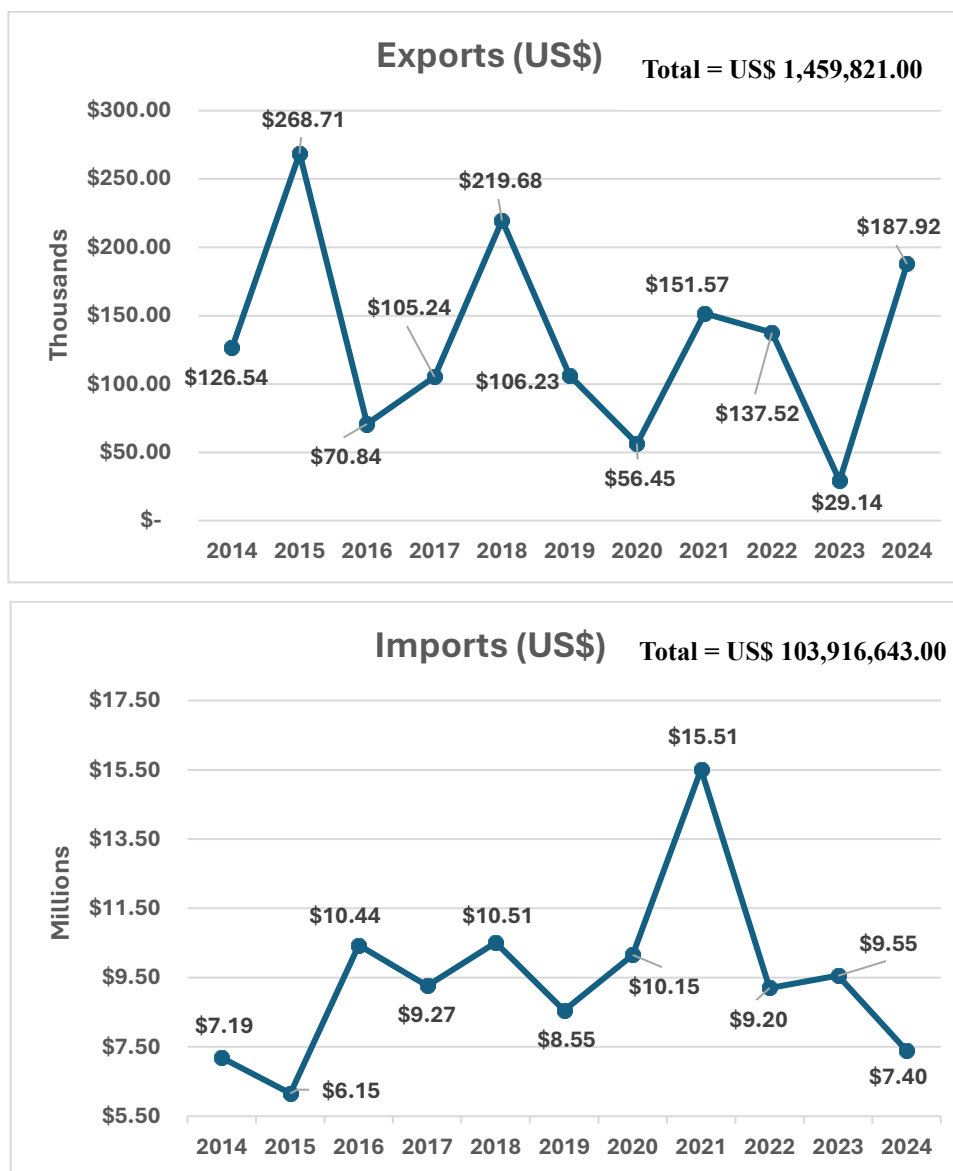
**Table 2** - Overview Brazilian import and export of carotenoids and their derivatives from 2014 to 2024.

| Year         | Subtotal            |                       |                  |                     |                   |
|--------------|---------------------|-----------------------|------------------|---------------------|-------------------|
|              | Exports (US\$)      | Imports (US\$)        | Net Weight       |                     |                   |
|              |                     |                       |                  | E+I (Kg)            |                   |
| 2014         | 126,535.00          | 7,186,937.00          | 1.266,558        |                     |                   |
| 2015         | 268,706.00          | 6,152,488.00          | 433,035          |                     |                   |
| 2016         | 70,839.00           | 10,438,317.00         | 776,906          |                     |                   |
| 2017         | 105,241.00          | 9,266,143.00          | 663,683          |                     |                   |
| 2018         | 219,675.00          | 10,505,888.00         | 583,393          |                     |                   |
| 2019         | 106,233.00          | 8,553,452.00          | 489,054          |                     |                   |
| 2020         | 56,446.00           | 10,152,759.00         | 388,217          |                     |                   |
| 2021         | 151,574.00          | 15,511,706.00         | 574,272          |                     |                   |
| 2022         | 137,520.00          | 9,198,283.00          | 302,220          | Subtotal            |                   |
| 2023         | 29,137.00           | 9,553,643.00          | 194,016          | Net Weight Detached |                   |
| 2024         | 187,915.00          | 7,397,027.00          | 159,279          | Net Weight E (Kg)   | Net Weight I (Kg) |
| <b>Total</b> | <b>1,459,821.00</b> | <b>103,916,643.00</b> | <b>5,830,633</b> | 24,602              | 5,806,031         |

Note = Brazilian foreign trade statistics data portal [<https://comexstat.mdic.gov.br/en/geral/112491>] Period = from January 2014 to September 2024.

Considering that Brazil hosts a huge biodiversity of plants and microorganisms that are carotenoid producers, and based on these data, it becomes clear that Brazil imports a large quantity of carotenoids for industrial applications, by spending about US\$ 103 M and exports only around 1.5 M (**Figure 4**), probably due to a lack of initiatives and investments in the industrial sector to develop it. We hypothesize a positive scenario to strengthen the Brazilian carotenoid market considering alternatives from our biodiversity to produce carotenoids, resulting in increased exports and decreased imports. To achieve this goal, systematic scientific research must be stimulated with technological and biotechnological approaches to uncover new plant or microbial sources, as well as sustainable processes to produce high yields of carotenoids.

**Figure 4** - Illustration of Brazilian export (in thousand per year) and import (in million per year) of carotenoid and their derivatives.



## 5. YEASTS OF GENUS *Rhodotorula* FOUND IN THE BRAZILIAN BIOMES

Brazil is one of the countries with one of the richest biodiversity in the world, containing six biomes: Amazonia, Cerrado, Caatinga, Atlantic Rainforest, Pantanal and Pampa (Souza et al., 2020).

The Amazonia is the largest area of remaining tropical forest in the world (3.5 million km<sup>2</sup>) and one of the most important ecosystems in the world. The Amazonia biome holds one of the largest existing biodiversity, which is vital for the functioning of the biosphere. This biome can provide many goods and services for humanity with considerable economic and social value, especially for food and pharmaceutical industries, among others (Foley et al., 2007; Thomaz et al., 2020).

Cerrado, is predominant in the central region of Brazil, present in the states of Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Goiás, western Minas Gerais and Bahia, and in the Northeast. It also occupies some parts of Pará, Maranhão, Rondônia São Paulo and Paraná. (Batlle-Bayer *et al.*, 2010). The national area is 2 million km<sup>2</sup>, representing 23% of the Brazilian territory and 11% of South America. Its vegetation has species capable of withstanding extreme environments (Arruda et al., 2022; Batlle-Bayer et al., 2010; V. C. Maia & Silva, 2021).

Caatinga, a biome 100% hosted by Brazil, is a semi-arid ecosystem that corresponds to 10% of the Brazilian territory and 60% of the northeast region. Its environmental and chemical characteristics are unique (Aquino et al., 2022; de Albuquerque et al., 2007). It has dry and thorny shrub vegetation, and due to its temperature and little rainfall it is also categorized as a seasonal tropical forest (de Albuquerque et al., 2007; Tubelis, 2020).

The Atlantic Forest is one of the most fragmented tropical/subtropical forests in the world, located along almost the entire Brazilian coast (R. A. F. de Lima et al., 2020). Its vegetation is seasonal semi-deciduous, the climate has two well-defined seasons: cold dry and hot rainy. The average temperature is 19 °C with rainfall with an average volume of 13 mm (Mello et al., 2007; Teixeira et al., 2020).

Pantanal, the smallest biome in Brazil, is one of the wettest regions in the world, and covers 140,000 km<sup>2</sup> in Brazil. This biome is predominant in the states of Mato Grosso and Mato Grosso do Sul (Marengo et al., 2021; Pott & Pott, 2004; Tomas et al., 2019). This large alluvial plain represents a complex of interconnected aquatic, terrestrial and wetland ecosystems. The dry and wet seasons are well defined, with rainfall in the summer (Alho & Silva, 2012; Marengo et al., 2021).

Pampa is the second smallest biome in the country, occupying an area of 176,496 km<sup>2</sup>. It is present in the state of Rio Grande do Sul (Barbosa et al., 2022; Roesch et al., 2009). The region is a temperate zone, with well-defined seasons, a predominantly rainy subtropical climate, without dry periods and negative temperatures in winter (Instituto Brasileiro de

Geografia e Estatística, 2019). This biome is not very dense, and its vegetation consists of herbaceous plants and shrubs (Barbosa et al., 2022; Roesch et al., 2009).

Concerning biodiversity, all the Brazilian biomes can be seen as specific incredible habitats for a huge number of animals, plants, including macroscopic and microscopic beings. Regarding microorganisms, it will be focus on yeasts of the genus *Rhodotorula* present in all the Brazilian biomes to summarize where they were investigated, which species inhabit these sites, and the relevant gaps in relation to what other literatures has not yet addressed (Table 3).

**Table 3** - Yeasts of genus *Rhodotorula* found in the Brazilian biomes as promising natural sources of carotenoids.

| Brazilian Biome          | Yeast                                                                                                           | Origin                                                                                              | Collection site                                    | Cultivation medium               | Total Carotenoid contents (µg/g or µg/L) | Carotenoid composition | Carotenoid identification | Yeast identification                  | Biomass (g/L) | Reference                       |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------------|------------------------|---------------------------|---------------------------------------|---------------|---------------------------------|
| <b>Amazon Rainforest</b> | <i>R. mucilaginosa</i> ,<br><i>R. glutinis</i> ,<br><i>R. aurantiaca</i> and<br><i>R. minuta</i>                | Maracá Island/RR                                                                                    | Soil from the Maracá Ecological Station            | Synthetic medium (YM)            | NR                                       | NR                     | NR                        | PCR, <i>de novo</i> sequencing, BLAST | NR            | (Vital et al., 2002)            |
| <b>Amazon Rainforest</b> | <i>R. mucilaginosa</i>                                                                                          | Sossego mine - Canaã dos Carajás/PA                                                                 | water in copper waste lake                         | Synthetic medium (YEPD)          | NR                                       | NR                     | NR                        | Microscopy                            | NR            | (Salvadori et al., 2017)        |
| <b>Amazon Rainforest</b> | <i>Rhodotorula</i> sp.                                                                                          | Villages of Ipiranga (2nd Special Border Platoon - PEF), Vila Bitten court (3rd PEF) and Cucuí - AM | rivers in the localities and close to the tribes   | Synthetic medium (SDA)           | NR                                       | NR                     | NR                        | Microscopy                            | NR            | (Pecher et al., 1988)           |
| <b>Amazon Rainforest</b> | <i>Rhodotorula</i> sp.                                                                                          | Belém/PA                                                                                            | Brazil nut                                         | Synthetic medium (nutrient agar) | NR                                       | NR                     | NR                        | MIDI Microbial Identification System  | NR            | (Freire & Offord, 2002)         |
| <b>Cerrado</b>           | <i>R. glutinis</i><br><i>R. mucilaginosa</i><br><i>R. graminis</i><br><i>R. aurantiaca</i><br><i>R. lactose</i> | Barra dos Garças; Pontal do Araguaia and Aragarças - GO; UNESP - São José do Rio Preto - SP         | Sheets; fruits; flowers; tree bark; Earth; insects | Synthetic medium (YM)            | 118.84 µg/g<br>790.31 µg/L               | NR                     | NR                        | PCR                                   | 6.65          | (W. R. C. Machado, 2018)        |
| <b>Cerrado</b>           | <i>R. toruloides</i> and<br><i>Rhodotorula</i> sp                                                               | GO-194 – Aragarças/GO (latitude - 15.926710, longitude - 52.234504)                                 | Soil, leaves and flowers                           | Synthetic medium (YM)            | 461.59 to 1349.54 µg/L                   | NR                     | NR                        | PCR                                   | 5.36-12.83    | (W. R. M. Machado et al., 2019) |
| <b>Cerrado</b>           | <i>R. mucilaginosa</i>                                                                                          | Bacaba/MT; Lagoa/PA; Ponte Alta/PA                                                                  | Unspecified vegetation                             | Synthetic medium (YM)            | NR                                       | NR                     | NR                        | PCR, and comparison with GenBank      | NR            | (dos Santos et al., 2019)       |

| (BLAST, NCBI) |                                                                                 |                                                                             |                                                                                                                                 |                                  |                                                                                         |    |    |                                            |                              |                                    |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|----|--------------------------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| Cerrado       | <i>R. mucilaginosa</i>                                                          | Rocky fields Serra do Cipó National Park/MG; south of Serra do Espinhaço/MG | Water samples from bromeliads ( <i>Papiliotrema laurentii phytotelmata</i> )                                                    | Synthetic medium (YM)            | NR                                                                                      | NR | NR | PCR                                        | NR                           | (Morais et al., 2020)              |
| Cerrado       | <i>R. mucilaginosa</i>                                                          | Barra do Bugres/MT                                                          | Fruits                                                                                                                          | Synthetic medium (YPD)           | NR                                                                                      | NR | NR | NR                                         | NR                           | (de Andrade Silva et al., 2019)    |
| Cerrado       | <i>R. mucilaginosa and Rhodotorula diobovata</i>                                | Arinos/MG                                                                   | fruits of <i>Annona crassiflora</i> Mart. (araticum), Syagrus oleracea Becc (guariroba coconut), Butia capitata (azedo coconut) | Synthetic medium (YM)            | NR                                                                                      | NR | NR | Sanger method skin sequencing              | NR                           | (Vale et al., 2021)                |
| Cerrado       | <i>R. lactose</i>                                                               | Barra do Garças/MT                                                          | ground; sheets; tree bark; flower petals                                                                                        | Synthetic medium (YM)            | 194.17 µg/g - 776.67 µg/L   <br>CCD = 131.55 to 147.36 µg/g and 1019.84 to 1387.63 µg/L | NR | NR | PCR                                        | 6.60   <br>CCD= 5.05 - 10.72 | (W. R. C. Machado & Bianchi, 2021) |
| Caatinga      | <i>R. mucilaginosa</i> (former <i>R. rubra</i> )                                | Not specified                                                               | oral cavity of the snake <i>Lygophis dilepis</i> and the skin of the frog <i>Rhinella jimi</i>                                  | Synthetic medium (YEPD)          | NR                                                                                      | NR | NR | PCR                                        | NR                           | (Castelo-Branco et al., 2021)      |
| Caatinga      | <i>R. acheniorum, R. aurantiaca, R. glutinis R. mucilaginosa R.. aurantiaca</i> | Garanhuns, São Vicente Férrer and Macaparana/PE                             | <i>Vitis labrusca</i> in Garanhuns/PE; <i>Coffea arabica</i> leaves in Garanhuns/PE;                                            | Synthetic medium (PDA; SDA; YPG) | NR                                                                                      | NR | NR | Morphological identification by microscopy | NR                           | (T. E. F. de Lima et al., 2013)    |

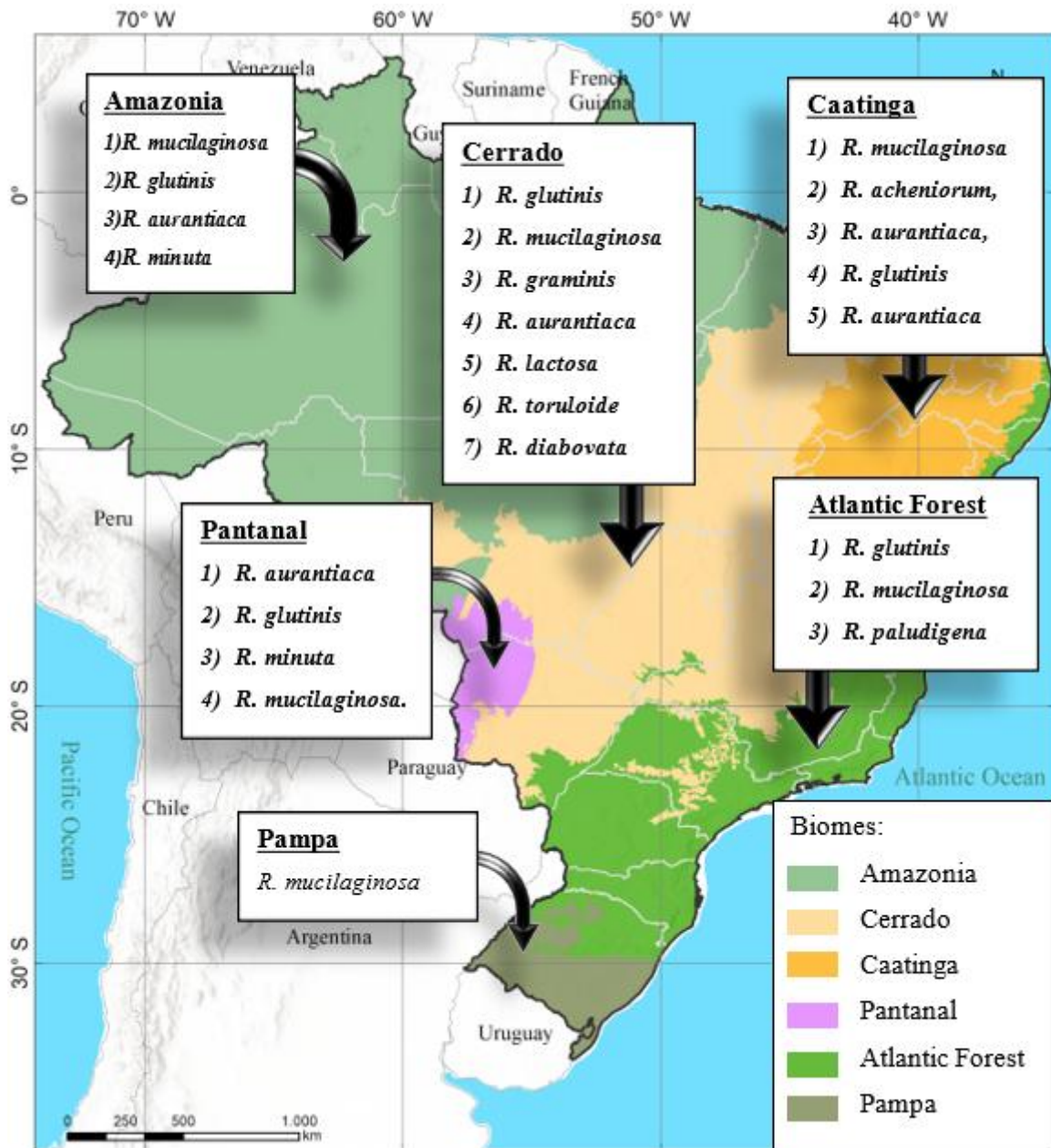
|                                         |                                                                          |                                                                                                  |                                                                                           |                                                                                                          |                            |                               |      |                                                                                                |                 |                                       |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|-------------------------------|------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------------------------------------|
| São Vicente<br>Férrer and<br>Macaparana |                                                                          |                                                                                                  |                                                                                           |                                                                                                          |                            |                               |      |                                                                                                |                 |                                       |
| <b>Caatinga</b>                         | <i>R. glutinis</i><br><i>R. mucilaginosa</i>                             | Pici Campus,<br>UFC -<br>Fortaleza/CE                                                            | Ground                                                                                    | Synthetic<br>medium<br>(MGYP,<br>potato-<br>glucose agar)                                                | NR                         | NR                            | NR   | Spectrophotome<br>try with<br>VITEC®2 mass<br>spectrum from<br>BioMérieux®<br>SA               | NR              | (Cunha et al.,<br>2018)               |
| <b>Caatinga</b>                         | <i>Rhodotorula sp.</i>                                                   | Furna do<br>Morcego cave -<br>Catimbau<br>National Park<br>(PARNA<br>Catimbau) in<br>Pernambuco. | Carven air,<br>guano, bat oral<br>cavity, wings<br>and hair                               | Synthetic<br>medium<br>(SDA)                                                                             | NR                         | NR                            | NR   | Morphological<br>(microscopy),<br>PCR and<br>sequencing                                        | NR              | (M. L. de S.<br>Pereira, 2021)        |
| <b>Caatinga</b>                         | <i>R. glutinis</i>                                                       | Caatinga in the<br>state of PE                                                                   | Semi-arid soil                                                                            | Synthetic<br>medium<br>(Sabouraud)<br>+<br>supplementati<br>on with crude<br>glycerin and<br>corn liquor | 123.12 to<br>156.65 µg/g   | β-Carotene                    | HPLC | NR                                                                                             | 4.98            | (Andrade et al.,<br>2016)             |
| <b>Caatinga</b>                         | <i>R. mucilaginosa</i> ,<br><i>R. glutinis</i><br><i>Rhodotorula sp.</i> | Morro da<br>Pioneira - Serra<br>da Jiboia region<br>- BA                                         | Bromeliad<br>flowers and<br>water                                                         | Synthetic<br>medium (YE)                                                                                 | NR                         | NR                            | NR   | API 20 C AUX<br>System                                                                         | NR              | (Santos, 2012)                        |
| <b>Atlantic<br/>Forest</b>              | <i>R. glutinis</i>                                                       | Campinas and<br>Holambra/SP                                                                      | Tomato puree,<br>soil from<br>Campinas,<br>sugar cane<br>leaves and soil<br>from Holambra | Synthetic<br>medium<br>(GPYM)                                                                            | 54.7µg/g to<br>61.4µg/g    | β-Carotene<br>and<br>Torulene | HPLC | Comparative<br>analysis of<br>morphology,<br>physiological<br>and metabolic<br>characteristics | 6.7 – 8.7       | (Maldonade et<br>al., 2007)           |
| <b>Atlantic<br/>Forest</b>              | <i>R. mucilaginosa</i>                                                   | São José do Rio<br>Preto/SP                                                                      | Soil, leaves,<br>flowers, tree<br>bark and grass                                          | Synthetic<br>medium<br>(YM)                                                                              | 111.69 µg/g<br>283.35 µg/L | NR                            | NR   | NR                                                                                             | 3.27 to<br>6.30 | (W. R. C.<br>Machado et al.,<br>2019) |
| <b>Atlantic<br/>Forest</b>              | <i>R. mucilaginosa</i>                                                   | Bairro Novo and<br>Casa Caiada<br>beaches in<br>Olinda/PE                                        | Sand and sea<br>water                                                                     | Synthetic<br>medium<br>(SDA and<br>YE)                                                                   | NR                         | NR                            | NR   | Physiological<br>observation by<br>microscopy                                                  | NR              | (Loureiro et al.,<br>2005)            |

|                                  |                                                               |                                                                |                                          |                                                                     |                   |                                    |      |                                                                              |                |                                            |
|----------------------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------|------------------------------------|------|------------------------------------------------------------------------------|----------------|--------------------------------------------|
| <b>Atlantic Forest</b>           | <i>Rhodotorula sp.</i>                                        | Southeastern Brazil                                            | Not specified                            | Synthetic medium (GYMP)                                             | NR                | NR                                 | NR   | Not specified                                                                | NR             | (Alvarado-Huallanco & Maugeri-Filho, 2010) |
| <b>Atlantic Forest</b>           | <i>R. mucilaginosa</i>                                        | Catanduva, Colina, Elisiário and Novais/SP                     | Orange leaves ( <i>Citrus sinensis</i> ) | Synthetic medium (YM)                                               | NR                | NR                                 | NR   | ITS sequencing sequence from BLAST analysis and scanning electron microscopy | NR             | (Gai et al., 2009)                         |
| <b>Atlantic Forest</b>           | <i>R. paludigena</i>                                          | Ilhéus/BA                                                      | Cocoa tree (leaves, flowers and fruits)  | Synthetic medium (YEPD)                                             | NR                | NR                                 | NR   | Common microscopy and PCR and comparison with NCBI                           | NR             | (Neto et al., 2021)                        |
| <b>Atlantic Forest and Pampa</b> | <i>R. mucilaginosa</i>                                        | Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul                   | Freshly extracted apple must             | Synthetic medium (YALYS, rose bengal chloramphenicol, YMA and GPYB) | NR                | NR                                 | NR   | Satellite prepared Micro/mini PCR (MPP-PCR) fingerprint method.              | NR             | (Pietrowski et al., 2018)                  |
| <b>Pampa</b>                     | <i>R. mucilaginosa</i>                                        | Sul-Riograndense Shield and the East Coast of the South region | Soil, bark, flowers leaves and fruits    | Synthetic medium (YM)                                               | 230 to 360 µg/L   | β-Carotene and β-Cryptoxanthin     | HPLC | Mini/microsatellite-primed PCR technique (MSP-PCR)                           | 12.02 to 12.49 | (Otero et al., 2019)                       |
| <b>Pampa</b>                     | <i>R. mucilaginosa</i>                                        | Middle Coast and South Shield-Rio-Grandense/RS                 | Not specified                            | Synthetic medium (YM)                                               | 17.6 to 83.5 µg/L | Astaxanthin, Lutein and β-Carotene | HPLC | Mini/microsatellite-primed PCR technique (MSP-PCR)                           | 6.4            | (Cipolatti et al., 2019)                   |
| <b>Pampa</b>                     | <i>R. mucilaginosa</i>                                        | Rio Grande do Sul                                              | Aerial parts of plants                   | Synthetic medium (DAS)                                              | NR                | NR                                 | NR   | Microscopy                                                                   | NR             | (Barros et al., 2013)                      |
| <b>Pantanal</b>                  | <i>R. aurantiaca; R. glutinis; R. minuta; R. mucilaginosa</i> | Cuiabá and Várzea Grande/MT                                    | Dust of libraries                        | Synthetic medium (Sabourand agar)                                   | NR                | NR                                 | NR   | NR                                                                           | NR             | (Leite Júnior et al., 2018)                |

Note: AM = Amazonas state. BA = Bahia state. CCD = Central Composite Design. CE = Ceará state. GYMP = Glucose, Yeast extract, Malt, Peptone. GO = Goiás state. GPYM = Glucose, Peptone, Yeast extract, Malt. NCBI = National Center for Biotechnology Information. NR = not reported. PA = Pará state. PDA = Potato Dextrose Agar. PE = Pernambuco state. PCR = Polymerase chain

reaction method. RR = Roraima state. RS = Rio Grande do Sul state. SDA = Sabouraud Dextrose Agar. SP = São Paulo state. HPLC = High Performance Liquid Chromatography. MG = Minas Gerais state. MT = Mato Grosso state. MGYE = Malt extract Glucose Yeast extract Peptone agar. NR = not reported. UFC = Federal University of Ceará. YE = Yeast Extract. YEPD = Yeast Extract Peptone Dextrose. YMA = Yeast Mannitol Agar. YPD = Yeast Peptone Dextrose. YPG = Yeast Extract Peptone Glycerol. YM = Yeast Malt

**Figure 5** - Layout of *Rhodotorula* species in Brazilian biomes.



Note: Adapted from Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2024)

In the Amazon region, some studies reported the presence of *R. mucilaginosa* in samples from mines in Southeast Pará using its dead mass for nanobioremediation, recovery of silver metals and absorption of metallic copper ions in wastewater (Salvadori et al., 2014, 2017). Furthermore, species were found in soils at the Maracá Ecological Station in Roraima, with emphasis on *R. mucilaginosa*, *R. glutinis* and *R. minuta*. In this study, resistance to mycocins in *Williopsis saturnus*, *Issatchenkia* sp. and *Saccharomyces exiguus* also isolated from the same region (Vital et al., 2002), and *R. rubra/mucilaginosa* was isolated in samples of non-

keratinophilic soil (Mok et al., 1984). During the data collection, there were few studies on yeasts of the *Rhodotorula* genus in Amazonia compared to other biomes, which is surprising since this biome is a biodiversity hotspot as it concentrates endemic species of plants, invertebrates, and yeasts (Barros et al., 2013; Myers et al., 2000). The reasons may be diverse, from lack of interest or lack of investment in research that discovers the presence of this genus in the Amazon region to the difficulty in going to places to collect samples.

In studies with the objectives of describing the occurrence and diversity of yeasts cultivable in Cerrado fruits and evaluating the potential of isolated strains for the production of carotenoids, some species of *Rhodotorula* were found (*R. glutinis*, *R. mucilaginosa*, *R. graminis*, *R. aurantiaca*, *R. lactosa*, *R. diobovata*, *R. toruloides*). These species were present in leaf samples, fruits (*Anacardium humile* Mart., *Annona crassiflora* Mart., *Butia capitata* Mart., *Caryocar brasiliense* Cambess., *Eugenia dysenterica* DC., *Hancornia speciosa* Gomes, *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex Hayne, *Mauritia flexuosa* Lf., *Passiflora cincinnata* Mast., *Psidium cattleianum* Sabine, *Solanum lycocarpum* A.St-Hil, *Syagrus oleracea* Becc and *Talisia esculenta* Radlk), flowers, tree bark, soil, and insects, although plant and insect species were not mentioned in the studies (W. R. C. Machado, 2018; W. R. C. Machado et al., 2019; Vale et al., 2021).

In the research of W. R. C. Machado & Bianchi (2021), *Rhodotorula* yeasts were isolated from soil and cultivated in synthetic/commercial medium (YM), followed by identification by DNA analysis (PCR), and the authors highlighted *R. lactosa* with high carotenoid production of 194.17 µg/g (dry basis) and 776.67 µg/L (wet basis) in 6.6 g/L of biomass. After applying the optimization of carotenoids production by the central composite design (DCC) 2<sup>2</sup>, with low agitation (130 rpm) and at room temperature (25 °C), the production was favored, reaching 188.40 µg/g of carotenoids in 5.05 g/L of biomass. The same authors showed an expressive increase in the volumetric production of carotenoids by reducing the components of the culture medium associated with high levels of glucose and concluded that *R. lactosa* needs small amounts of nitrogen sources and large amounts of carbon sources.

In an investigation of W. R. C. Machado (2018), the authors selected wild carotenogenic yeasts from the Cerrado biome, specifically from soils, flowers, leaves and fruits, but without specifying the species of flowers, leaves and fruits, and not even showed on map the exact location of yeast-soil isolated, which demonstrated some lack of information. The medium used for the collection was Yeast Malt (YM), being Potato Dextrose Agar (PDA) used for the characterization of isolated and pure strains, GYMP (Glucose, Yeast extract, Malt

Extract and Monobasic sodium Phosphate) for the maintenance of strains, and finally YM for the inoculum.

In the Caatinga biome, studies demonstrated the presence of *Rhodotorula* in samples taken from the oral cavity and cloaca of reptiles, from the surface of the skin of amphibians (Castelo-Branco et al., 2021), bats (from the oral cavity, wings and hair) and in caves (from the air and guano – natural organic fertilizer which originates from the mixture between bat excrement and cave minerals), but this research did not focus on the production of carotenoids (M. L. de S. Pereira, 2021). Studies by Andrade et al. (2016) and Mendes-Silva et al. (2020) reported the presence of  $\beta$ -carotene produced by *R. glutinis* in semi-arid soil samples from the Caatinga biome. According to the authors, the total carotenoid content was 123.12  $\mu\text{g/g}$ , in the absence of light. With the supplementation of crude glycerin, steep corn liquor and peptone, there was an increase in production, reaching 127.86  $\mu\text{g/g}$  after 96 hours of cultivation, under the influence of blue LED light. During the optimization runs, the presence of  $\beta$ -carotene was confirmed by HPL in the supplemented media plus the addition of blue LED and its exclusion, with the yield being higher in the absence of light (100.60  $\mu\text{g/g}$ ) than in its presence (82.02  $\mu\text{g/g}$ ).

On the other hand, several studies were developed in the Atlantic Forest region, mainly in the state of São Paulo (Alvarado-Huallanco & Mauger-Filho, 2010; Maldonado et al., 2012; Squina et al., 2002). A greater variety of yeast species were found: *R. mucilaginosa*, *R. graminis*, with 8.7 g/L of biomass production and 61.4  $\mu\text{g/g}$  of carotenoid production (Maldonado et al., 2007), being *R. glutinis* (Santos, 2012) and *R. minuta* (Mautone, 2008) also found in this region. These *Rhodotorula* yeasts were isolated from samples of soil, leaves, fruits, flowers and processed foods, with  $\beta$ -carotene predominant in *R. graminis*, and torulene the predominant carotenoid in *R. mucilaginosa* (Maldonado et al., 2007). Moreover, *Rhodotorula* yeasts were also isolated from fig tree species (*Ficus cestrifolia*, *F. lushnathiana* and *Coussapoa microcarpa*) (Mautone, 2008), from flowers belonging to the species *Sobralia liliastrum*, *Epidendrum secundum*, *Fabaceae sp.*, *Mirtaceae sp.*, *Lamiaceae sp.*, and from water from a pond bromeliad belonging to the species *Alcantarea nahoumii* (Santos, 2012).

In the Pampa biome, the presence of *Rhodotorula* in the Rio Grande do Sul State, on the east coast of the southern region, mainly represented by *R. mucilaginosa*, was found in samples of aerial parts of plants, soil, bark of trees, leaves, fruits and apple must, but the environmental species from which these samples were taken were not informed. In this species,  $\beta$ -carotene,  $\beta$ -cryptoxanthin, astaxanthin, and lutein were the carotenoids identified (Barros et al., 2013; Cipolatti et al., 2019; Otero et al., 2019), being 13.5 g/L of biomass obtained in YM

medium after 96 h. From this biomass, 93.9  $\mu\text{g}$  carotenoids/g of were observed and 1068.5  $\mu\text{g}$  carotenoids/L were obtained, with high productivity in the YM medium (83.5  $\mu\text{g}$  carotenoids/L/h) (Cipolatti et al., 2019). The results obtained by Otero et al. (2019), also in YM medium, showed biomass of 11.23 g/L and 280  $\mu\text{g}$  carotenoids/L.

Regarding the Pantanal biome, during the information gathering, few studies have found that reported *Rhodotorula*. In these studies, samples of fruits, flowers and dusts were collected; and some species identified as *R. aurantiaca*, *R. glutinis*, *R. minuta* and *R. mucilaginosa* (Hernalsteens, 2006; Leite Júnior et al., 2018; Maugeri & Hernalsteens, 2007). Furthermore, the exact locations (city, municipality, environmental park, or other location) from where the *Rhodotorula* yeasts had been taken were not reported, nor the carotenoid determination were carried out in most studies.

## 6. OTHER RELEVANT INSIGHTS

In general, optimization procedures varying the process conditions of biotechnological cultivation were the most frequent strategies adopted by the researchers aiming to increase carotenoid production. The carotenoid contents are commonly reported as total contents, by spectrophotometry, which does not allow the precise assignment of the carotenoid composition, the results expressed as equivalents of  $\beta$ -carotene based on the specific absorption coefficient of  $\beta$ -carotene in a selected analytical solvent. However, one of the main gaps observed in our review is the lack of information regarding the individual composition of carotenoids produced by the isolated *Rhodotorula* yeasts, at least, by chromatographic techniques. By this review, only four papers confirmed the carotenoid composition by high performance liquid chromatography (Table 3). In all the Brazilian biomes, the major identified carotenoid was  $\beta$ -carotene, which can be seen as an excellent observation, since it is the most used carotenoid by the food, pharmaceutical and cosmetic industries (Igreja et al., 2021; C. Zhang, 2018).

According to the selected papers (W. R. C. Machado, 2018; W. R. C. Machado & Bianchi, 2021), the production of carotenoids by *Rhodotorula* yeasts seems to be high in soil and flowers, varying from 50 to 194  $\mu\text{g/g}$ . The *R. lactosa* (QWRR) sample was taken from Cerrado soil, which showed an orange color, which was identified by PCR as *R. lactosa*, with the highest carotenoid contents (194.17  $\mu\text{g/g}$ ) and biomass of 4.0 g/L. The second highest carotenoid production (118.84  $\mu\text{g/g}$  and biomass 6.65 g/L) was reported for *R. glutinis* (ADSF) from flower samples, whose strain showed a pinkish color.

After maximizing the biotechnological procedure by varying stirring and temperature of cultivation, high contents of carotenoids were observed for *R. lactosa* (188.4 µg/g in 5.05 g/L of biomass) and for *R. glutinis* (92.52 µg/g in 8.14 g/L of biomass). For both the yeasts cultivation, changes in the total contents of carotenoids and biomasses seemed to occur at the lowest level of agitation (130 rpm) and temperature (25 °C) after 144 h of cultivation at initial pH of 5 (W. R. C. Machado, 2018). Furthermore, in this same study, *R. mucilaginosa*, which was obtained at the São Paulo State University (UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brazil), belonging to both the Cerrado and Atlantic Forest biomes, with no specification about the collection site, produced 252.99 µg carotenoids/g in 16.46 g/L of biomass, cultivated at 25°C, pH of 6.5 and agitation at 130 rpm.

In another study also by W. R. M. Machado et al. (2019), with samples of soil, leaves and fruits, and again without specifying the plant species, the microorganisms were inoculated in YM medium, which later showed a pinkish color. After identification by PCR, it was found that the colonies were *R. toruloides* and *Rhodotorula sp*, and they showed carotenoid production of 639.05 µg/L and 609.80 µg/L, respectively. After the optimization procedure, the authors concluded that *R. toruloides* required minimal amounts of nitrogen to maintain cell development and large amounts of carbon for carotene synthesis, in addition to pH 6 for the production of carotenoids (106.92 µg/g) (W. R. M. Machado et al., 2019).

The species *R. mucilaginosa* was found in the Cerrado region in the states of Mato Grosso (municipality of Bacaba), Pará (in Lagoa and Alta) (dos Santos et al., 2019), Minas Gerais (Parque Nacional da Serra do Cipó and Serra do Espinhaço) (Moraes et al., 2020) and in another city in the Mato Grosso state, called Arinos (Vale et al., 2021).

Comparing the gathered information, it is clear that some investigations did not specify relevant information such as the plant and fruit species (Barros et al., 2013; Otero et al., 2019) in the Pampa biome, which could make it difficult to reproduce the study. The same situation occurred in studies in the Pantanal biome, with the lack of the exact location for sample collection (Hernalsteens, 2006; Leite Júnior et al., 2018; Maugeri & Hernalsteens, 2007). In the Atlantic Forest, plant species used were not mentioned (Alvarado-Huallanco & Maugeri-Filho, 2010; Maldonade et al., 2007). Most research carried out in this biome used samples from plant sources, indicating a wide presence of *Rhodotorulas* in them. However, few studies were noted with qualitative and, mainly, quantitative results on carotenoid production.

*Rhodotorula* yeasts are frequently found in the Caatinga and Cerrado in soil samples, but also quite often in plant samples (Andrade et al., 2016; W. R. C. Machado et al., 2019; W. R. M. Machado et al., 2019; Mendes-Silva et al., 2020). Furthermore, in the Cerrado biome,

studies showed a greater variety of carotenogenic *Rhodotorulas* species in relation to the other biomes, namely: *R. glutinis*, *R. graminis*, *R. aurantiaca*, *R. lactosa* and *R. mucilaginosa* (W. R. C. Machado, 2018).

In summary, based on this review and the figure 5, *R. musilaginosa* was found in all the Brazilian biomes, seemed to be the most frequent *Rhodotorula* in Brazil. The Cerrado biome had the largest number of *Rhodotorula* species, seven in total (*R. glutinis*, *R. mucilaginosa*, *R. graminis*, *R. aurantiaca*, *R. lactose*, *R. toruloide*, and *R. diabovata*), followed by Caatinga with five (*R. mucilaginosa*, *R. acheniorum*, *R. aurantiaca*, *R. glutinis*, and *R. aurantiaca*), Amazon Rainforest with four (*R. mucilaginosa*, *R. glutinis*, *R. aurantiaca*, and *R. minuta*) and Pantanal with also four (*R. aurantiaca*, *R. glutinis*, *R. minuta* and *R. mucilaginosa*).

## 7. CONCLUSION AND FUTURE PERSPECTIVES

Carotenoids are very beneficial compounds with high biological and technological properties to be used as natural food colorants and antioxidants. These properties have been stimulating the global market of carotenoids for industrial application as relevant opportunities to increase exportation in Brazil. However, current consumers demand natural sources of food additives to accomplish the adoption of healthier habits, but mostly commercially available carotenoids are still produced by chemical synthesis as such method results in high yields and less industrial cost. Our review intended to highlight alternative biotechnological options to produce carotenoids by *Rhodotorula* yeasts that do not depend on availability, seasonality or other agronomic and geographic factors as compared to plant sources.

All the Brazilian biomes have high potential to contribute with a number of *Rhodotorula* yeasts to be further investigated to the production of selected carotenoids to stimulate the growing of national bioeconomy. It becomes clear that all the Brazilian biomes need more research focused on the identification of carotenoids sources as very few have been developed and much more can still be discovered and improved in this area.

**Author Contributions:** **Conceptualization:** David Lucas, Renan Chisté. **Methodology:** David Lucas, Renan Chisté. **Investigation:** David Lucas, Renan Chisté. **Resources:** Renan Chisté. **Data curation:** David Lucas. **Writing-original draft:** David Lucas, Renan Chisté. **Writing-review & editing:** David Lucas, Renan Chisté. **Visualization:** David Lucas, Renan Chisté. **Supervision:** Renan Chisté. **Project administration:** Renan Chisté. **Funding**

**acquisition:** Renan Chisté. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil- Finance code 001), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil, Project 314929/2021-5).

**Data Availability Statement:** All data related to this manuscript are available in the form of Figures and Tables in the manuscript.

**Acknowledgments:** All authors thank Universidade Federal do Pará (UFPA), through PROPESP, Pará, Brazil, for the support.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

## 8. REFERENCES

- Alho, C. J. R., & Silva, J. S. V. (2012). Effects of Severe Floods and Droughts on Wildlife of the Pantanal Wetland (Brazil)—A Review. *Animals*, 2(4), 591–610. <https://doi.org/10.3390/ani2040591>
- Alvarado-Huallanco, M. B., & Maugeri-Filho, F. (2010). Kinetics and modeling of fructo-oligosaccharide synthesis by immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula sp.* *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(12), 1654–1662. <https://doi.org/10.1002/jctb.2477>
- Andrade, R. F. da S., Lima, R. A., Ribeaux, D. R., Araújo, H. W. C., Franco, L. O., Pessoa-Júnior, A., & Campos-Takaki, G. M. (2016). Production of  $\beta$ -Carotene by a Newly Isolated *Rhodotorula Glutinis* UCP1555 Strain and Cytotoxic Effect Evaluation. *Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 10(5), 212–220. <https://doi.org/10.17265/1934-7375/2016.05.003>
- Aquino, A. S., Silva, M. F. da, Almeida, T. S. de, Bilheri, F. N., Converti, A., & Melo, J. C. de. (2022). Mapping of Alternative Oilseeds from the Brazilian Caatinga and Assessment of Catalytic Pathways toward Biofuels Production. *Energies*, 15(18), 6531. <https://doi.org/10.3390/en15186531>
- Arruda, H. S., Araújo, M. V. L., & Marostica Junior, M. R. (2022). Underexploited Brazilian Cerrado fruits as sources of phenolic compounds for diseases management: A review. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 5, 100148. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2022.100148>
- Barbosa, R. do N., dos Santos, J. E. F., Bezerra, J. D. P., Istel, L., Houbraken, J., Oliveira, N. T., & de Souza-Motta, C. M. (2022). Brazilian Atlantic Forest and Pampa Biomes in the spotlight: an overview of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* (Eurotiales) species and the description of *Penicillium nordestinense* sp. nov. *Acta Botanica Brasilica*, 36. <https://doi.org/10.1590/0102-33062021abb0390>
- Barnett, J. A. (2004). A history of research on yeasts 8: taxonomy. *Yeast*, 21(14), 1141–1193. <https://doi.org/10.1002/yea.1154>
- Barredo, J., García-Estrada, C., Kosalkova, K., & Barreiro, C. (2017). Biosynthesis of Astaxanthin as a Main Carotenoid in the Heterobasidiomycetous Yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Journal of Fungi*, 3(3), 44. <https://doi.org/10.3390/jof3030044>
- Barros, F. M. C., Pippi, B., Dresch, R. R., Dauber, B., Luciano, S. C., Apel, M. A., Fuentefria, A. M., & von Poser, G. L. (2013). Antifungal and antichemotactic activities and quantification of phenolic compounds in lipophilic extracts of *Hypericum spp.* native to South Brazil. *Industrial Crops and Products*, 44, 294–299. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.11.017>

- Batlle-Bayer, L., Batjes, N. H., & Bindraban, P. S. (2010). Changes in organic carbon stocks upon land use conversion in the Brazilian Cerrado: A review. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 137(1–2), 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2010.02.003>
- BCC Research. (2022). The Global Market for Carotenoids. <https://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/the-global-market-for-carotenoids.html>
- Bourque, M., Dluzen, D. E., & Di Paolo, T. (2009). Neuroprotective actions of sex steroids in Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 30(2), 142–157. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2009.04.014>
- Cardoso, L. A. C., Jäckel, S., Karp, S. G., Framboisier, X., Chevalot, I., & Marc, I. (2016). Improvement of *Sporobolomyces ruberrimus* carotenoids production by the use of raw glycerol. *Bioresource Technology*, 200, 374–379. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.108>
- Castelo-Branco, D. de S. C. M., Graça-Filho, R. V. da, Oliveira, J. S. de, Rocha, M. G. da, Araújo, G. dos S., Araújo Neto, M. P. de, Cordeiro, R. de A., Pereira-Neto, W. de A., Sidrim, J. J. C., Brilhante, R. S. N., & Rocha, M. F. G. (2021). Yeast microbiota of freeranging amphibians and reptiles from Caatinga biome in Ceará State, Northeast Brazil: High pathogenic potential of *Candida famata*. *Ciência Rural*, 51(7). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200742>
- Cheng, Y.-T., & Yang, C.-F. (2016). Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 61, 270–275. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2015.12.027>
- Cipolatti, E. P., Remedi, R. D., Sá, C. dos S., Rodrigues, A. B., Gonçalves Ramos, J. M., Veiga Burkert, C. A., Furlong, E. B., & Fernandes de Medeiros Burkert, J. (2019). Use of agroindustrial byproducts as substrate for production of carotenoids with antioxidant potential by wild yeasts. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20, 101208. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101208>
- Cunha, F. A., Cunha, M. da C. S. O., da Frota, S. M., Mallmann, E. J. J., Freire, T. M., Costa, L. S., Paula, A. J., Menezes, E. A., & Fechine, P. B. A. (2018). Biogenic synthesis of multifunctional silver nanoparticles from *Rhodotorula glutinis* and *Rhodotorula mucilaginosa*: antifungal, catalytic and cytotoxicity activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(9), 127. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2514-8>
- da Fonseca Meireles, S., dos Santos, S. F., Rafael, M. S., da Mota, A. J., & da Silva, C. G. N. (2022). Yeasts from the nests of two Amazonian stingless bees: screening and PCR-RFLP molecular analysis. *Symbiosis*, 87(2), 153–163. <https://doi.org/10.1007/s13199-022-00865-w>
- de Albuquerque, U. P., de Medeiros, P. M., de Almeida, A. L. S., Monteiro, J. M., de Freitas Lins Neto, E. M., de Melo, J. G., & dos Santos, J. P. (2007). Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 114(3), 325–354. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.08.017>

- de Andrade Silva, C. A., Oka, M. L., & Fonseca, G. G. (2019). Physiology of yeast strains isolated from Brazilian biomes in a minimal medium using fructose as the sole carbon source reveals potential biotechnological applications. *3 Biotech*, 9(5), 191. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1721-9>
- de Lima, R. A. F., Oliveira, A. A., Pitta, G. R., de Gasper, A. L., Vibrans, A. C., Chave, J., ter Steege, H., & Prado, P. I. (2020). The erosion of biodiversity and biomass in the Atlantic Forest biodiversity hotspot. *Nature Communications*, 11(1), 6347. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20217-w>
- de Lima, T. E. F., de Oliveira, R. J. V., Neves, R. P., Bezerra, J. L., & de Cavalcanti, M. A. Q. (2013). Endophytic yeasts of *Coffea arabica* and *Vitis labrusca* cv. Isabel from Pernambuco, Brazil. *Nova Hedwigia*, 96(3–4), 463–469. <https://doi.org/10.1127/0029-5035/2013/0080>
- de Rosso, V. V., & Mercadante, A. Z. (2007). Identification and Quantification of Carotenoids, By HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5062–5072. <https://doi.org/10.1021/jf0705421>
- Dias, C., Sousa, S., Caldeira, J., Reis, A., & Lopes da Silva, T. (2015). New dual-stage pH control fed-batch cultivation strategy for the improvement of lipids and carotenoids production by the red yeast *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921. *Bioresource Technology*, 189, 309–318. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.009>
- dos Santos, T. T., de Oliveira, D. P., Cabette, H. S. R., & de Moraes, P. B. (2019). The digestive tract of Phylloicus (Trichoptera: Calamoceratidae) harbours different yeast taxa in Cerrado streams, Brazil. *Symbiosis*, 77(2), 147–160. <https://doi.org/10.1007/s13199-018-0577-9>
- Du, C., Li, Y., Guo, Y., Han, M., Zhang, W., & Qian, H. (2016). The suppression of torulene and torularhodin treatment on the growth of PC-3 xenograft prostate tumors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 469(4), 1146–1152. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.112>
- Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S. M., Blanc, P., Chidambara Murthy, K. N., & Ravishankar, G. A. (2005). Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Science & Technology*, 16(9), 389–406. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.02.006>
- Foley, J. A., Asner, G. P., Heil Costa, M., Coe, M. T., Defries, R., Gibbs, H. K., Howard, E. A., Olson, S., Patz, J., Ramankutty, N., & Snyder, P. (2007). Amazonia revealed: forest degradation and loss of ecosystem goods and services in the Amazon Basin. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 5(1), 25–32. [https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2007\)5\[25:ARFDAL\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2007)5[25:ARFDAL]2.0.CO;2)
- Freire, F. das C. O., & Offord, L. (2002). Bacterial and yeast counts in Brazilian commodities and spices. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33(2), 145–148. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822002000200009>

- Frengova, G. I., & Beshkova, D. M. (2009). Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(2), 163–180. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0492-9>
- Gai, C. S., Lacava, P. T., Maccheroni Jr., W., Glienke, C., Araújo, W. L., Miller, T. A., & Azevedo, J. L. (2009). Diversity of endophytic yeasts from sweet orange and their localization by scanning electron microscopy. *Journal of Basic Microbiology*, 49(5), 441–451. <https://doi.org/10.1002/jobm.200800328>
- Gómez-García, M., & Ochoa-Alejo, N. (2013). Biochemistry and Molecular Biology of Carotenoid Biosynthesis in Chili Peppers (*Capsicum spp.*). *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 19025–19053. <https://doi.org/10.3390/ijms140919025>
- Henry, L. K., Thomas, S. T., Widhalm, J. R., Lynch, J. H., Davis, T. C., Kessler, S. A., Bohlmann, J., Noel, J. P., & Dudareva, N. (2018). Contribution of isopentenyl phosphate to plant terpenoid metabolism. *Nature Plants*, 4(9), 721–729. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0220-z>
- Hernalsteens, S. (2006). Isolamento, identificação e caracterização de microrganismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileiras [Universidade Estadual de Campinas]. <https://doi.org/10.47749/T/UNICAMP.2006.382202>
- Hernández-Almanza, A., Cesar Montanez, J., Aguilar-González, M. A., Martínez-Ávila, C., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2014). *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. *Food Bioscience*, 5, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2013.11.007>
- Igreja, W. S., Maia, F. de A., Lopes, A. S., & Chisté, R. C. (2021). Biotechnological Production of Carotenoids Using Low Cost-Substrates Is Influenced by Cultivation Parameters: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8819. <https://doi.org/10.3390/ijms22168819>
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2019, May). Conheça o Brasil - Território: Biomas Brasileiros. IBGE. <https://educa.ibge.gov.br/jovens/conheca-obra-brasil/territorio/18307-biomas-brasileiros.html>
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2024). Biomas. Mapas: Adequação Do Limite Leste Do Sistema Costeiro-Marinho à Amazônia Azul. <https://www.ibge.gov.br/geociencias/informacoes-ambientais/vegetacao/15842-biomas.html>
- Kot, A. M., Błażej, S., Gientka, I., Kieliszek, M., & Bryś, J. (2018). Torulene and torularhodin: “new” fungal carotenoids for industry? *Microbial Cell Factories*, 17(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0893-z>
- Kot, A. M., Błażej, S., Kurcz, A., Gientka, I., & Kieliszek, M. (2016). *Rhodotorula glutinis*—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(14), 6103–6117. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7611-8>

- Krzysciak, P., Halska, A., & Macura, A. B. (2007). Występowanie i chorobotwórczość grzybow *Rhodotorula* spp. Postępy Mikrobiologii, 46(4), 291–300. <https://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmeta1.element.agro-article-7eecca2d-68c9-45c7-b095-5dd18554f7c5>
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T. (2011). The Yeasts, a Taxonomic Study. In C. P. KURTZMAN, J. W. FELL, & T. BOEKHOUT (Eds.), The Yeasts, a Taxonomic Study (5th ed., pp. 233–234). Taylor & Francis. <https://www.sciencedirect.com/book/9780444521491/the-yeasts#book-info>
- Leite Júnior, D. P., Pereira, R. S., de Almeida, W. S., Alves Simões, S. de A., Yamamoto, A. C. A., de Souza, J. V. R., Martins, E. R., dos Santos, F. A. L., & Hahn, R. C. (2018). Indoor Air Mycological Survey and Occupational Exposure in Libraries in Mato Grosso-Central Region—Brazil. Advances in Microbiology, 08(04), 324–353. <https://doi.org/10.4236/aim.2018.84022>
- Liu, Y.-S., Wu, J.-Y., & Ho, K. (2006). Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. Biochemical Engineering Journal, 27(3), 331–335. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.08.031>
- Loureiro, S. T. A., Cavalcanti, M. A. de Q., Neves, R. P., & Passavante, J. Z. de O. (2005). Yeasts isolated from sand and sea water in beaches of Olinda, Pernambuco state, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, 36(4), 333–337. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822005000400005>
- Machado, W. R. C. (2018). Bioprospecção de levedura para a produção de carotenoides microbianos [Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”]. <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/22c8edd7-e921-4938-94aa-534d59217fa2/content>
- Machado, W. R. C., & Bianchi, V. L. Del. (2021). Production of microbial carotenoids by *Rhodotorula lactosa* isolated in the Brazilian tropical savanna / Produção de carotenoides microbianos por *Rhodotorula lactosa* isolada na savana tropical brasileira. Brazilian Journal of Development, 7(9), 89302–89322. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n9-205>
- Machado, W. R. C., Silva, L. G. da, Vanzela, E. S. L., & Del Bianchi, V. L. (2019). Evaluation of the process conditions for the production of microbial carotenoids by the recently isolated *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409. Brazilian Journal of Food Technology, 22. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.26718>
- Machado, W. R. M., Silva, L. G., Vanzela, E. S., & Del Bianchi, V. (2019). Production of carotenoids by *Rhodotorula toruloides* isolated from Brazilian tropical savannah. In International Food Research Journal (Vol. 26, Issue 4). [http://ifrj.upm.edu.my/26%20\(04\)%202019/16%20-%20IFRJ181068.R2-Final.pdf](http://ifrj.upm.edu.my/26%20(04)%202019/16%20-%20IFRJ181068.R2-Final.pdf)
- Maia, V. C., & Silva, B. G. da. (2021). Insect galls of the Brazilian Cerrado: associated fauna. Biota Neotropica, 21(3). <https://doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2021-1202>

- Maldonade, I. R., Rodriguez-Amaya, D. B., & Scamparini, A. R. P. (2012). Statistical optimisation of cell growth and carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(1), 109–115. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000100012>
- Maldonade, I. R., Scamparini, A. R. P., & Rodriguez-Amaya, D. B. (2007). Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(1), 65–70. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000100014>
- Mannazzu, I., Landolfo, S., da Silva, T. L., & Buzzini, P. (2015). Red yeasts and carotenoid production: outlining a future for non-conventional yeasts of biotechnological interest. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(11), 1665–1673. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1927-x>
- Mantzouridou, F., Roukas, T., & Kotzekidou, P. (2002). Effect of the aeration rate and agitation speed on  $\beta$ -carotene production and morphology of *Blakeslea trispora* in a stirred tank reactor: mathematical modeling. *Biochemical Engineering Journal*, 10(2), 123–135. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(01\)00166-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(01)00166-8)
- Marengo, J. A., Cunha, A. P., Cuartas, L. A., Deusdará Leal, K. R., Broedel, E., Seluchi, M. E., Michelin, C. M., De Praga Baião, C. F., Chuchón Angulo, E., Almeida, E. K., Kazmierczak, M. L., Mateus, N. P. A., Silva, R. C., & Bender, F. (2021). Extreme Drought in the Brazilian Pantanal in 2019–2020: Characterization, Causes, and Impacts. *Frontiers in Water*, 3. <https://doi.org/10.3389/frwa.2021.639204>
- Mata-Gómez, L. C., Montañez, J. C., Méndez-Zavala, A., & Aguilar, C. N. (2014). Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-12>
- Mautone, J. N. (2008). Diversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isoladas de folhas de figueiras do Parque de Itapuã, RS, Brasil [UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.]. <http://hdl.handle.net/10183/14247>
- Mayne, S. T. (1996). Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *The FASEB Journal*, 10(7), 690–701. <https://doi.org/10.1096/fasebj.10.7.8635686>
- Mello, C. R. de, Sá, M. A. C. de, Curi, N., Mello, J. M. de, Viola, M. R., & Silva, A. M. da. (2007). Erosividade mensal e anual da chuva no Estado de Minas Gerais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42(4), 537–545. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2007000400012>
- Mendes-Silva, T. de C. D., Andrade, R. F. da S., Ootani, M. A., Mendes, P. V. D., Sá, R. A. de Q. C. de, Silva, M. R. F. da, Souza, K. S., Correia, M. T. dos S., Silva, M. V. da, & Oliveira, M. B. M. de. (2020). Biotechnological Potential of Carotenoids Produced by Extremophilic Microorganisms and Application Prospects for the Cosmetics Industry. *Advances in Microbiology*, 10(08), 397–410. <https://doi.org/10.4236/aim.2020.108029>

- Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços. (2023, August 2). COMEX STAT. <http://comexstat.mdic.gov.br/pt/home>
- Mohan, S., Rao, P. R., Hemachandran, H., Pullela, P. K., Doss C, G. P., Tayubi, I. A., Subramanian, B., Gothandam, K., Singh, P., & Ramamoorthy, S. (2018). Prospects and progress in the production of valuable carotenoids: Insights from metabolic engineering, synthetic biology, and computational approaches. *Journal of Biotechnology*, 266, 89–101. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.12.010>
- Mok, W. Y., Luizão, R. C. C., da Silva, M. do S. B., Teixeira, M. F. S., & Muniz, E. G. (1984). Ecology of pathogenic yeasts in Amazonian soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(2), 390–394. <https://doi.org/10.1128/aem.47.2.390-394.1984>
- Moliné, M., Flores, M. R., Libkind, D., Del Carmen Diéguez, M., Farías, M. E., & van Broock, M. (2010). Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: the role of torularhodin. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 9(8), 1145–1151. <https://doi.org/10.1039/c0pp00009d>
- Morais, P. B., De Sousa, F. M. P., & Rosa, C. A. (2020). Yeast in plant phytotelmata: Is there a “core” community in different localities of rupestrian savannas of Brazil? *Brazilian Journal of Microbiology*, 51, 1209–1218. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00286-1/Published>
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., da Fonseca, G. A., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853–858. [www.nature.com](http://www.nature.com)
- Neto, A. A. P., Santos, T. R., Duarte, E. A. A., de Oliveira, T. A. S., de Andrade Silva, E. M., Uetanabaro, A. P. T., da Costa, A. M., Luz, E. D. M. N., & Laranjeira, D. (2021). Yeasts associated with aerial parts of *Theobroma cacao* L. in southern Bahia, Brazil, as prospective biocontrol agents against *Moniliophthora perniciosa*. *Tropical Plant Pathology*, 46(1), 109–128. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00418-w>
- Niu, F., Xie, W., Zhang, W., Kawuki, J., & Yu, X. (2024). Vitamin C, vitamin E,  $\beta$ -carotene and risk of Parkinson’s disease: a systematic review and dose–response meta-analysis of observational studies. *Nutritional Neuroscience*, 27(4), 329–341. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2023.2192561>
- Noronha Matos, K. A., Praia Lima, D., Pereira Barbosa, A. P., Zerlotti Mercadante, A., & Campos Chisté, R. (2019). Peels of tucumã (*Astrocaryum vulgare*) and peach palm (*Bactris gasipaes*) are by-products classified as very high carotenoid sources. *Food Chemistry*, 272, 216–221. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.053>
- Oliver, J., & Palou, A. (2000). Chromatographic determination of carotenoids in foods. *Journal of Chromatography A*, 881(1–2), 543–555. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00329-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00329-0)
- Otero, D. M., Bulsing, B. A., Huerta, K. da M., Rosa, C. A., Zambiasi, R. C., Burkert, C. A. V., & De M Burkert, J. F. (2019). Carotenoid-producing yeasts in the Brazilian biodiversity: isolation, identification and cultivation in agroindustrial waste. *Brazilian Journal of*

- Chemical Engineering, 36(1), 117–129. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20190361s20170433>
- Pecher, S. A., Castro, G. B. de, & Borrás, M. R. L. (1988). Inquérito sobre fungos anemófilos na fronteira Brasil - Colômbia. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 21(2), 63–66. <https://doi.org/10.1590/S0037-86821988000200006>
- Pereira, M. L. de S. (2021). Diversidade da micobiota da caverna Furna dos Morcegos em área de Caatinga, Pernambuco [UFPE (Universidade Federal de Pernambuco)]. <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/46553>
- Perrier, V., Dubreucq, E., & Galzy, P. (1995). Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. *Archives of Microbiology*, 164(3), 173–179. <https://doi.org/10.1007/BF02529968>
- Peto, R., Doll, R., Buckley, J. D., & Sporn, M. B. (1981). Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates? *Nature*, 290(5803), 201–208. <https://doi.org/10.1038/290201a0>
- Pietrowski, G. A. M., Bittencourt, J. V. M., Brandão, L. R., Rosa, C. A., Alberti, A., & Nogueira, A. (2018). Identification and selection of non-*Saccharomyces* strains isolate from brazilian apple must. *Ciência Rural*, 48(5). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170886>
- Polidori, L., Caldeira, C. R. T., Smessaert, M., & El Hage, M. (2022). Digital elevation modeling through forests: the challenge of the Amazon. *Acta Amazonica*, 52(1), 69–80. <https://doi.org/10.1590/1809-4392202103091>
- Pott, A., & Pott, V. J. (2004). Features and conservation of the Brazilian Pantanal wetland. *Wetlands Ecology and Management*, 12(6), 547–552. <https://doi.org/10.1007/s11273-005-1754-1>
- Rodrigues, T. V. D., Amore, T. D., Teixeira, E. C., & Burkert, J. F. de M. (2019). Carotenoid Production by *Rhodotorula mucilaginosa* in Batch and Fed-Batch Fermentation Using Agroindustrial Byproducts. *Food Technology & Biotechnology*, 57(3), 388–398. <https://doi.org/10.17113/ftb.57.03.19.6068>
- Rodrigues, T. V. D., Teixeira, E. C., Macedo, L. P., dos Santos, G. M., Burkert, C. A. V., & de Medeiros Burkert, J. F. (2022). Agroindustrial byproduct-based media in the production of microbial oil rich in oleic acid and carotenoids. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 45(4), 721–732. <https://doi.org/10.1007/s00449-022-02692-1>
- Roesch, L. F. W., Vieira, F. C. B., Pereira, V. A., Schünemann, A. L., Teixeira, I. F., Senna, A. J. T., & Stefenon, V. M. (2009). The Brazilian Pampa: A Fragile Biome. *Diversity*, 1(2), 182–198. <https://doi.org/10.3390/d1020182>
- Rose, A. H., & Harrison, J. S. (1987). *The Yeasts* (Rose A H & Harrison J S., Eds.; 2nd ed.). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2009-0-02440-4>

- Sakaki, H., Nochide, H., Komemushi, S., & Miki, W. (2002). Effect of active oxygen species on the productivity of torularhodin by *Rhodotorula glutinis* No. 21. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93(3), 338–340. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(02\)80040-8](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(02)80040-8)
- Salvadori, M. R., Ando, R. A., Nascimento, C. A. O., & Corrêa, B. (2017). Dead biomass of Amazon yeast: A new insight into bioremediation and recovery of silver by intracellular synthesis of nanoparticles. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 52(11), 1112–1120. <https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1340754>
- Salvadori, M. R., Ando, R. A., Oller do Nascimento, C. A., & Corrêa, B. (2014). Intracellular biosynthesis and removal of copper nanoparticles by dead biomass of yeast isolated from the wastewater of a mine in the Brazilian Amazonia. *PLoS ONE*, 9(1), e87968. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087968>
- Santos, T. T. (2012). Identificação e análise do potencial enzimático de leveduras isoladas do afloramento rochoso do Morro da Pioneira - Bahia [UFRB - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia]. <http://ri.ufrb.edu.br/jspui/handle/123456789/2340>
- Seabra, L. M. J., & Pedrosa, L. F. C. (2010). Astaxanthin: structural and functional aspects. *Revista de Nutrição*, 23(6), 1041–1050. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000600010>
- Šesták, Z., Britton, G., Liannen-Jensen, S., & Pfander, H. (2004). Carotenoids. *Handbook. Photosynthetica*, 42(2), 186–186. <https://doi.org/10.1023/B:PHOT.0000040641.40049.19>
- Sólyom, K., Maier, C., Weiss, J., Cocero, M. J., Mato, R. B., Carle, R., & Schweiggert, R. (2014). Structure–response relationship of carotenoid bioaccessibility and antioxidant activity as affected by the hydroxylation and cyclization of their terminal end groups. *Food Research International*, 66, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.004>
- Souza, C. M., Z. Shimbo, J., Rosa, M. R., Parente, L. L., A. Alencar, A., Rudorff, B. F. T., Hasenack, H., Matsumoto, M., G. Ferreira, L., Souza-Filho, P. W. M., de Oliveira, S. W., Rocha, W. F., Fonseca, A. V., Marques, C. B., Diniz, C. G., Costa, D., Monteiro, D., Rosa, E. R., Vélez-Martin, E., ... Azevedo, T. (2020). Reconstructing Three Decades of Land Use and Land Cover Changes in Brazilian Biomes with Landsat Archive and Earth Engine. *Remote Sensing*, 12(17), 2735. <https://doi.org/10.3390/rs12172735>
- Squina, F. M., Yamashita, F., Pereira, J. L., & Mercadante, A. Z. (2002). Production of Carotenoids by *Rhodotorula rubra* and *R. Glutinis* in culture medium supplemented with sugar cane juice. *Food Biotechnology*, 16(3), 227–235. <https://doi.org/10.1081/GBT-120016776>
- Tang, W., Wang, Y., Zhang, J., Cai, Y., & He, Z. (2019). Biosynthetic Pathway of Carotenoids in *Rhodotorula* and Strategies for Enhanced Their Production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(4), 507–517. <https://doi.org/10.4014/jmb.1801.01022>
- Teixeira, H. M., Cardoso, I. M., Bianchi, F. J. J. A., da Cruz Silva, A., Jamme, D., & Peña-Claros, M. (2020). Linking vegetation and soil functions during secondary forest succession in the Atlantic Forest. *Forest Ecology and Management*, 457, 117696. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2019.117696>

- Thomaz, E. L., Nunes, D. D., & Watanabe, M. (2020). Effects of tropical forest conversion on soil and aquatic systems in southwestern Brazilian Amazonia: A synthesis. *Environmental Research*, 183, 109220. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109220>
- Tinoi, J., Rakariyatham, N., & Deming, R. L. (2005). Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. *Process Biochemistry*, 40(7), 2551–2557. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.11.005>
- Tomas, W. M., de Oliveira Roque, F., Morato, R. G., Medici, P. E., Chiaravalloti, R. M., Tortato, F. R., Penha, J. M. F., Izzo, T. J., Garcia, L. C., Lourival, R. F. F., Girard, P., Albuquerque, N. R., Almeida-Gomes, M., Andrade, M. H. da S., Araujo, F. A. S., Araujo, A. C., Arruda, E. C. de, Assunção, V. A., Battirola, L. D., ... Junk, W. J. (2019). Sustainability Agenda for the Pantanal Wetland: Perspectives on a Collaborative Interface for Science, Policy, and Decision-Making. *Tropical Conservation Science*, 12, 1–30. <https://doi.org/10.1177/19400829198726347>
- Três, M. V., Francheschi, E., Borges, G. R., Dariva, C., Corazza, F. de C., Oliveira, J. V., & Corazza, M. L. (2007). Influência da temperatura na solubilidade de beta-caroteno em solventes orgânicos à pressão ambiente. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(4), 737–743. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000400011>
- Tubelis, D. P. (2020). Methods used in recent avian inventories conducted in the Caatinga: a review. *Ornithology Research*, 28(4), 195–208. <https://doi.org/10.1007/s43388-021-00034-5>
- Valduga, E., Tatsch, P. O., Tiggemann, L., Zeni, J., Colet, R., Cansian, J. M., Treichel, H., & Luccio, M. (2009). Evaluation of the conditions of carotenoids production in a synthetic medium by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) in a bioreactor. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(12), 2445–2451. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02032.x>
- Valduga, E., Tatsch, P., Vanzo, L. T., Rauber, F., Di Luccio, M., & Treichel, H. (2009). Assessment of hydrolysis of cheese whey and use of hydrolysate for bioproduction of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(6), 1060–1065. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3556>
- Vale, H. M. M. do, Reis, J. B. A. dos, Oliveira, M. de, Moreira, G. A. M., & Bomfim, C. A. (2021). Yeasts in native fruits from Brazilian neotropical savannah: occurrence, diversity and enzymatic potential. *Biota Neotropica*, 21(4). <https://doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2020-1184>
- Vital, M. J. S., Abranches, J., Hagler, A. N., & Mendonça-Hagler, L. C. (2002). Mycogenenic yeasts isolated from Amazon soils of the Maracá Ecological Station, Roraima-Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33(3), 230–235. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822002000300008>
- Wirth, F., & Goldani, L. Z. (2012). Epidemiology of *Rhodotorula*: An Emerging Pathogen. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2012, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2012/465717>

- Zhang, C. (2018). Biosynthesis of Carotenoids and Apocarotenoids by Microorganisms and Their Industrial Potential. In Progress in Carotenoid Research. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79061>
- Zoz, L., Carvalho, J. C., Soccol, V. T., Casagrande, T. C., & Cardoso, L. (2015). Torularhodin and Torulene: Bioproduction, Properties and Prospective Applications in Food and Cosmetics – a Review. Brazilian Archives of Biology and Technology, 58(2), 278–288. <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201400152>

### **CAPÍTULO III – ARTIGO CIENTÍFICO**

## **BIOPROSPECÇÃO DE LEVEDURAS COM POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES, PRESENTES EM UMA MICRORREGIÃO DO BIOMA AMAZÔNIA**

**Manuscrito em preparação para ser submetido em uma revista internacional indexada  
da área de Biotecnologia.**

## RESUMO

Os carotenoides são compostos bioativos que atuam como pigmentos naturais, são encontrados em plantas, animais, algas e microrganismos, e possuem diversos benefícios à saúde humana como o fortalecimento do sistema imunológico e a redução do risco do desenvolvimento de doenças crônicas degenerativas. Industrialmente, a produção de carotenoides é obtida por síntese química ou por meio de extrato de algas e plantas. No entanto, devido à crescente demanda pela substituição de aditivos químicos sintéticos nos alimentos por aditivos naturais, torna-se necessário a obtenção de carotenoides por processos biotecnológicos. Neste trabalho, foi realizado um estudo de caráter exploratório focado na identificação molecular de leveduras produtoras de carotenoides disponíveis em uma microrregião do bioma Amazônia, com foco em evidenciar micro-organismos produtores de carotenoides por via biotecnológica para futuras aplicações no setor alimentício, cosmético e farmacêutico. Foram coletadas amostras de folhas, flores, solo e cascas de árvores, e dentre elas foram 4 cepas promissoras foram isoladas e identificadas da filosfera de folhas de filodendro (*Philodendron hederaceum*): *Rhodospiridiobolus ruineniae* (PH-18<sub>(I)</sub>), *Rhynchogastrema noutii* ou *Hannaella pagnoccae* (dPH-8<sub>(I)</sub>), *Leucosporidium egoroviorum* ou *Lyomyces sp.* (dPH-8<sub>(II)</sub>), e *Rhodotorula diobovata* ou *Rhodotorula glutinis* (PH-22<sub>(II)</sub>). A cepa PH-18<sub>(I)</sub> apresentou rendimento de biomassa de 0,26 a 0,76% e teor de carotenoides totais de 139,70 µg/g biomassa seca. A cepa dPH-8<sub>(I)</sub> apresentou rendimento de biomassa de 0,43 a 0,96% e teor de carotenoides totais de 54,26 µg/g. A cepa dPH-8<sub>(II)</sub> exibiu rendimento de biomassa de 0,35 a 1,12% e teor de carotenoides totais de 52,71 µg/g, enquanto a cepa PH-20<sub>(II)</sub> apresentou rendimento de biomassa de 11,63 e 23,67 e teor de carotenoides totais de 44,98 µg/g. Os carotenoides identificados nesse estudo foram 13Z-β-caroteno, (all-*E*)-β-caroteno e 9Z-β-caroteno, sendo o (all-*E*)-β-caroteno o majoritário. Os resultados encontrados neste estudo destacam uma perspectiva muito promissora para futuras prospecções de micro-organismos produtores de pigmentos no bioma Amazônia sendo alternativa para substituir o processo de obtenção dos carotenoides por via sintética ou por exploração de fontes vegetais.

**Palavras-chave:** Carotenoides; *Rhodotorula*; biomas; Brasil; Amazônia; β-caroteno.

## 1. INTRODUÇÃO

Os carotenoides são compostos bioativos lipossolúveis usados como pigmentos naturais, são encontrados em plantas, animais, algas e microrganismos (Igreja et al., 2021). Já foi relatada a biossíntese de carotenoides por alguns artrópodes hemipteranos (pulgões adelgídeos, filoxerídeos) devido uma transferência lateral de genes proveniente de um ancestral em comum (Cobbs et al., 2013; Grbić et al., 2011; Moran & Jarvik, 2010), mais de 850 carotenoides foram relatados nas literaturas. A maioria dos carotenoides consiste em oito unidades de isoprenos, com um esqueleto de 40 carbonos, formando os tetraterpenoides. Além disso, eles podem ser divididos em dois grandes grupos: os carotenos, formado por compostos hidrocarbonetos e as xantofilas, que são os derivados oxigenados dos carotenos (Igreja et al., 2021; Maoka, 2020).

Alguns desses compostos, como por exemplo o  $\beta$ -caroteno, são precursores da vitamina A (retinol), possuem efeito potencial contra o estresse oxidativo sequestrando importantes espécies reativas de oxigênio (RSO) para o sistema fisiológico e alimentício, como o radical peroxila ( $\text{ROO}\bullet$ ) e o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), possuem benefícios associados ao fortalecimento do sistema imunológico e a redução do risco de doenças crônicas degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular, catarata, inflamação, dentre outros (Frengova & Beshkova, 2009; Igreja et al., 2021). Logo, devido a essas importantes propriedades biológicas, os carotenoides possuem aplicação tecnológica e industrial na área farmacêutica, química, cosmética, alimentícia e biotecnológica (Frengova & Beshkova, 2009; Igreja et al., 2021; Vila et al., 2008).

Na indústria, a produção de carotenoides é obtida, majoritariamente, por síntese química ou por meio de extrato de algas e plantas (Frengova & Beshkova, 2009). Os valores para a produção de carotenoides como astaxantina variam entre \$1000 e 7000/kg, para o  $\beta$ -caroteno entre \$343,54 e 499,59 (Igreja et al., 2021; Khoo et al., 2019; Zhang et al., 2020). Todavia, com a crescente preocupação com o uso de aditivos químicos nos alimentos e o aumento de consumidores desejando consumi-los de forma natural, alinhada com a possibilidade de baratear ainda mais o processo de obtenção de carotenoides, faz-se pertinente o interesse em obtê-los por processos biotecnológicos.

De acordo com a BCC Research (2022), o mercado global de carotenoides atingiu cerca de U\$ 2 bilhões, com previsão de alcançar U\$ 2,7 BI em 2027, com taxa de crescimento anual de 5,7%. Entre os principais carotenoides comercializados globalmente estão: bixina, astaxantina,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -apo-8-carotenal,  $\beta$ -apo-8-carotenal-éster, cantaxantina, capsantina,

luteína, licopeno e zeaxantina. No Brasil, de acordo com os dados estatísticos do Comércio Exterior do Ministério da Indústria (2023), em exportações foram adquiridos US\$1.380.508,00 de carotenoides e seus derivados entre janeiro de 2013 e julho de 2023 e gastos US\$ 98,074,789.00 em importações no mesmo período.

De acordo com as informações já mencionadas, os carotenoides, em sua maioria (90%), são produzidos via síntese química. Entretanto, a demanda de consumidores por produtos com corantes naturais vem crescendo, e a aplicabilidade dos carotenoides não se limita somente a indústria de alimentos, mas abrange a avicultura como aditivos alimentares, na farmacologia na utilização contra a fotossensibilidade, diabetes, distúrbios neurológicos, e na cosmética como intensificador e prolongador do bronzeado (Mesquita et al., 2017; Vila et al., 2008). Ainda, há uma limitação e um alto custo da produção de carotenoides tanto com via de síntese química quanto pela extração de plantas (Mata-Gómez et al., 2014). Nesse sentido, a utilização de microrganismos para a obtenção de carotenoides surge como uma alternativa para preencher essa lacuna na indústria.

Diversos microrganismos podem sintetizar os carotenoides, como é o caso de algumas leveduras, dentre elas, há as do gênero *Rhodotorula*, uma levedura membra dos basidiomicetos, aeróbica estrita, que durante a fase estacionária de crescimento produz grandes quantidades de lipídios e carotenoides em resposta às condições de estresse em que são submetidas, como a exposição à luz, aumento de temperatura dentre outras condições extremas (El-Banna et al., 2012; Zhang et al., 2014). Podem estar presentes no ar e no solo, assim como na pele humana, comida, frutas e fezes (Carvalho et al., 2013; Machado, 2018; Pereira, 2021).

As leveduras do gênero *Rhodotorula* produzem carotenoides e os acumulam intracelularmente. O teor de carotenoides pode variar entre as diferentes espécies ou até entre as mesmas espécies, haja vista que os fatores como bioma, condição de crescimento, procedimentos de extração, temperatura, pH, agitação e taxa de aeração e irradiação da luz, afetam consideravelmente a produção. Os principais carotenoides produzidos por elas são o  $\beta$ -caroteno, toruleno, toularodina e astaxantina (Buzzini et al., 2007; Igreja et al., 2021).

Além disso, considerando que o Brasil é rico em biodiversidade, alguns estudos relataram a presença de leveduras *Rhodotorula* no Cerrado (Machado, 2018), na Mata Atlântica (Alvarado-Huallanco & Maugeri-Filho, 2010), na Caatinga (Castelo-Branco et al., 2021), no Pampa (Cipolatti et al., 2019), no Pantanal (Leite Júnior et al., 2018), e poucos estudos na Amazônia (Salvadori et al., 2014, 2017). No entanto, até o momento, não foi realizada uma investigação exploratória em nenhuma dessas regiões ou nas microrregiões com foco em

compreender quais são as leveduras do gênero *Rhodotorula* e leveduras de outras espécies produtoras de carotenoides predominantes nesses biomas.

Ao se fazer uma investigação das espécies de leveduras carotenogênicas e encontrá-las em locais ainda pouco ou não explorados, abre-se mais uma oportunidade para que novas pesquisas com viés biotecnológico surjam, contribuindo assim para mais informações à comunidade acadêmica, fornecendo inúmeros dados e fontes de pigmentos orgânicos para fomentar as indústrias brasileiras, a fim de também aumentar a produção de produtos que contenham carotenoides, intensificar as exportações desses biopigmentos do Brasil e obter mais lucros, assim, consequentemente o bem-estar dos consumidores e redução de riscos à natureza ao reduzir o uso de processos de obtenção de carotenoides via síntese química.

Portanto, a presente proposta tem por objetivo fazer um trabalho de caráter exploratório para identificar as leveduras disponíveis em uma microrregião do bioma Amazônia do Brasil e avaliar a eficiência e o perfil de produção de carotenoides para futuras aplicações no setor industrial.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Coleta de amostras e prospecção de leveduras produtoras de carotenoides**

Todas as amostras analisadas neste estudo foram provenientes do microbioma característico do bioma Amazônia, presente na Universidade Federal do Pará (UFPA), campus Belém, PA, Brasil (latitude: -1,47551; longitude: -48,45679). Para este estudo, as coletas de amostras foram realizadas seguindo as informações obtidas nas literaturas durante a revisão bibliográfica dos *spots*, de onde mais se obteve leveduras. As coletas foram realizadas com *swabs* esterilizados, sacolas *ziplock*, pá de jardinagem e caixa de isopor, todos devidamente sanitizados com água, sabão, álcool 70% e iluminação solar. Uma (01) amostra de solo, duas (02) amostras de flores (*Alpinia purpurata* e *Syzygium malaccense*), e de duas (02) amostras de folhas (*Syzygium malaccense* e *Philodendron hederaceum*). Foram realizadas coletas em outros tipos de amostras como *Crescentia cujete* – folha de cuieira; *Ixoca coccinea* - gerânio da selva; de *Guarea guidonia* – Andirobarana, de casca de árvore *Calycophyllum spruceanum* - Pau-mulato, casca de bambú - Bambusoideae; porém sem presença de colônias de interesse.

As leveduras foram isoladas a partir de amostras de solos, seguindo o protocolo de Carvalho et al. (2013). As amostras de folhas, flores, frutos silvestres foram coletados de acordo com o protocolo de Machado & Bianchi (2021), as leveduras foram coletadas com os materiais

anteriormente citados e água peptonada ( $H_2O_p$ ) 1%, entre junho e novembro de 2023 e acondicionadas em tubos cônicos esterilizados.

Todas as amostras foram armazenadas em caixas de isopor sanitizada, mantidas sob refrigeração com o auxílio de gelo, e transportadas para o Laboratório de Microbiologia localizado no Laboratório de Ciência, Tecnologia e Engenharia de Alimentos (LCTEA) da UFPA, campus Belém.

## **2.2. Isolamento e purificação das leveduras**

As amostras coletadas, as quais estavam contidas em tubos cônicos com  $H_2O_p$  foram diluídas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ), (a escolha das diluições foi baseada no número de colônias visíveis na placa) e as suspensões foram cultivadas em meio PDA (3,9 g em 100 mL), e PDA com cloranfenicol (100 mg/mL). Em seguida, as placas foram armazenadas em condição aeróbica à 30 °C, de 48 a 72 h (Carvalho et al., 2013).

As colônias de leveduras que apresentaram coloração característica da produção e acúmulo de carotenoides (coloração entre amarelo, alaranjado e vermelho) foram submetidas a um novo procedimento de isolamento, pelo método de esgotamento em placa de Petri, com meio ágar YM (3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte, 5 g/L de peptona bacteriológica, 10 g/L de glicose e 25 g/L de ágar), a 30 °C por 72 h (Valduga et al., 2007), e PDA (30 °C por 96 h) (Carvalho et al., 2013). Foi verificado, por meio de exame microscópico, o grau axênico dos micro-organismos, segundo Cabral et al. (2011).

A partir das cepas isoladas e axênicas, foram realizadas as caracterizações dos micro-organismos utilizando em placa de Petri o meio PDA (39 g/L) contendo 100 mg/L de cloranfenicol (Cabral et al., 2011; Pereira et al., 2014). Os micro-organismos de interesse foram incubados a 30 °C por 120 h, para a confirmação da presença de leveduras.

## **2.3. Manutenção das cepas**

As leveduras com aspecto pigmentado foram mantidas em tubos cônicos de 15 mL, contendo caldo de GYMP (glicose 2,0%, extrato de malte 1,0%, extrato de levedura 0,5% e  $NaHPO_4$  0,2%), com 20% de glicerol ou em tubo inclinado com ágar GYMP e óleo mineral, mantidas à -20 °C para as próximas etapas. Os recultivos foram realizados a cada 1 (um) mês (Coelho et al., 2011; Pereira et al., 2014).

## 2.4. Ensaio de viabilidade celular

Foi realizado o processo fermentativo, conforme Machado (2018) (modificado), para o preparo do fermentado para a suspensão celular. Em Erlenmeyer de 250 mL, foi adicionado 1 mL de cepa em 49 mL de meio YM (3 g/L de extrato de malte, 3g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona, 10 g/L de glicose) durante 5 dias à 30 °C e agitação a 130 rpm.

Para a determinação da viabilidade celular, foi adotado o protocolo de Strober (2015) e de Riss et al. (2004), adaptado. O ensaio foi realizado em n=3 de cada isolado. O corante azul de metileno 0,4% em solução tampão PBS (*Phosphate-Buffered Saline* – solução salina tamponada com fosfato) – pH 7,04 foi utilizado no ensaio. Inicialmente, a suspensão celular contida em tubos cônicos de 2 mL, foi centrifugada por 5 min a 1609,92 x g com remoção do sobrenadante, seguido de nova suspensão e diluição (1:10, 1:100 e 1:1000) com PBS pH 7,04. Em seguida, uma alíquota de 100 µL de cada suspensão foi transferida para outro tubo cônico de 2 mL, adicionado de 100 µL de azul de metileno 0,4% (diluição 1:2), para posterior contagem em câmara de Neubauer após 5 min, a saber:

- a) Soma total de células vivas
- b) Soma total de células mortas
- c) Porcentagem de células viáveis (%<sub>cv</sub>):  $\frac{n^{\circ} \text{ de células vivas}}{\text{total de células}} \times 100$
- d) Média de células por quadrante ( $\bar{y}_{cpq}$ ):  $\frac{n^{\circ} \text{ de células vivas}}{\text{total de quadrantes usados}}$
- e) Fator de diluição (FD):  $\frac{\text{volume final ou total}}{\text{volume de células ou alíquota da amostra}}$
- f) Concentração das células viáveis ( $C_{cv}$ ) =  $\bar{y}_{cpq} \times \text{FD} \times 10^4$

Foi realizado o ensaio de viabilidade celular antes e após a fermentação de 5 dias a 130 rpm, 30 °C, sob iluminação de LED amarelo (*Light Emitting Diode*) (Machado, 2018; Valduga et al., 2007). Os resultados foram expressos em 10<sup>8</sup> cels/mL, e verificado o rendimento de cada isolado.

## 2.5.Reativação das cepas e preparo para extração de DNA

O procedimento foi realizado com os protocolos de Machado (2018) e Valduga et al. (2007), com modificações. Foi preparado o caldo de YM (*Yeast Malt*) - 3 g/L de extrato de malte, 3 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona, 10 g/L de glicose – em Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio. As cepas foram inoculadas e incubadas à 25 °C, sob iluminação de LED amarelo durante todo o processo, a 120 rpm, por 48 h.

Em seguida, as amostras com o meio foram transferidas para tubos cônicos (Falcon) de 50 mL para posterior centrifugação (1609,92 x g). Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado deixando apenas o *pellet* de cada amostra. Os *pellets* foram armazenados sob refrigeração (4 °C), para no dia seguinte realizar a extração de DNA, e a corrida em eletroforese em gel, que foi realizada no Laboratório Engenharia Biológica (EngBio), no prédio Espaço Inovação localizado, no PCT Guamá (Belém, PA).

## 2.6. Identificação molecular

### 2.6.1. Extração de DNA

Para essa etapa, foi utilizado o kit *FastDNA<sup>tm</sup> Spin for Soil*. Inicialmente, foi adicionado água ultrapura para resuspende os *pellets* para posteriormente centrifugá-los por 3 minutos a 3.6333,5 x g, a análise celular foi realizada com o auxílio de pérolas de vidro (*glass beads*), conforme o seguinte procedimento: adicionou-se 500 µL de amostra no tubo de lise (Lysing Matrix E), 978 µL de tampão de fosfato de sódio e 122 µL de tampão MT, seguido de homogeneização por 1 min. Em seguida, centrifugou-se a 14.000 x g por 6 min para conseguir os debris dos *pellets*.

O sobrenadante foi transferido para um tubo de microcentrifugação, adicionado de 250 µL de PPS (*Protein Precipitation Solution* – Solução de Precipitação de Proteínas), seguido de homogeneização por inversão do tubo por 10 vezes. Após esta etapa, a suspensão foi centrifugada a 14.000 x g por 5 minutos para precipitar o *pellet*. O sobrenadante resultante foi transferido para outro tubo de 15 mL. Foi novamente resuspendido a suspensão da matriz de ligação, e adicionou-se 1 mL ao sobrenadante em tubo de 15 mL, seguido de homogeneização manual por 3 min.

O tubo contendo a suspensão foi acondicionado em estante por 3 min para permitir a decantação da matriz de sílica. Foi removido e descartado 500 µL do sobrenadante, tomando

cuidado para evitar tocar na matriz de sílica decantada. Gentilmente, a quantidade de matriz de sílica restante foi resuspensa, transferida aproximadamente 600  $\mu\text{L}$  da mistura ao filtro Spin, e centrifugada a 14.000 x g por 1 min. Em seguida, o tubo foi esvaziado e adicionado a mistura restante ao filtro Spin e centrifugada novamente na mesma condição anterior, esvaziando-se o tubo novamente. Posteriormente, foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de SWE-W, e gentilmente, o pellet foi resuspensa, utilizando o líquido na ponteira da micropipeta. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 14.000 x g por 1 min, sendo o tubo esvaziado e substituído por outro. Após esta etapa, sem qualquer adição de líquido, o tubo foi centrifugado pela segunda vez a 14.000 x g por 2 min para “secar” a solução de lavagem da matriz residual. Foi descartado o tubo e substituído por um novo e limpo, o filtro foi seco ao ar por 5 minutos, em temperatura ambiente. Gentilmente, foi resuspensa a matriz de ligação (acima do filtro Spin) em 70  $\mu\text{L}$  de DES (*DNase/Pyrogen-Free Water* – água livre de DNase/Pirogênio), foi centrifugado a 14.000 x g por 1 min para trazer o DNA eluído ao tubo limpo. Foi descartado o filtro Spin. O DNA isolado foi utilizado para a PCR e outras aplicações *downstream*, e armazenado a -20 °C para períodos longos de utilização ou 4 °C para períodos curtos.

#### 2.6.2. Quantificação e preparo para a eletroforese

O kit utilizado para o preparo foi o Qubit dsDNA HS Assay, Kit de 500 ensaios, 2-1000 ng. O procedimento realizado foi o seguinte: foi preparado uma mistura de 1  $\mu\text{L}$  de fluoróforo para 199  $\mu\text{L}$  de tampão, 199  $\mu\text{L}$  dessa mistura em 2  $\mu\text{L}$  de DNA foi adicionada (purificado extraído no item anterior), realizando assim, um cálculo de concentração em ng/ $\mu\text{L}$ , ou seja, quanto há de DNA a cada microlitro em uma amostragem de 100  $\mu\text{L}$ .

A migração para a eletroforese em gel seguiu este processo: em placa de 96 poços, foi adicionado 3  $\mu\text{L}$  de tampão de carregamento em cada poço, e 1  $\mu\text{L}$  a 2  $\mu\text{L}$  do DNA da amostra, adicionou-se as amostras e o controle positivo nos poços do gel de agarose 1% do equipamento de eletroforese, ligou-se o aparelho de voltagem (configuração: 100v; 150 mA). Após alguns minutos de corrida, o comportamento eletroforético das amostras foi analisado em fotoiluminador e transiluminador.

### 2.6.3. PCR

O kit utilizado foi o GoTaq® Colorless Master Mix (Promega), sendo 12,5 µL de GoTaq colorless (DNA polimerase), 9,5 µL de água livre de nucleases (Nuclease-Free Water), 1 µL de ITS1 (1µM) (5'-TCC GTA GGT GAA CCTG CGG-3'), 1µL de ITS4 (1µM) (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') e 1 µL de DNA (10ng) da amostra. Em algumas amostras, utilizaram-se, também, o ITS5 (1µM) (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'). As condições no ciclo do termociclador nos 35 ciclos realizados foram: pré-aquecimento à 95 °C por 2 min, desnaturação à 95 °C por 1 min, anelamento à 55 °C por 1 min, uma extensão à 72 °C por 1 min, e uma extensão final à 72 °C por 5 min. Os amplicons foram checados em gel de agarose 1%, nas condições: TAE1x, e transferindo 5 µL de cada amplicon, com uma corrida de 20 min. Os produtos mostraram ter entre 650 e 1000 pb (pares de bases).

### 2.6.4. Reação de sequenciamento

Antes do preparo das amostras com o kit, algumas foram tratadas com ExoSAP-IT™ – 500 reações (Thermo Fisher, Lituânia), uma enzima responsável por limpar os produtos da PCR. Após isso, o kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Thermo Fisher, Lituânia) foi utilizado. Seguindo o protocolo do fabricante, para uma reação de 10 µL, foi utilizado: 1 µL de fluoróforo (BigDye); 1,5 µL de tampão; 0,8 µL de primer; 3,7 µL de água ultrapura e 3 µL de amplicon.

As condições da corrida no termociclador foram: pré-aquecimento à 96 °C por 1 min; desnaturação à 96 °C por 15 s; anelamento à 50 °C por 15 s, e extensão à 60 °C por 4 min. Ao todo foram realizados 35 ciclos.

### 2.6.5. Precipitação da reação

Foi realizado o protocolo de etanol-EDTA com volume final de 10 µL de reação de sequenciamento em placa de 96 poços, com centrifugação de 5 segundos adicionado de 2,5 µL de EDTA (125 mM, pH 8,0); 30 µL de etanol 100% (grau de biologia molecular); incubação em temperatura ambiente por 15 min; centrifugação (2.25,44 x g ; 4 °C; 45 min); lavagem com 30 µL de etanol 70%; centrifugação por 15 min à 2.325,44 x g; nova centrifugação placa invertida por 5 s a 700-800 RPM; termociclador à 60 °C por 10 min; adição de 10 µL de

formamida Hi-Di (altamente deionizada) em cada poço; vedação da placa e homogeneização por 10 min; desnaturação à 95 °C por 3 min.

#### 2.6.6 Análise de sequenciamento

O DNA das leveduras das culturas puras foi sequenciado usando o método de sequenciamento de Sanger (Silva & Souza, 2022), e os protocolos adotados pelo Laboratório de Engenharia Biológica. Pela porção de sequenciamento e regiões ITS, foram identificados isolados de leveduras a níveis especiais. Para a identificação da região ITS foi amplificado usando os primers. A região ITS foi amplificada utilizando-se os primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'); ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'). O sequenciador utilizado foi o 3500 Genetic Analyzer Applied Biosystems da Hitachi. O sequenciamento levou 6 h para se obter os resultados. As identificações foram realizadas pelo banco de dados do GenBank, fazendo comparações dos resultados com os BLASTs dos nucleotídeos.

### 2.7. Preparo do inóculo e produção de carotenoides

Baseada nas metodologias de Machado (2018) e Valduga et al. (2007), as colônias foram recultivadas em tubos inclinados contendo ágar YM e incubadas a 25 °C durante 48h, repetindo esse processo de repique por duas vezes. Após este período e a contagem celular com concentração mínima de  $10^8$  cel/mL, foi adicionado 1 mL de água peptonada estéril para obtenção de uma suspensão celular, ao qual foi transferida para tubos de ensaio com 9 mL de caldo YM, mantidas a 25 °C por 48 h. Ao final do processo, os cultivos foram homogeneizados e transferidos 1 mL de cada cultivo para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do caldo YM, previamente esterilizados a 121°C por 15 min, incubados a 150 rpm, 25 °C por 48 h ou o tempo necessário para a contagem celular em câmara de Neubauer atingir  $10^8$  células/mL.

Após o período de incubação, a suspensão foi centrifugada (6032 x g por 10 min), as células foram lavadas com água destilada e novamente centrifugadas para a remoção de eventuais interferentes. Após esse processo, a biomassa celular foi congelada, liofilizada, pesada e mantida sob atmosfera de nitrogênio a -20 °C até o procedimento de extração dos carotenoides.

## 2.8. Determinação da biomassa de leveduras

Para a determinação da concentração de biomassa celular, foi utilizado o método gravimétrico segundo AOAC (1997) após 120 h de cultivo.

## 2.9. Determinação do teor de carotenoides totais por espectrofotometria

Para essa etapa, foi utilizada a metodologia de acordo com Maia et al. (2023). Foram pesados de 16 a 100 mg de biomassa seca, e os carotenoides presentes foram extraídos por maceração com celite e acetona com repetições do processo até a remoção total da pigmentação da biomassa. Em seguida, o extrato passou por filtração e partição em funil de separação contendo éter de petróleo/éter etílico (1:1, v/v), seguido de lavagem com água destilada. O extrato final foi evaporado à vácuo ( $T < 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e resolubilizado em éter de petróleo para a leitura em espectrofotômetro a 450 nm ( $\lambda_{\text{máx}}$ ). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  carotenoides/g de biomassa liofilizada (base seca), utilizando o coeficiente de absorção específico do  $\beta$ -caroteno em éter de petróleo (2592).

## 2.10. Determinação do perfil de carotenoides por cromatografia

O perfil de carotenoides produzidos pelas leveduras mais promissoras foi determinado de acordo com a metodologia de Mandelli et al. (2012) e Maia et al. (2023). As amostras foram analisadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência, equipado com um detector de arranjo de diodos (DAD). A separação dos carotenoides foi realizada em uma coluna C30 YMC (5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 250 mm) com fluxo de 0,9 mL/min e temperatura da coluna ajustada em 29  $^{\circ}\text{C}$ . Para os extratos de carotenoides, o gradiente linear de metanol/éter metil *tert*-butilico (MeOH/MTBE) foi de 95:5 para 70:30 em 30 min para 50:50 em 20 min, mantido a 50:50 por 10 min. Os carotenoides foram identificados com base na ordem de eluição na coluna C30 YMC, nas características do espectro UV-visível, como estrutura fina espectral (% III/II) e intensidade do pico *cis* (% AB/A<sub>II</sub>), e comparação com dados disponíveis na literatura para carotenoides de leveduras do gênero *Rhodotorula* (Maia et al., 2023). Os teores de carotenoides foram determinados por padronização externa através de curvas analíticas construídas com  $\beta$ -caroteno (2.5–80  $\mu\text{g/mL}$ ,  $R^2 = 0.99$ ), e os resultados foram expressos em  $\mu\text{g/g}$  (base seca).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Prospecção de leveduras em amostras coletadas no microbioma da UFPA

A amostra de solo foi coletada no Parque de Ciência e Tecnologia (PCT) do Guamá (**Figura 1**) (latitude: -1.465322; longitude: -48.443703). Foi utilizado uma pá de jardinagem devidamente sanitizada, retirado uma quantidade e colocada em sacola *ziplock* também sanitizada. A massa retirada foi de 50 g.

**Figura 1** - Amostra de solo do PCT Guamá



Fonte: Autor

No laboratório a massa da amostra de solo foi embebida, diluída em água  $H_2O_p$  estéril e misturada em vórtex, a mostra foi diluída a  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ . Foi inoculado 100  $\mu L$  de cada diluição em placas com meio PDA (39 g/mL). As placas de  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  não apresentaram colônias pigmentadas, mas sim fungos filamentosos. Já na diluição  $10^{-3}$ , houve presença de colônias alaranjadas de fraca tonalidade (**Figura 2**).

**Figura 2** - Placa da amostra de solo do PCT Guamá ( $10^{-3}$ ).

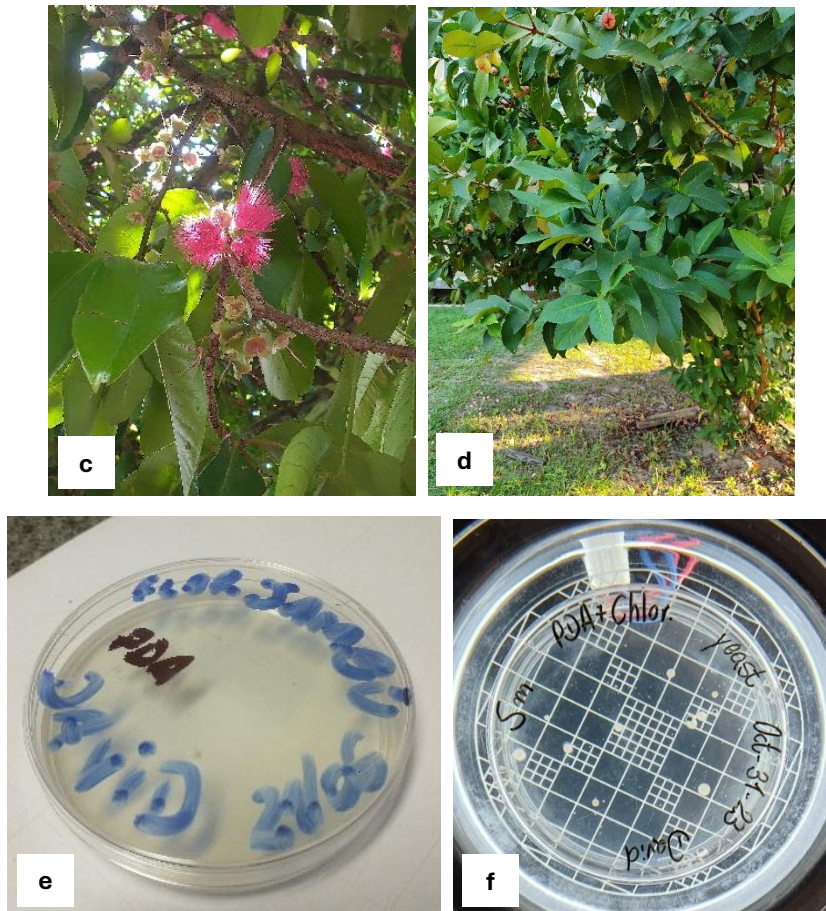


Fonte: autor

Nas amostras de água depositada nas flores da planta gengibre-vermelho (*Alpinia purpurata*), retirada com pipeta Pasteur esterilizada, e nas flores de jambo (*Syzygium malaccense*) coletadas com *swabs* estéreis, foram observadas colônias alaranjadas, enquanto na folha do jambeiro, colônias em tom avermelhado puderam ser visualizadas (**Figura 3**). A primeira foi coletada próximo ao prédio da Faculdade de Arquitetura e Urbanismo da UFPA (latitude: -1.47544, longitude: -48.45297), e a segunda, próxima ao prédio de Engenharia Civil da UFPA (latitude: -1.47443, longitude: -48.45281).

**Figura 3** - Amostras de gengibre-vermelho (*A. purpurata*) e de flor e folha de jambo (*S. malaccense*) juntamente com suas respectivas placas

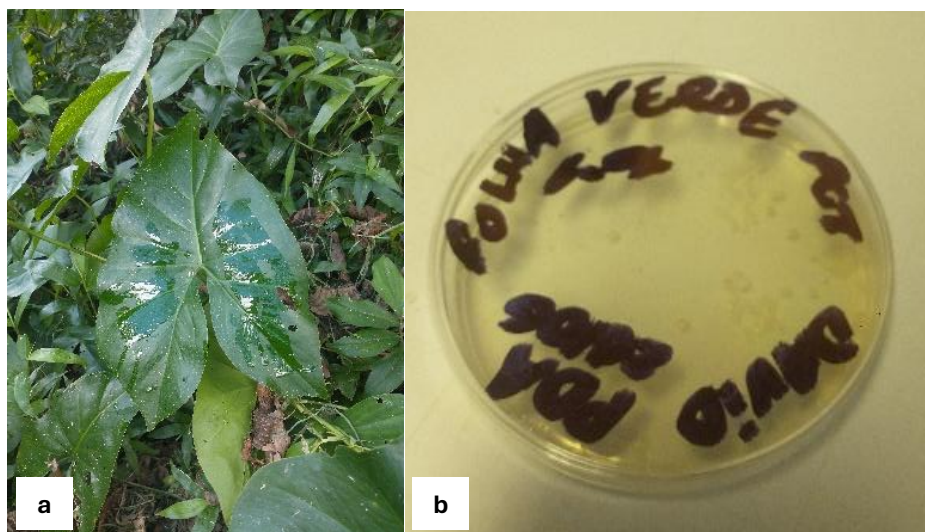




**a** = *A. purpurata*; **b** = colônias isoladas da *A. purpurata*; **c** = flor de *S. malaccense*; **d** = folha de *S. malaccense*; **e** = colônias isoladas da flor de *S. malaccense*; **f** = colônias isoladas da folha de *S. malaccense*. Fonte: autor

Na amostra de filodendro (*Philodendron hederaceum*) notou-se a presença de colônias, alaranjadas, avermelhadas e amareladas (**Figura 4**). Esta amostra foi coletada próxima ao portão 4 da UFPA (latitude: -1.46745, longitude: -48.44796).

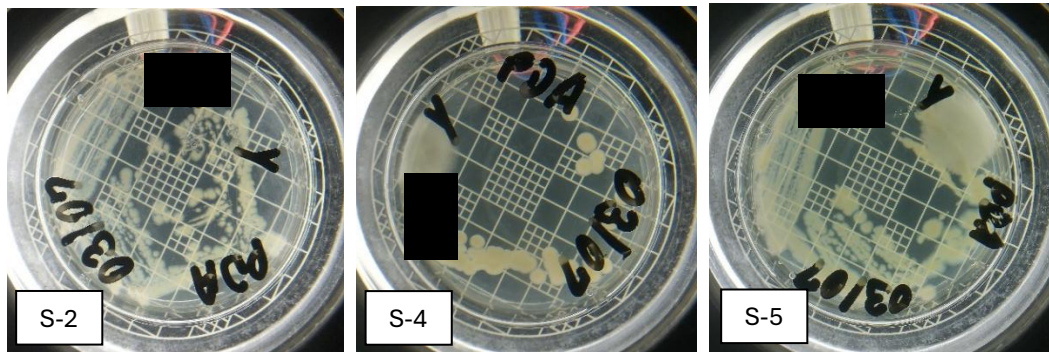
**Figura 4** - Amostra de filodendro (*P. hederaceumi*)



**a** = *P. hederaceumi*; **b** = colônias isoladas da *P. hederaceumi*. Fonte: autor

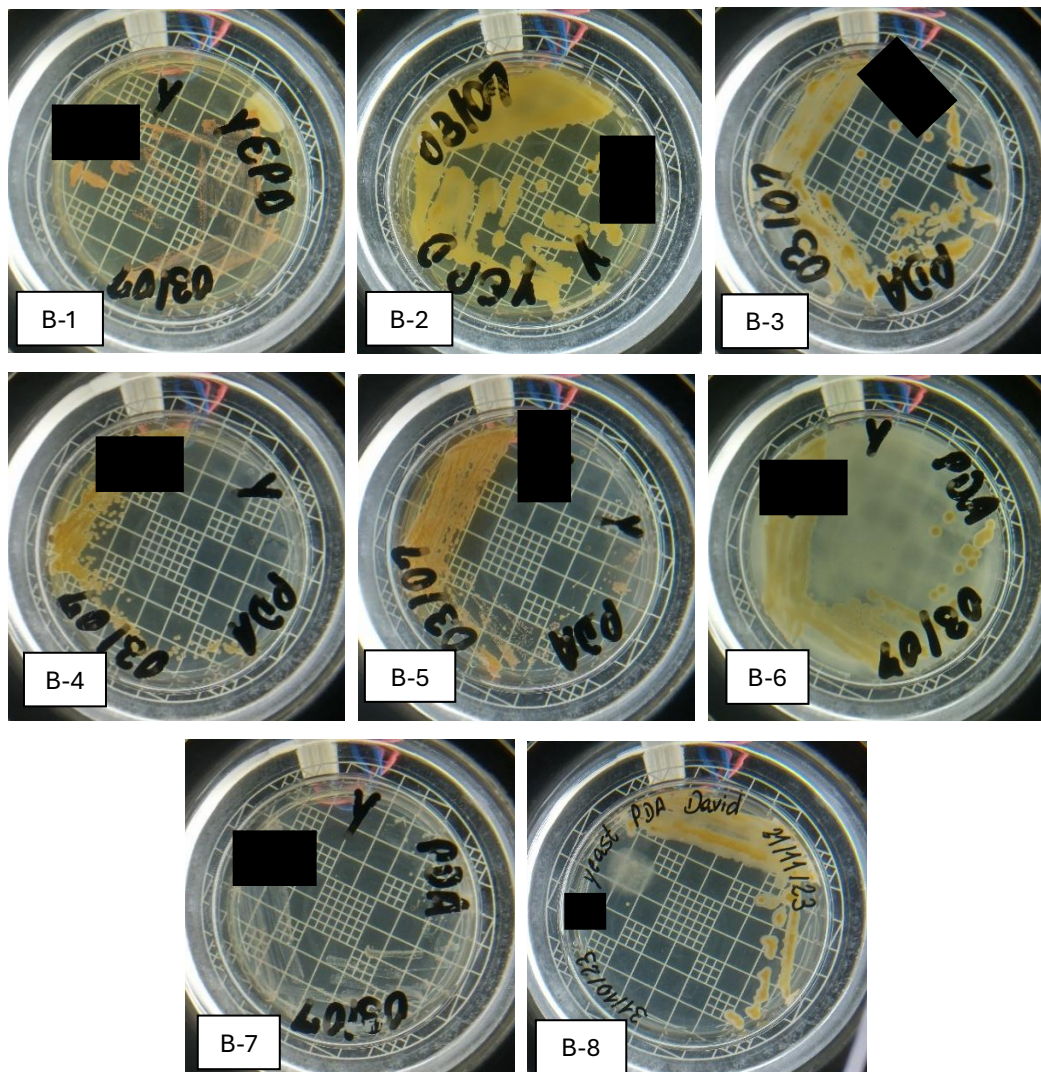
As placas inoculadas que previamente apresentaram presença de colônias de leveduras após visualização em microscópio, foram separadas para a etapa de isolamento. Após o isolamento foram detectados um total de 44 colônias sendo elas: **3** colônias da amostra de **solo** (placas **S-2**, **S-4** e **S-5**); **8** colônias da amostra de **água depositada na gengibre-vermelho** – *A. purpurata* (placas **B-1** à **B-8**); **1** colônia da **folha de jambeiro** (**SM-1**); **2** colônias em **flor de jambo** - *S. malaccense* (**SM-2** e **SM-3**); **22** colônias do **filodendro** diluição  $10^{-1}$  – *P. hederaceum* (placas da **PH-1** à **PH-22**); **6** colônias do filodendro diluição  $10^{-2}$  (placas **SH-1**, **SH-2**, **SH-3**, **SH-4**, **SH6**; **dPH-7** e **dPH-8**) – Figuras 5, 6, 7, 8 e 9, respectivamente. Foram realizadas coletas em outros tipos de amostras como *Crescentia cujete* – folha de cuieira; *Ixoca coccinea* - gerânio da selva; de *Guarea guidonia* – Andirobarana, de casca de árvore *Calycophyllum spruceanum* - Pau-mulato, casca de bambú - Bambusoideae, porém sem presença de colônias de interesse.

**Figura 5** - Placas da amostra de solo do PCT Guamá (diluição  $10^{-3}$ ) em meio PDA com cloranfenicol (100 mg/mL)



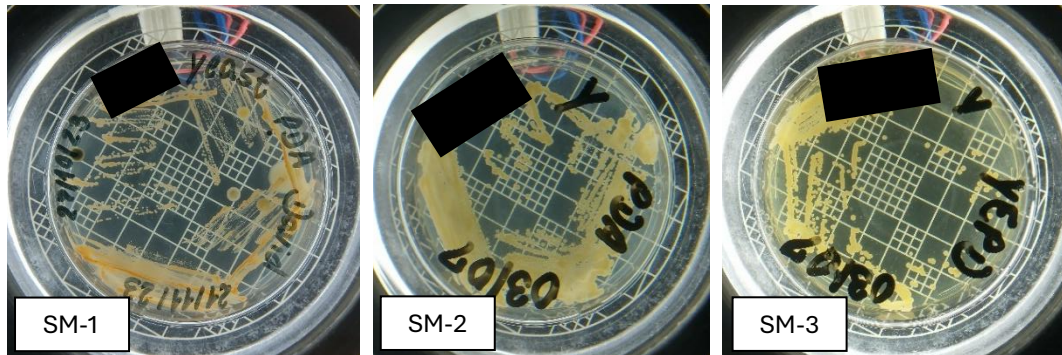
Fonte: autor

**Figura 6** - Placas de gengibre-vermelho (*A. purpurata*) em meio PDA com cloranfenicol (100 mg/mL)



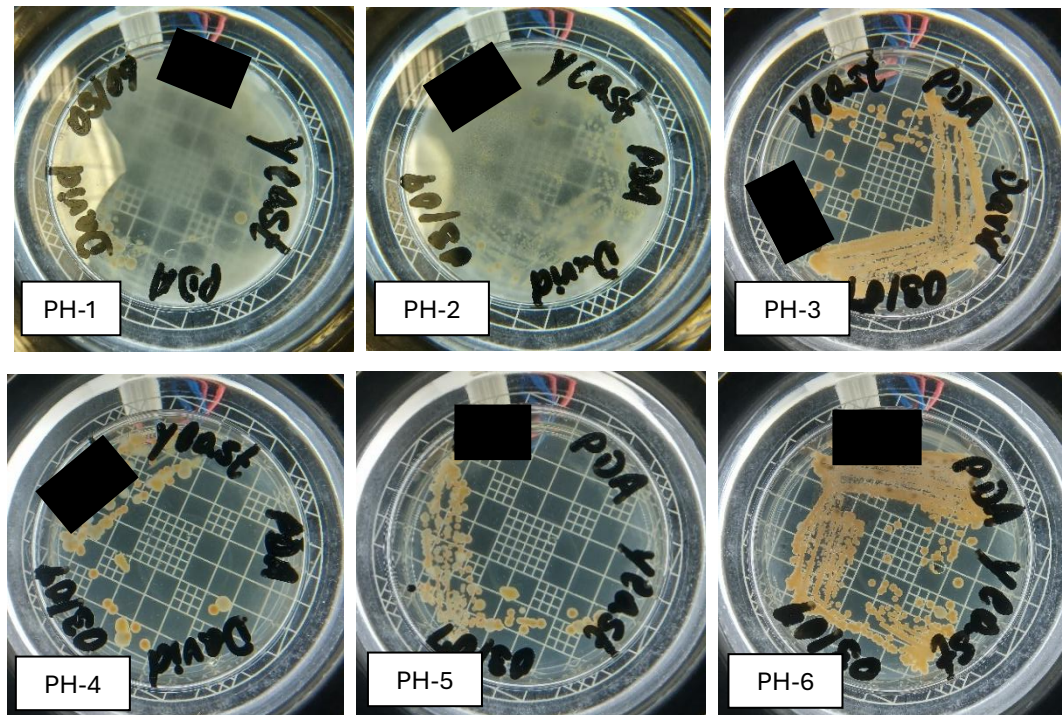
Fonte: Autor

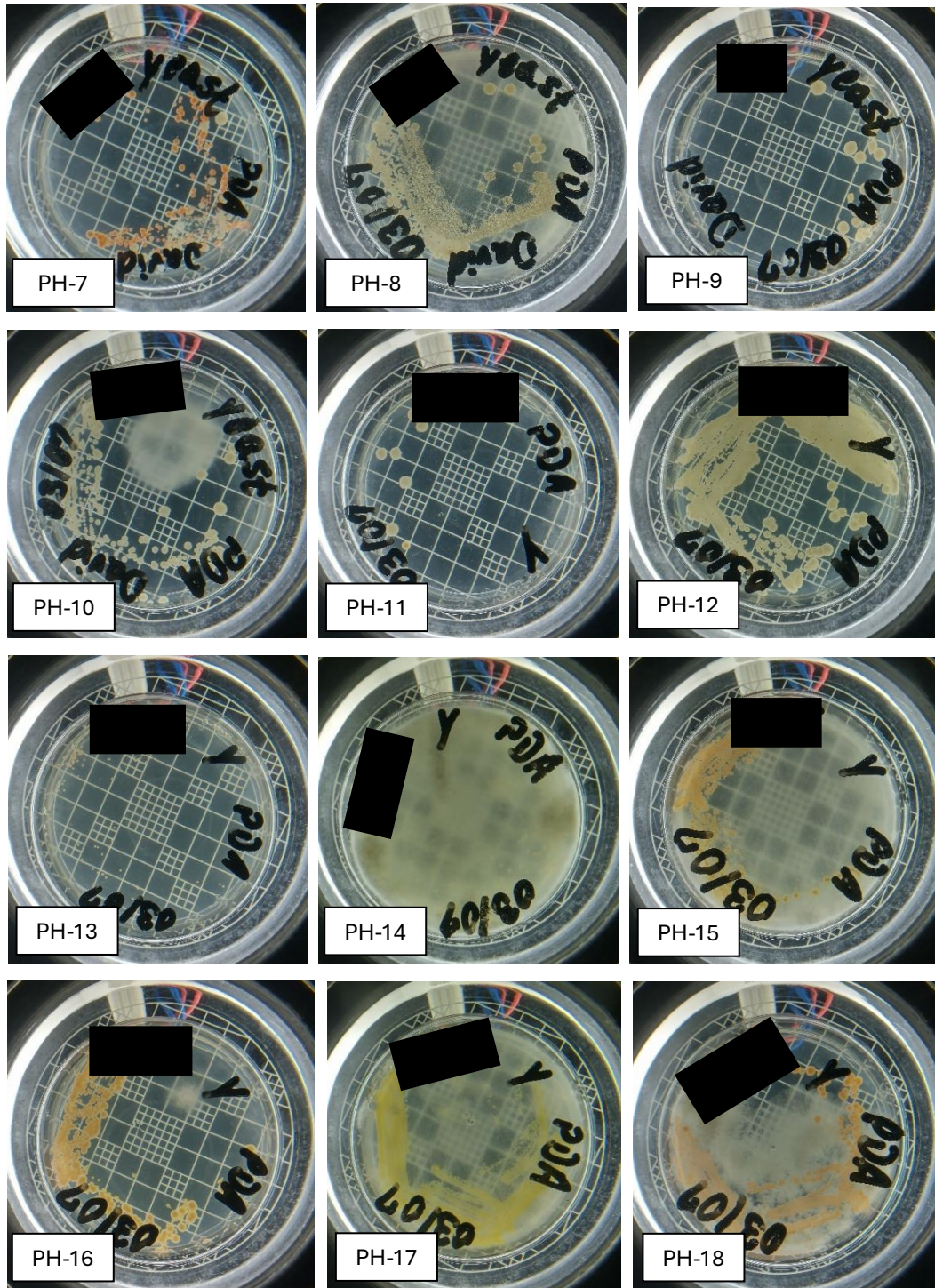
**Figura 7** - Placas folha e flor de jambo (*S. malaccense*) em meio PDA com cloranfenicol (100 mg/mL)

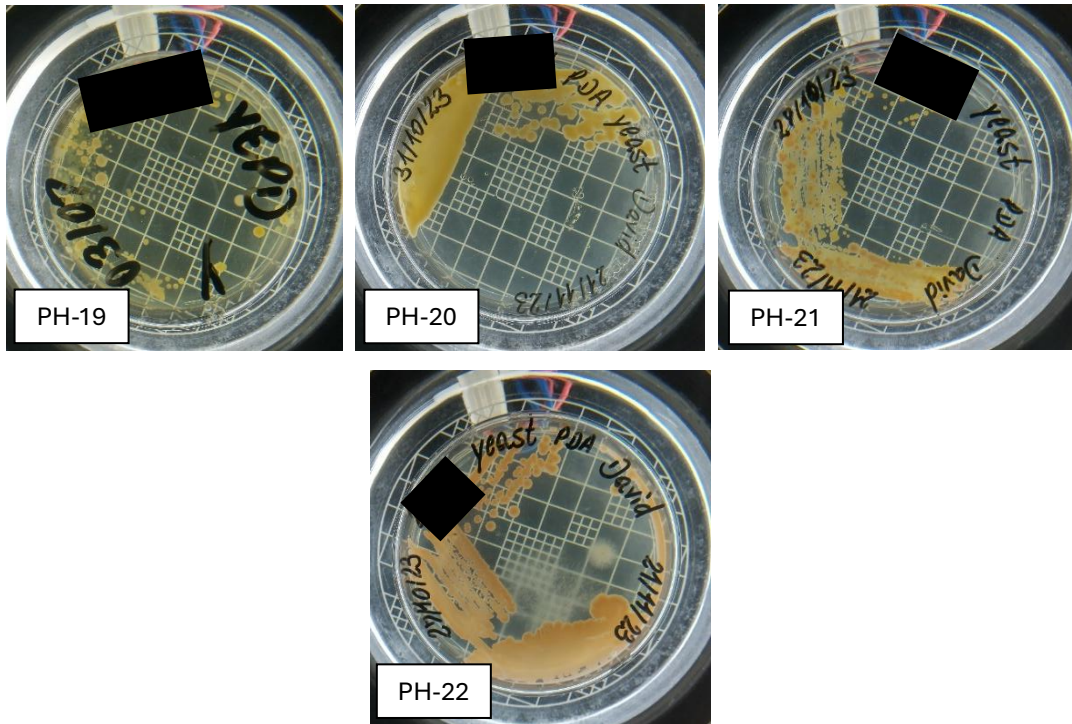


Fonte: autor

**Figura 8** - Placas das amostras de filodendro (*P. hederaceum*), diluição  $10^{-1}$  em meio PDA com cloranfenicol (100 mg/mL)p

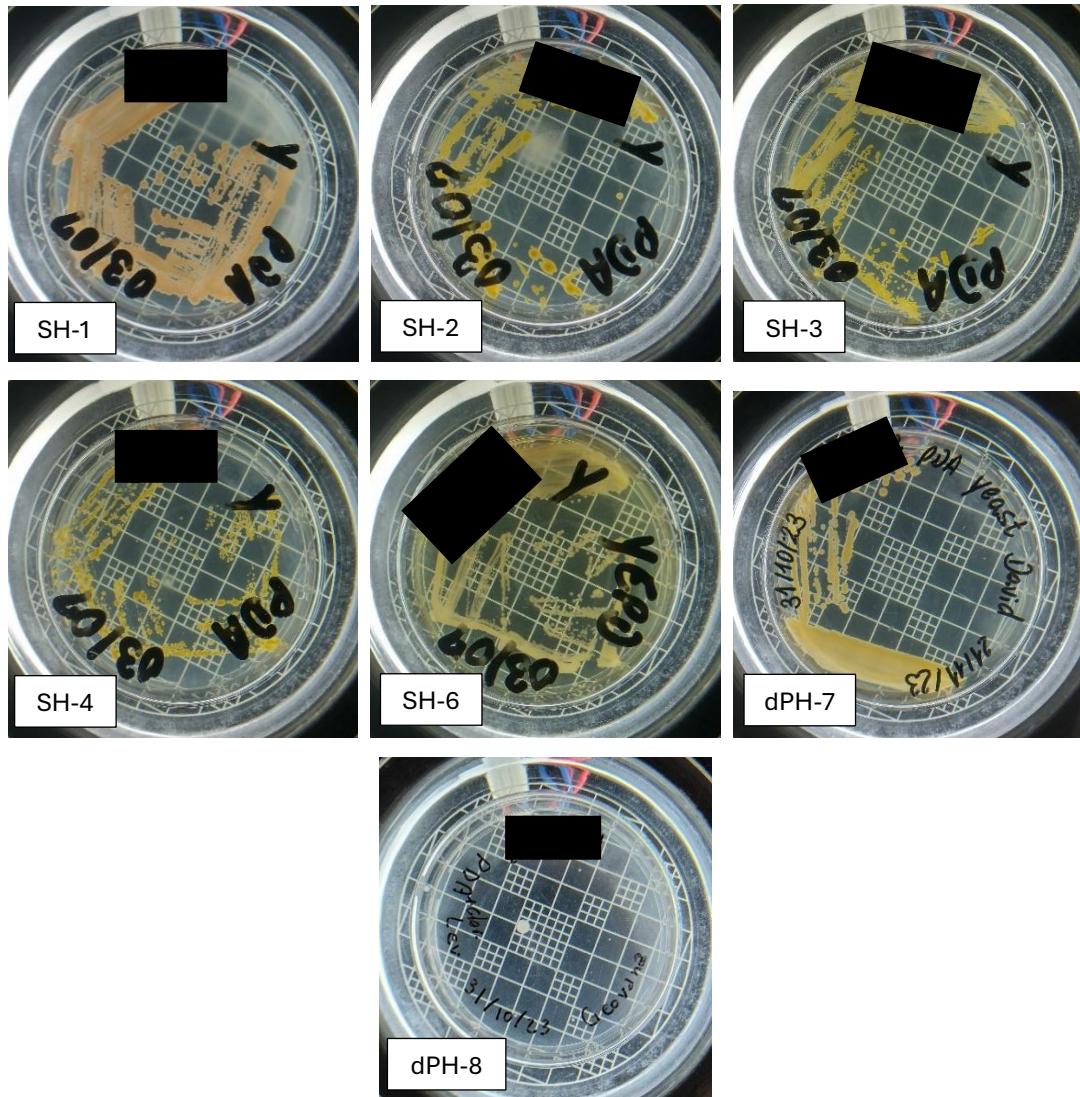






Fonte: autor

**Figura 9** - Placas das amostras de filodendro (*P. hederaceum*), diluição  $10^{-2}$  em meio PDA com cloranfenicol (100 mg/mL)



Fonte: Autor

A **Tabela 1** mostra as informações resumidas dos locais de coleta com o número de colônias.

**Tabela 1** - Colônias isoladas das amostras provenientes do campus da Universidade Federal do Pará (UFPA).

| Origem                                                            | Nº de colônias | Colônias                                    |
|-------------------------------------------------------------------|----------------|---------------------------------------------|
| Solo                                                              | 3              | S-2; S-4; S-5                               |
| Água depositada em <i>A. purpurata</i>                            | 8              | B-1; B-2; B-3; B-4; B-5; B-6; B-7; B-8      |
| Superfície da folha de jambo ( <i>S. malaccense</i> )             | 1              | SM-1                                        |
| Flor de jambo ( <i>S. malaccense</i> )                            | 2              | SM-2; SM-3                                  |
| Superfície da folha de <i>P. hederaceum</i> (diluição $10^{-1}$ ) | 22             | PH-1 até PH-22                              |
| Superfície da folha de <i>P. hederaceum</i> (diluição $10^{-2}$ ) | 7              | SH-1, SH-2, SH-3, SH-4, SH-6, dPH-7 e dPH-8 |

As placas **S-2**, **S-4** e **S-5** da amostra de solo, após passarem por mais uma etapa de isolamento, mostraram colônias levemente amareladas. No trabalho de Zeni et al. (2011), foram encontradas leveduras que produziam carotenoides amarelos, entre elas, amostras de solo de vinícola do Rio Grande do Sul. Já no estudo de Machado et al. (2019), foi encontrado *Rhodotorula mucilaginosa* também em amostra de solo na cidade de São José do Rio Preto/SP. Otero et al. (2019) na região do Escudo Sul-Riograndense e na Costa Leste do Rio Grande do Sul encontraram leveduras em amostras de solo, 30 leveduras em tom de amarelo cujo suas biomassas variaram de 1,28 g/L a 11,67 g/L, e seus carotenoides totais de 0,00 µg/g a 122,82 µg/g ou de 0,00 µg/L a 905,30 µg/L. E ainda, Vital et al. (2002) encontraram leveduras do gênero *Rhodotorula* (*R. aurantiaca*, *R. glutinis*, *R. minuta* e *R. mucilaginosa*) no solo da floresta Amazônica no estado de Roraima em um estudo de leveduras micocinogênicas.

As placas **B-1** a **B-8** apresentaram colônias avermelhas, alaranjadas e amareladas. A pigmentação vermelha pode ser devido a presença de toruleno ( $C_{40}H_{54}$ ) e torularrodina ( $C_{40}H_{52}O_2$ ) (Kot et al., 2018), já as colônias laranjas e amarelas podem indicar a presença de β-caroteno (Azmi et al., 2011). Um estudo já demonstrou propriedades farmacológicas

(antioxidante, antibacteriana) além de atividades larvícida, citotóxica e vasodilatadora para esses carotenoides (Chan & Wong, 2015). As pigmentações apresentadas podem representar algumas espécies características do gênero *Rhodotorula*, a saber, vermelha (*R. glutinis*), amarelo (*R. mucilaginosa* ou *R. bacarum*) e laranja (*R. babjevae* ou *R. diobovata*) (Tang et al., 2019).

As placas **SM-1**, **SM-2** e **SM-3** apresentaram coloração amarelada e uma pigmentação entre o vermelho e o laranja. Todas provenientes da folha e flor de jambo. O jambo (*S. malaccense*) é uma fruta tropical da família *Myrtaceae* e é comumente chamada de maçã rosa ou jambo. Esta fruta pode ser encontrada em todo o território brasileiro (Tamiello et al., 2018). Já foi relatada a presença de leveduras nessa fruta na região de Cali e Neiva - Colômbia, entre elas, as do gênero *Rhodotorula* (Ramírez-Castrillón et al., 2019; Trujillo & Echeverry Hernández, 2015).

As amostras de filodendro (*P. hederaceum*), diluições  $10^{-1}$  (de **PH-1 a PH-22**) e  $10^{-2}$  (**SH-1; SH-2; SH-3; SH-4; SH-6; dPH-7; dPH-8**) foram consideradas as amostras mais promissoras e com maior diversidade de leveduras por apresentarem colônias distintas com pigmentação vermelha, laranja, rosa e amarelo. Watcharawipas & Runguphan (2023) relataram a mistura de carotenoides, incluindo  $\gamma$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, toruleno e torularrodina, nas leveduras de coloração avermelhada. A cor laranja de algumas leveduras está atrelada, majoritariamente, aos alimentos como a cenoura, sendo  $\alpha$ -caroteno o carotenoide mais associado a essa pigmentação (Singh et al., 2023). A coloração rosa foi ligada à *Rhodotorula glutinis* (Hernández-Almanza et al., 2014), e a uma nova espécie (*Rhodotorula portillonensis* sp. nov.) isolada do sedimento marinho das águas rasas da Antártica (Laich et al., 2013). Ainda, o astaxantina é associado a essa coloração presente em animais aquáticos (salmão, camarão etc.) e pena de aves (flamingo) (Langi et al., 2018).

*Philodendron* é o gênero Neotropical da família *Araceae* bastante diverso nas morfologias das folhas e formas de vida. A presença dele foi relatada na Amazônia, Mata-Atlântica, Cerrado e Caatinga. Além disso, 168 espécies foram descritas (Canal et al., 2018; Loss-Oliveira et al., 2016). Até o momento da escrita dessa dissertação, não foram encontrados artigos e documentos que relacionem o *P. hederaceum* à presença de leveduras produtoras de carotenoides.

Importante salientar, foi observada uma diferença na presença de microrganismos pigmentados durante o período da coleta de amostras. Nos meses de junho até agosto houve grande presença de colônias coloridas, mas entre setembro e novembro o oposto foi observado. Nessa época ocorre na região Norte do país um fenômeno denominado popularmente de “verão

amazônico”, o qual tem origem na Zona de Convergência Intertropical, uma espécie de “cinturão de nuvens que ocorre em volta do planeta e que se desloca seguindo o movimento aparente do sol”, isso causa o aquecimento das águas dos oceanos e redução da precipitação de chuva na região. É um dos períodos mais quentes do ano podendo chegar à temperatura de 40 °C (Chérolet, 2023).

Além disso, foi observada a diferença no número de colônias pigmentadas em momentos diferentes do dia. Após os processos de isolamento e inoculação, as colônias coletadas no período da manhã, quando há maior incidência de raios solares, apresentaram mais pigmentos, uma média de 20 colônias de interesse. Por outro lado, das colônias de amostras coletadas no período da tarde, após a ocorrência de chuvas, com menor intensidade de raios solares, apresentaram maior número de colônias brancas e opacas foram constadas (média de 10).

A partir dessa observação foi indagado o motivo, se porventura, a incidência de luz solar influenciaria ou não na presença de leveduras coloridas, e de acordo com Lababpour et al. (2005) e Tatsch (2008), a incidência luminosa certamente pode influenciar na produção de carotenoides presentes nas leveduras e em suas colorações. Além disso, em um estudo de Andrade et al. (2016), a luz azul de LED (*light-emitting diode*), apresentou efeito positivo aumentando a produção de carotenoides totais (127,86 µg/g), durante 96 h, em *Rhodotorula glutinis* em meio YPD contendo glicerina 10%, licor de milho 0,8% e peptona 0,3%.

Infelizmente, algumas colônias foram perdidas devido a contaminação por fungos filamentosos, dificultando a axenização das placas e posterior armazenamento. No entanto, para algumas colônias, foi possível axeniza-las duas vezes até total isolamento da cepa de interesse, e a partir do isolamento completo de tais colônias selecionadas, foi dado prosseguimento às demais etapas desta pesquisa.

### **3.2. Viabilidade das leveduras isoladas antes e após a fermentação**

O ensaio com azul tripano foi proposto a cerca de um século e ainda é amplamente usado para a análise de viabilidade celular. Esse método é utilizado, normalmente, com hemocitômetro/câmara de Neubauer e microscópio de luz. Seu conceito é a exclusão das células vivas das mortas, devido ao dano na membrana plasmática. O mecanismo de coloração seletiva de células mortas pode envolver impermeabilidade de agregados de azul de tripano (Piccinini et al., 2017; Riss et al., 2004).

Algumas cepas tiveram um aumento expressivo de rendimento da biomassa, como as leveduras isoladas da planta *P. hederaceum*, sendo as PH-20<sub>(I)</sub> e PH-20<sub>(II)</sub> (ambas as cepas provenientes da axenização da placa PH-20); PH-13, dPH-07 e PH-22<sub>(II)</sub> (PH-22<sub>(II)</sub>, proveniente axenização da placa PH-22) com maiores percentuais, indicando elevada viabilidade após a fermentação de 5 dias. Os valores desses percentuais: +22.757% para PH-20<sub>(I)</sub>, +3.143% para dPH-07, +1.282% para PH-22<sub>(II)</sub> e +805% para PH-13. Por outro lado, as cepas PH-17<sub>(I)</sub> (cepa axenizada da placa PH-17); PH-18<sub>(I)</sub> e PH-18<sub>(II)</sub> (cepas axenizadas da placa PH-18) e dPH-8<sub>(I)</sub> apresentaram os menores valores -82%; -74%; -67% e -29%, respectivamente) indicando decréscimo em relação aos valores iniciais e viabilidade desfavorecida pela fermentação. Para a cepa PH-4<sub>(II)</sub> (cepa axenizada da placa PH-4), constatou-se a morte celular (**Tabela 2**).

**Tabela 2** - Concentrações das suspensões celulares das placas purificadas antes do processo fermentativo e após o processo, e seus rendimentos percentuais.

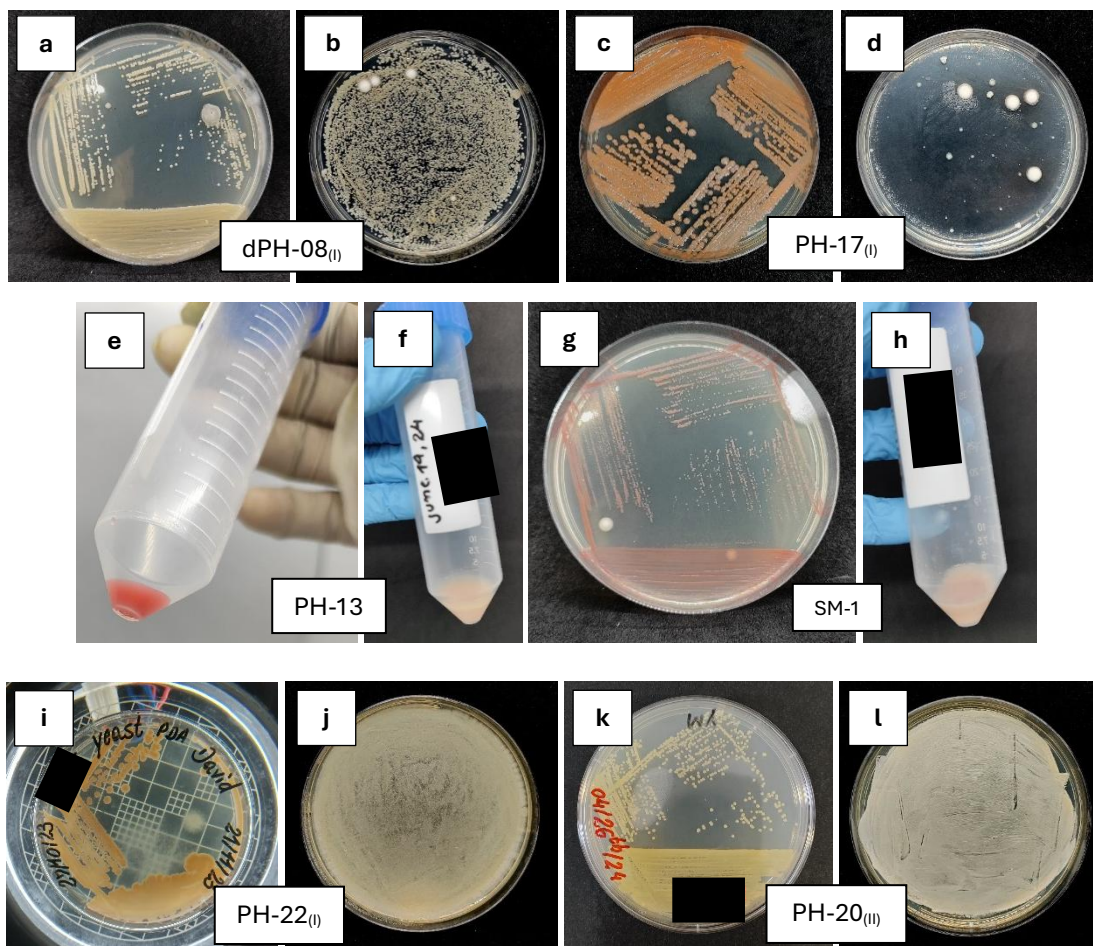
| Cepas                 | Fonte                          | <sup>a</sup> C <sub>cv</sub><br>(x10 <sup>8</sup> cel/mL) | <sup>b</sup> C <sub>cv</sub><br>(x10 <sup>8</sup><br>cel/mL) | ΔC <sub>b-a</sub><br>(x10 <sup>8</sup><br>cel/mL) | Percentual de<br>aumento (+) ou<br>decréscimo (-) |
|-----------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| PH-17 <sub>(I)</sub>  | <i>Philodendron hederaceum</i> | 28,014                                                    | 4,93                                                         | -23,08                                            | -82,40                                            |
| PH-18 <sub>(II)</sub> | <i>Philodendron hederaceum</i> | 23,04                                                     | 7,68                                                         | -15,36                                            | -66,67                                            |
| dPH-8 <sub>(I)</sub>  | <i>Philodendron hederaceum</i> | 9,84                                                      | 6,96                                                         | -2,88                                             | -29,27                                            |
| PH-07                 | <i>Philodendron hederaceum</i> | 1,56                                                      | 8,52                                                         | +6,96                                             | 81,69                                             |
| PH-20 <sub>(II)</sub> | <i>Philodendron hederaceum</i> | 13,80                                                     | 117,96                                                       | +104,16                                           | 88,30                                             |
| dPH-8 <sub>(II)</sub> | <i>Philodendron hederaceum</i> | 4,92                                                      | 44,00                                                        | +39,08                                            | 88,82                                             |
| PH-18 <sub>(I)</sub>  | <i>Philodendron hederaceum</i> | 228,114                                                   | 60,03                                                        | -168,08                                           | -73,68                                            |
| PH-18                 | <i>Philodendron hederaceum</i> | 27,84                                                     | 51,12                                                        | +23,28                                            | 45,54                                             |
| PH-22 <sub>(II)</sub> | <i>Philodendron hederaceum</i> | 4,92                                                      | 68,00                                                        | +63,08                                            | 92,76                                             |
| PH-22 <sub>(I)</sub>  | <i>Philodendron hederaceum</i> | 29,35                                                     | 170,75                                                       | +141,40                                           | 82,81                                             |
| PH-13                 | <i>Philodendron hederaceum</i> | 26,68                                                     | 241,45                                                       | +214,17                                           | 88,95                                             |
| dPH-07                | <i>Philodendron hederaceum</i> | 11,84                                                     | 384,00                                                       | +372,16                                           | 96,92                                             |
| PH-20 <sub>(I)</sub>  | <i>Philodendron hederaceum</i> | 0,07                                                      | 16,00                                                        | +15,93                                            | 99,56                                             |
| SM-1                  | <i>Syzygium malaccense</i>     | 116,03                                                    | 252,13                                                       | +136,10                                           | 53,98                                             |

ΔC<sub>b-a</sub>: Variação do número de células (contagem final – contagem inicial). C<sub>cv</sub>: concentração de células vivas; **a**: antes da fermentação de 5 dias; **b**: após a fermentação de 5 dias.

Diversos fatores podem afetar a viabilidade celular das leveduras, como temperatura (Allahkarami et al., 2021), pH (Zhao et al., 2019), oxigênio (Saenge et al., 2011), agitação (Bento et al., 2019), exposição à luz (Pham et al., 2020), taxa de C/N (Hien & Dao, 2020) entre outros, resultando em aumento ou redução da viabilidade celular.

Ao final da fermentação, com agitação e iluminação, notou-se uma mudança na coloração das cepas dPH-08<sub>(I)</sub>, PH-17<sub>(I)</sub>, PH-13, SM-1, PH-18<sub>(I)</sub>, PH-22<sub>(I)</sub> e PH-20<sub>(II)</sub> quando comparadas com as colorações das mesmas cepas antes da fermentação (**Figura 10**).

**Figura 10** - Comparação da pigmentação das cepas antes e depois do processo fermentativo



Imagens a, c, e, g, i e k = cepas antes do processo fermentativo

Imagens b, d, f, h, j e l = cepas após o processo fermentativo

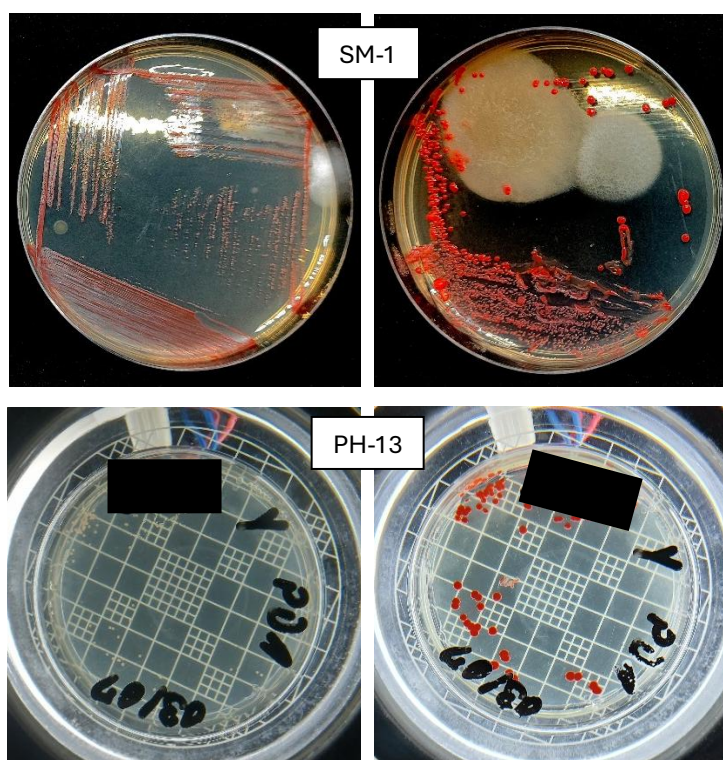
Fonte: Autor

Tais alterações na coloração foram observadas após a adoção de 30 °C como temperatura de incubação, e aumento dos dias de incubação de 2 para 5 dias, mantendo as demais configurações. Após essas modificações, as cepas acima assumiram uma coloração com tons amarelos, porém opacos. Isso pode estar relacionado com a redução da síntese de carotenoides quando se ultrapassa a temperatura de 30 °C (da Silva et al., 2020; Gong et al., 2020). Durante a incubação, a temperatura variou  $\pm 1,5^{\circ}\text{C}$ , e apesar da adição de mais dias de incubação tender ao aumento do rendimento de carotenoides (da Silva et al., 2020; Grigore et al., 2023; Machado et al., 2019) e, conseqüentemente, pigmentações mais intensas, isso não aconteceu neste experimento.

### 3.3. Mudanças morfológicas observadas para colônias selecionadas

Durante os processos de cultivo (inoculação e/ou axenização), foram observadas mudanças discrepantes na morfologia de algumas cepas. As cepas SM-1 e PH-13 modificaram em coloração e tamanho, exibindo alteração morfológica de colônias de aspecto rosadas e pequenas para colônias maiores a avermelhadas (**Figura 11**). Tais mudanças foram observadas durante a armazenagem sob refrigeração, quando retirada para repiques e estocagem das cepas.

**Figura 11-** Mudanças fenotípicas das cepas SM-1 e PH-13



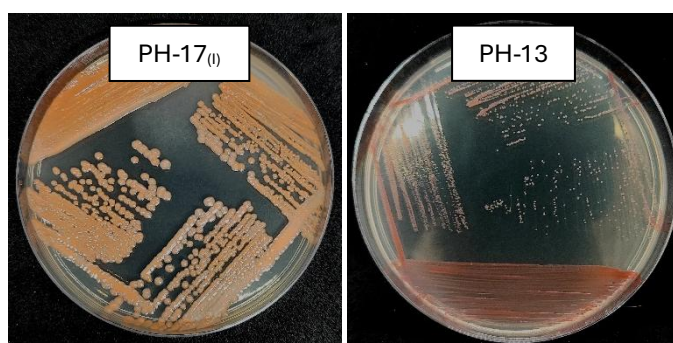
Fonte: autor

Tais mudanças podem ocorrer por fatores, como por exemplo, a presença de outros microrganismos na placa, como no caso da SM-1, um claro caso de competição, quando outros microrganismos, incluindo outros fungos, induzem alteração da morfologia como um mecanismo de defesa, ou fazem a levedura produzir algumas substâncias para inibir o crescimento de outros fungos (Buyuksirit & Kuleasan, 2014). Outra possibilidade pode ser pela mudança de temperatura; no caso da PH-13, a chamada plasticidade fenotípica que consiste na adaptação rápida de organismos às mudanças das condições ambientais sem alterar sua composição genética (Miras, 2024).

### 3.4. Identificação molecular das leveduras isoladas

Como já mencionado, após os processos de isolamento das colônias, algumas placas apresentaram contaminação por fungos filamentosos, não sendo possíveis suas recuperações e foram descartadas. No entanto, algumas colônias foram aproveitadas e recuperadas devido ao protocolo de axenização, que nada mais é que a repetição da inoculação em meio sólido. Dessa forma, todas as cepas axênicas (**Figura 12**) foram armazenadas em meio GYMP e realizadas suas manutenções mensalmente.

**Figura 12** - Aspecto das cepas após a purificação



Fonte: autor

Essas cepas axênicas foram encaminhadas ao EngBio para as etapas até a obtenção da identificação de cada uma, confirmação de suas espécies e quais pertenciam ao gênero *Rhodotorula*. Após todos os protocolos, a identificação detalhada pode ser visualizada na **Tabela 3** logo abaixo. As identificações foram realizadas pelo banco de dados do GenBank, fazendo comparações dos resultados com os BLASTs dos nucleotídeos.

**Tabela 3** - Identificação molecular das cepas após comparação de nucleotídeos dos dados do GenBank.

| Cepa      | Primer | Espécies                          | ID da cepa        | Ident. Percent. (%) | Cobertura de Consulta (%) | Acesso      |
|-----------|--------|-----------------------------------|-------------------|---------------------|---------------------------|-------------|
| dPH-7     | ITS1   | <i>Meyerozyma guilliermondii</i>  | CBS 2030          | 96,46               | 97                        | NR_111247.1 |
| dPH-7     | ITS4   | <i>Meyerozyma guilliermondii</i>  | CBS 2030          | 97,39               | 97                        | NR_111247.1 |
| dPH-8(I)  | ITS1   | <i>Rhynchogastrema noutii</i>     | CBS 8364          | 97,65               | 45                        | NR_111072.1 |
| dPH-8(I)  | ITS4   | <i>Hannaella pagnoccae</i>        | CBS 11142         | 98,06               | 99                        | NR_155180.1 |
| dPH-8(II) | ITS4   | <i>Leucosporidium egoroviorum</i> | KBP MSU Y-6804    | 94,41               | 17                        | NR_186988.1 |
| dPH-8(II) | ITS5   | <i>Lyomyces mascarensis</i>       | KAS GEL4833       | 90,79               | 23                        | NR_154136.1 |
|           |        | <i>Lyomyces allantosporus</i>     | FR 0249548        | 90,79               | 23                        | NR_154135.1 |
|           |        | <i>Lyomyces gatesiae</i>          | MEL LWZ20180515-3 | 90,79               | 23                        | NR_154135.1 |
| PH-4(II)  | ITS4   | XX                                | XX                | XX                  | XX                        | XX          |

| continuação                 |           |                                      |            |       |     |             |
|-----------------------------|-----------|--------------------------------------|------------|-------|-----|-------------|
| <b>PH-4<sub>(II)</sub></b>  | ITS5      | <i>Waltergamsia pilosa</i>           | CBS 124.70 | 87,93 | 18  | NR_163809.1 |
| <b>PH-7<sub>(I)</sub></b>   | ITS1      | <i>Rhodotorula paludigena</i>        | CBS 6566   | 96,92 | 94  | NR_073265.1 |
| <b>PH-7<sub>(I)</sub></b>   | ITS4      | <i>Rhodotorula paludigena</i>        | CBS 6566   | 96,66 | 70  | NR_073265.1 |
| <b>PH-7<sub>(II)</sub></b>  | ITS4      | <i>Rhodotorula paludigena</i>        | CBS 6566   | 97,02 | 94  | NR_073265.1 |
| <b>PH-7<sub>(II)</sub></b>  | ITS5      | <i>Rhodotorula paludigena</i>        | CBS 6566   | 98,48 | 96  | NR_073265.1 |
| <b>PH-7<sub>(II)</sub></b>  | ITS1      | <i>Rhodotorula paludigena</i>        | CBS 6566   | 97,04 | 100 | NR_073265.1 |
| <b>PH-7<sub>(II)</sub></b>  | ITS4      | <i>Rhodotorula paludigena</i>        | CBS 6566   | 97,93 | 100 | NR_073265.1 |
| <b>PH-13</b>                | ITS1/ITS5 | XX                                   | XX         | XX    | XX  | XX          |
| <b>PH-17<sub>(I)</sub></b>  | ITS1      | <i>Rhodospiridiobolus ruineniae</i>  | CBS 5001   | 95,35 | 99  | NR_155707.1 |
| <b>PH-17<sub>(I)</sub></b>  | ITS4      | <i>Rhodospiridiobolus ruineniae</i>  | CBS 5001   | 97,77 | 100 | NR_155707.1 |
| <b>PH-18</b>                | ITS1      | <i>Candida orthopsilosis</i>         | ATCC 96139 | 94,16 | 99  | NR_130661.1 |
| <b>PH-18</b>                | ITS4      | <i>Scheffersomyces jinghongensis</i> | NYNU 17926 | 96,84 | 41  | NR_130661.1 |
| <b>PH-18<sub>(I)</sub></b>  | ITS1      | <i>Rhodospiridiobolus ruineniae</i>  | CBS 5001   | 97,70 | 99  | NR_155707.1 |
| <b>PH-18<sub>(I)</sub></b>  | ITS4      | <i>Rhodospiridiobolus ruineniae</i>  | CBS 5001   | 98,19 | 100 | NR_155707.1 |
| <b>PH-20<sub>(I)</sub></b>  | ITS1      | <i>Hannaella pagnoccae</i>           | CBS 11142  | 99,04 | 100 | NR_155180.1 |
| <b>PH-20<sub>(I)</sub></b>  | ITS4      | <i>Hannaella pagnoccae</i>           | CBS 11142  | 97,91 | 99  | NR_155180.1 |
| <b>PH-20<sub>(II)</sub></b> | ITS1      | <i>Hannaella pagnoccae</i>           | CBS 11142  | 98,06 | 99  | NR_155180.1 |
| <b>PH-20<sub>(II)</sub></b> | ITS4      | <i>Hannaella pagnoccae</i>           | CBS 11142  | 96,85 | 99  | NR_155180.1 |
| <b>PH-22<sub>(I)</sub></b>  | ITS1      | <i>Rhodotorula araucariae</i>        | CBS 6031   | 92,29 | 99  | NR_073277.1 |
|                             |           | <i>Rhodotorula kratochvilovae</i>    | CBS 7436   | 92,29 | 99  | NR_073282.1 |
| <b>PH-22<sub>(I)</sub></b>  | ITS4      | <i>Rhodotorula glutinis</i>          | CBS 20     | 93,28 | 92  | NR_073294.1 |
| <b>PH-22<sub>(II)</sub></b> | ITS1      | <i>Rhodotorula diobovata</i>         | CBS 6085   | 91,87 | 92  | NR_073271.1 |
| <b>PH-22<sub>(II)</sub></b> | ITS4      | <i>Rhodotorula glutinis</i>          | CBS 20     | 91,20 | 99  | NR_073294.1 |
| <b>SM-1</b>                 | ITS1/ITS5 | XX                                   | XX         | XX    | XX  | XX          |

XX- Similaridade significativa não encontrada

As cepas PH-7<sub>(I)</sub> e PH-7<sub>(II)</sub>, PH-22<sub>(I)</sub> e PH-22<sub>(II)</sub>, foram identificadas, preliminarmente, como pertencentes ao gênero *Rhodotorula*. Todas as cepas são provenientes da folha de filodendro (*P. hederaceumi*). O gênero *Philodendron* é um grupo Neotropical altamente diverso em sua morfologia, pertencente à família *Arcacea* e com ampla distribuição geográfica (Correia-da-Silva et al., 2014; Nah et al., 2024). Podem estar presentes na América Central, região caribenha e América do Sul (Croat et al., 2019). Foi relatada a existência de 482 espécies do gênero no mundo e 168 espécies no Brasil, sendo considerado um bom contribuinte para a formação das florestas brasileiras, inclusive a amazônica (Lourenço & Bove, 2019).

Apesar de espécies do gênero *Rhodotorula* serem frequentemente encontradas em superfície de folhas (Lima et al., 2013; Osman et al., 2022; Otero et al., 2019; Zeni et al., 2011), até o presente momento, não foram encontrados estudos que reportassem a presença de leveduras do gênero *Rhodotorula* na superfície de folhas de *P. hederaceumi*.

As cepas PH-22<sub>(I)</sub> e PH-22<sub>(II)</sub> mostraram similaridade com espécies do gênero *Rhodotorula*. A cepa PH-22<sub>(I)</sub> com *Rhodotorula araucariae* (CBS 6031) e *Rhodotorula kratochvilovae* (CBS 7436) no ITS1, e ambas com similaridade de 92,29%. No ITS4 a

similaridade foi com a espécie *Rhodotorula glutinis* (CBS 20), com 93,28%. E a cepa PH-22(II) com *Rhodotorula diobovata* (CBS 6085) e *Rhodotorula glutinis* (CBS 20), exibindo similaridades de 91,87% no ITS1 e de 91,20% no ITS4.

A *R. diobovata* (CBS 6085) é uma levedura oleaginosa e carotenogênica é uma ótima produtora de lipídios com potencial aplicação industrial (Fakankun et al., 2021). Quando cultivada em melaço de beterraba, seu rendimento lipídico pode chegar a 4,98 g/L com teor lipídico de 43,57%, já com melaço de beterraba sacarina os teores aumentam para 8,36 g/L de rendimento lipídico e 46,68% de teor lipídico. Além disso, esta espécie é capaz de utilizar melaço de sacarose como fonte de carbono, bem como tolerar altas concentrações do melaço com grande potencial de acumulação de lipídios, podendo atingir concentrações acima de 45%.

Adicionalmente, seu perfil de ácidos graxos a caracteriza como espécie promissora para a produção de biodiesel (Osman et al., 2022). Um estudo apresentou resultados sobre *R. diobovata* como ótimo agente de biorremediação e de tratamento de efluentes de águas residuais (Civiero et al., 2018). *R. diobovata* possui a capacidade de produzir carotenoides com pigmentos avermelhados e rosa-avermelhado (Peng et al., 2021; Schieber & Weber, 2016), confirmado nesse estudo após a axenização da placa PH-22. No estudo de Peng et al. (2021), a torularrodina foi o carotenoide majoritário (298,3 mg/L) nessa espécie, seguida de quantidades menores de  $\gamma$ -caroteno e toruleno, com valores menores que 50 mg/L. Ainda, a produção de biomassa mais significativa foi de 10,53 g/L quando cultivado com 40 g/L de glicerol, a concentração de carotenoides totais em sua biomassa foi de 31,5 mg/g peso de célula seca por 120 h pi.

A espécie *Rhodotorula glutinis* (CBS 20) é uma levedura pigmentada, considerada uma levedura patogênica emergente devido ser frequentemente isolada de infecções humanas (Mussagy et al., 2022), apesar disso, a *R. glutinis* é particularmente importante para as indústrias alimentícias devido ao seu potencial biotecnológico e implicações de segurança. Pode ser encontrada no solo, na filosfera, em produtos do queijo e do leite (Hernández-Almanza et al., 2014). Alguns compostos de interesse produzidos por ela são os lipídios (Cheirsilp et al., 2012), ácidos graxos (Easterling et al., 2009), óleos (Lopes da Silva et al., 2011), lipase (Papaparaskevas et al., 1992), timina hidroxilase (Neidigh et al., 2009), tanase, pectinase (E. Taskin & Dursun, 2012), invertase (Canli et al., 2011) e carotenoides (M. Taskin et al., 2011). Os carotenoides mais comumente sintetizados por *R. glutinis* são o licopeno e o  $\beta$ -caroteno (Malisorn & Suntornsuk, 2009) e suas colônias apresentam uma coloração vermelho-alaranjado (Mussagy et al., 2022) ou laranja-rosado (Uludag Altun et al., 2014), o que foi detectado nas cepas PH-22(I) e PH-22(II) axenizadas nesse estudo.

*Rhodotorula kratochvilovae* (CBS 7436), teve similaridade com a cepa PH-22<sub>(I)</sub>. *R. kratochvilovae*, é classificada como levedura oleaginosa e anteriormente nomeada de *Rhodospiridium kratochvilovae* e foi isolada do solo da Etiópia (Jiru et al., 2018; Q.-M. Wang et al., 2015). As literaturas apontam uma coloração salmão, e em condições ótimas de biorreator a espécie pode chegar a 15,34 g/L de biomassa; 8,6 g/L de rendimento lipídico e 56,06% de teor de lipídios; exibindo os ácidos graxos majoritários: ácidos oleico, palmítico, linoleico, esteárico, linolênico e palmitoleico, com a concentração de ácido graxos saturados e monoinsaturados somando 78,63% (Jiru et al., 2017, 2018). Isso indica que a espécie é uma ótima matéria-prima para a produção de biodiesel, o que corrobora com dados de estudos anteriores informando que os microrganismos oleaginosos são capazes de acúmulo de lipídios entre 20% e 70% de sua biomassa seca (Ratledge & Wynn, 2002).

Estudos mostraram a produção de carotenoides totais variando de 1,64 mg/L (através da fermentação submersa usando soro de queijo) a 2,59 mg/L (fermentação com meio a base de glicose; taxa de C/N de 80 após 39h), concentração de biomassa entre 9,3 g/L e 10,9 g/L (Sereti et al., 2023, 2024). Os carotenoides detectados na *R. kratochvilovae*, até então, foram o licopeno e o  $\beta$ -caroteno como majoritários, e  $\gamma$ -caroteno, torularrodina e toruleno como minoritários (Guo et al., 2022; Sereti et al., 2023, 2024). Ainda, outros estudos constataram aumento da produção de carotenoides sob privação de glicose devido a super expressão do gene acetil-CoA oxidase, enzima limitante da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos peroxissomais, e aumento de enzimas antioxidantes (He et al., 2023), e as baixas temperaturas (15 °C) aumentaram a biossíntese de carotenoides e os níveis de espécie reativa de oxigênio (ROS) mas reduziram a taxa de crescimento celular (Guo et al., 2022), e a histidina quinase híbrida, a principal proteína sensora dos fungos, induziu a produção parcial dos genes RKCrtI (fitoeno desaturase) e RKCrtYB (fitoeno sintase e licopeno ciclase) em baixas temperaturas (15 °C) para eliminar o excesso de ROS (He et al., 2022). Até o presente momento, não há outros relatos da presença de *R. kratochvilovae* na filosfera do bioma Amazônia.

A cepa PH-22<sub>(I)</sub> mostraram também similaridade a *Rhodotoula auracariae* (CBS 6031), cuja coloração rosada é atribuída a essa espécie, foi originalmente isolada de uma árvore apodrecida, a *Araucaria araucana* (Grinbergs & Yarrow, 1970), o que deu origem ao seu nome. No estudo de Squina & Mercadante (2003), a *R. araucariae* o teor de carotenoides totais alcançado foi 113,2  $\mu$ g/g (de massa seca), em que os majoritários foram toruleno+neurosporeno (49,3  $\mu$ g/g), torularrodina (31,5  $\mu$ g/g) e  $\beta$ -caroteno (24,6  $\mu$ g/g). Até a conclusão desse atual estudo, não houve pesquisas relatando a presença de *R. araucariae* em superfície de folhas.

*Rhodotorula paludigena* é uma das leveduras vermelhas produtoras de carotenoides, reconhecida por sua alta produtividade de  $\beta$ -caroteno, mas podendo produzir astaxantina (Hoondée et al., 2024; Sriphuttha et al., 2023; Thumkasem et al., 2023). Na literatura, foi mencionado o isolamento em flores de calêndula (*Tagetes erecta*) (Hoondée et al., 2024), de amostras marinhas, incluindo sedimento do fundo do oceano (M. Wang et al., 2019), de solo e água de mangue (Hoondée et al., 2019), néctar de plantas (Canto et al., 2017) e de manonias (*Ricinus communis*) (Gosalawit et al., 2021), pântanos (Sampaio, 2011), folhas de milho (Into et al., 2020) e de cana-de-açúcar (Srisuk et al., 2019).

No Brasil, a *R. paludigena* já foi encontrada em folhas, flores e vagens de cacau (*Theobroma cacao* L.) no sul do estado da Bahia e usado como agente de controle biológico (ACB), principalmente para “vassoura de bruxa” e “doenças da podridão da vagem gelada” causadas por *Moniliophthora perniciosa* e *Moniliophthora roreri*, respectivamente. Isso por meio dos mecanismos antagonísticos: co-cultivo do meio de cultivo, compostos orgânicos voláteis inibindo o crescimento micelial, células livres e compostos termoestáveis, e capacidade de produção de biofilme (Estrela Junior et al., 2022; Neto et al., 2021).

No estudo de Hoondée et al., (2019), a *R. paludigena* exibiu o maior teor de astaxantina de 0,033 mg/g peso de biomassa seca e 2,149 mg/L. Ao utilizar 1,92 g/L de nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ) como fonte de carbono juntamente com 10 g/L de glicose, o teor do mesmo carotenoide aumentou para 0,420 mg/g e 2,558 mg/L. O efeito da temperatura de 20 °C (a condição ótima) resultou em 2,381 mg/L de rendimento de astaxantina. No pH 6,5 o rendimento aumentou para 2,461 mg/L e por fim, o tempo de incubação ótimo de 5 dias atingiu 0,534 mg/g e 3,689 mg/L de produção de astaxantina. Resumindo, nesse estudo as condições ótimas para um bom rendimento de astaxantina foram 10 g/L de glicose, 1,92 g/L de  $\text{KNO}_3$ , 20 °C, pH 6,5 durante 5 dias. Em uma investigação de Thumkasem et al., (2023), para otimizar o crescimento de *R. paludigena* e sua produção de  $\beta$ -caroteno, mostrou os teores de 17,71 g/L de biomassa e 40,29 mg/L de  $\beta$ -caroteno em biorreator de 5 L nas condições: 30 °C, 6,2 g/L de sulfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), 75 mg/L de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) e taxa específica de crescimento de 0,22/h. No estudo de Sriphuttha et al. (2023), a *R. paludigena* exibiu teor de 15,39 mg carotenoides totais/g células liofilizadas, sendo o  $\beta$ -caroteno (10,16 mg/g) o mais predominante. Em isolados de camarão, a espécie basíonima *Rhodospiridium paludigenum*, apresentou teores de 305,9  $\mu\text{g}$  carotenoides totais/g, e 2,83 mg/L para o rendimento de carotenoides totais e 9,3 g/L para o rendimento de biomassa (Yang et al., 2011).

### 3.5. Rendimento de biomassa das leveduras isoladas

Após 5 dias de fermentação, os rendimentos de biomassa das leveduras isoladas neste estudo foram determinados, e podem ser visualizados na **Tabela 4**.

**Tabela 4** - Liofilização da biomassa dos fermentados

|                                 | <b>Biomassa<br/>(peso bruto)<br/>(mg)</b> | <b>Biomassa<br/>(peso líquido)<br/>(mg)</b> | <b>Rendimento (%)</b> |
|---------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------|
| <b>SM-1 (1)</b>                 | 12.994                                    | 131,2                                       | 1,00                  |
| <b>SM-1 (2)</b>                 | 12.962,7                                  | 195,4                                       | 1,51                  |
| <b>PH-7<sub>(I)</sub></b>       | 12.883,2                                  | 169,8                                       | 1,32                  |
| <b>PH-7<sub>(II)</sub></b>      | 12.766,7                                  | 112,0                                       | 0,88                  |
| <b>PH-13 (1)</b>                | 12.773,8                                  | 26,5                                        | 0,21                  |
| <b>PH-13 (2)</b>                | 12.937,3                                  | 98,4                                        | 0,76                  |
| <b>PH-17<sub>(I)</sub> (1)</b>  | 12.914,1                                  | 74,6                                        | 0,58                  |
| <b>PH-17<sub>(I)</sub> (2)</b>  | 12781,0                                   | 36,8                                        | 0,29                  |
| <b>PH-17<sub>(II)</sub></b>     | 12.650,0                                  | 122,7                                       | 0,97                  |
| <b>PH-18</b>                    | 12.882,6                                  | 146,1                                       | 1,13                  |
| <b>PH-18<sub>(I)</sub> (1)</b>  | 12.842,6                                  | 70,6                                        | 0,55                  |
| <b>PH-18<sub>(I)</sub> (2)</b>  | 12.777,5                                  | 32,8                                        | 0,26                  |
| <b>PH-18<sub>(I)</sub> (3)</b>  | 12.671,8                                  | 96,1                                        | 0,76                  |
| <b>PH-20<sub>(I)</sub> (1)</b>  | 13.029,2                                  | 141,3                                       | 1,08                  |
| <b>PH-20<sub>(I)</sub> (2)</b>  | 12.775,5                                  | 102,9                                       | 0,81                  |
| <b>PH-20<sub>(II)</sub></b>     | 13.105,4                                  | 224,1                                       | 1,71                  |
| <b>PH-22<sub>(I)</sub></b>      | 12.839,5                                  | 160,5                                       | 1,25                  |
| <b>PH-22<sub>(II)</sub> (1)</b> | 12.836,8                                  | 116,3                                       | 0,91                  |
| <b>PH-22<sub>(II)</sub> (2)</b> | 12.683,5                                  | 236,7                                       | 1,87                  |
| <b>dH-7</b>                     | 12.898,2                                  | 169,1                                       | 1,31                  |
| <b>dH-8<sub>(I)</sub> (1)</b>   | 12.947,8                                  | 123,9                                       | 0,96                  |
| <b>dH-8<sub>(I)</sub> (2)</b>   | 12.997,1                                  | 55,9                                        | 0,43                  |
| <b>dH-8<sub>(II)</sub> (1)</b>  | 12.771,5                                  | 45,3                                        | 0,35                  |
| <b>dH-8<sub>(II)</sub> (2)</b>  | 12.893,6                                  | 144,0                                       | 1,12                  |
| <b>Média</b>                    |                                           | 120.74                                      |                       |
| <b>Desvio</b>                   |                                           | 57.41                                       |                       |
| <b>CV (%)</b>                   |                                           | 47.55                                       |                       |

De acordo com os dados da tabela acima, as cepas PH-22<sub>(II)</sub> (2), PH-20<sub>(II)</sub> e SM-1 (2) obtiveram mais massa em relação as demais após o processo fermentativo, com 236,7 mg; 224,1 mg e 195,4 mg, respectivamente. Porém, a PH-13 (1), a PH-18<sub>(I)</sub> (2), a PH-17<sub>(I)</sub> (2) e a dH-8<sub>(II)</sub> (1), mostraram as piores, sendo as biomassas de 26,5 mg; 32,8 mg; 36,8 mg e 45,3 mg.

### 3.6. Teor de carotenoides totais produzido pelas leveduras isoladas

Após 5 dias de fermentação, os teores de carotenoides totais acumulados nas biomassas das leveduras isoladas neste estudo foram determinados, e podem ser visualizados na **Tabela 5**.

As biomassas liofilizadas provenientes do procedimento fermentativo (5 dias – 120h; 30 °C; 130 RPM; exposição à luz de LED) apresentaram valores de teores de carotenoides totais variando de 3,55 a 139,70 µg/g de biomassa seca. Os maiores valores de carotenoides totais foram de PH-18<sub>(I)</sub>, PH-13<sub>(I)</sub>, dPH-8<sub>(I)</sub> e dPH-8<sub>(II)</sub> com 139,70; 60,50; 54,26 e 52,71 µg/g de biomassa seca, respectivamente, enquanto os menores valores de PH-13<sub>(II)</sub>, PH-20<sub>(I)</sub>, dPH-7, PH-18 e PH-17<sub>(II)</sub> com 3,55; 3,86; 5,24; 5,41 e 8,03 µg/g de biomassa seca, respectivamente.

**Tabela 5** - Teor de carotenoides totais nas biomassas liofilizadas de leveduras.

| Número das amostras | Amostra               | Carotenoides Totais (µg/g biomassa seca) |
|---------------------|-----------------------|------------------------------------------|
| 1                   | SM-1 <sub>(I)</sub>   | 14,76 ± 0,05                             |
| 2                   | SM-1 <sub>(II)</sub>  | 32,24 ± 0,04                             |
| 3                   | PH-7                  | 16,56 ± 0,10                             |
| 4                   | PH-7 <sub>(II)</sub>  | 15,05 ± 0,11                             |
| 5                   | PH-13 <sub>(I)</sub>  | 60,50 ± 0,31                             |
| 6                   | PH-13 <sub>(II)</sub> | 3,55 ± 0,10                              |
| 7                   | PH-17 <sub>(I)</sub>  | 12,36 ± 0,08                             |
| 8                   | PH-17 <sub>(II)</sub> | 8,03 ± 0,02                              |
| 9                   | PH-18                 | 5,41 ± 0,03                              |
| 10                  | PH-18 <sub>(I)</sub>  | 139,70 ± 0,04                            |
| 11                  | PH-20 <sub>(I)</sub>  | 3,86 ± 0,01                              |
| 12                  | PH-20 <sub>(II)</sub> | 12,59 ± 0,03                             |
| 13                  | PH-22 <sub>(I)</sub>  | 14,92 ± 0,13                             |
| 14                  | PH-22 <sub>(II)</sub> | 44,98 ± 0,03                             |
| 15                  | dPH-8 <sub>(I)</sub>  | 54,26 ± 0,04                             |
| 16                  | dPH-8 <sub>(II)</sub> | 52,71±0,02                               |
| 17                  | dPH-7                 | 5,24±0,04                                |

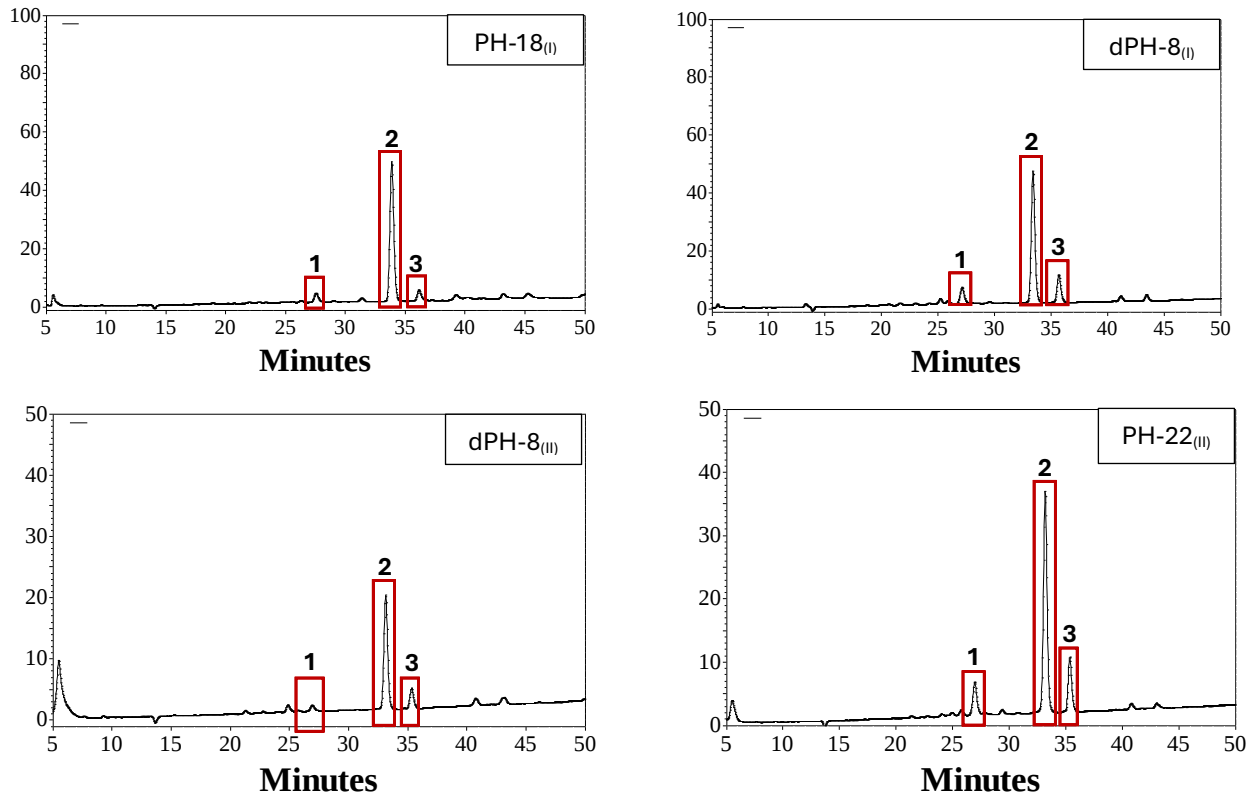
No estudo de Otero *et al.* (2019) na região do Escudo Sul-Riograndense e na Costa Leste do Rio Grande do Sul foram encontradas leveduras em amostras de solo, casca de árvore, flores, folhas e frutas cujos seus carotenoides totais variaram de 0,00 µg/g a 122,82 µg/g, utilizando resíduos agroindustriais no cultivo da biomassa. Logo os valores adquiridos na atual pesquisa foram similares ao de Otero e colaboradores, mas chegando a ultrapassar o valor máximo dele de 122,82 µg/g, e chegando a 139,70 µg/g de biomassa seca, isso sem a utilização de insumos para aumentar a produção.

Assim, mediante esses números, foram selecionadas as amostras PH-18<sub>(I)</sub>, PH-13<sub>(I)</sub>, dPH-8<sub>(I)</sub>, dPH-8<sub>(II)</sub> e PH-22<sub>(II)</sub> com os melhores teores para a próxima etapa, e excluíram-se aqueles com teor menor que 40 µg/g biomassa seca, pois abaixo dessa concentração o equipamento utilizado não conseguiu identificar os perfis.

### 3.7. Perfil de carotenoides produzido pelas leveduras isoladas

O cromatograma HPLC-DAD (**Figura 13**) mostrou a presença de três carotenoides que foram identificados (**Tabela 6**) nos extratos obtidos da biomassa de leveduras cultivadas na fermentação proposta nesse estudo. Apenas as cepas PH-18<sub>(I)</sub>, dPH-8<sub>(I)</sub>, dPH-8<sub>(II)</sub> e PH-22<sub>(II)</sub> mostraram resultados expressivos e com carotenoides.

**Figura 13** - Perfil cromatográfico dos carotenoides por HPLC-DAD



Nota: As atribuições de pico são apresentadas na Tabela 6

**Tabela 6** - Características cromatográficas, UV-visíveis e teores de carotenoides da biomassa liofilizada de leveduras, obtidos por HPLC-DAD

| Pico                                            | Carotenoide <sup>a</sup>    | $t_R$<br>(min) <sup>c</sup> | $\lambda_{max}$ (nm) <sup>d</sup> | %III/<br>II | %A <sub>B</sub> /<br>A <sub>II</sub> | Concentração (µg/g biomassa)      |                                   |                                    |                                    |
|-------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-------------|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
|                                                 |                             |                             |                                   |             |                                      | PH-18 <sub>(I)</sub> <sup>b</sup> | dPH-8 <sub>(I)</sub> <sup>b</sup> | dPH-8 <sub>(II)</sub> <sup>b</sup> | PH-22 <sub>(II)</sub> <sup>b</sup> |
| 1                                               | 13Z-β-Caroteno              | 25,8-25,9                   | 338, 422, 446, 468                | 20          | 35                                   | 24,6 ± 1,7                        | 26,6 ± 0,6                        | 33,7 ± 0,2                         | 25,95 ± 0,7                        |
| 2                                               | (all- <i>E</i> )-β-Caroteno | 33,6-33,9                   | 420, 450, 477                     | 18          | 0                                    | 63,0 ± 1,9                        | 53,1 ± 5,9                        | 50,8 ± 2,6                         | 46,7 ± 2,4                         |
| 3                                               | 9Z-β-Caroteno               | 34,4-34,5                   | 338, 420, 446, 472                | 25          | 8                                    | 27,4 ± 1,1                        | 29,0 ± 1,2                        | 34,1 ± 2,1                         | 28,7 ± 0,7                         |
| <b>Soma dos carotenoides identificados</b>      |                             |                             |                                   |             |                                      | 115 ± 2,3                         | 108,7 ± 7,7                       | 118,7 ± 4,9                        | 101,3 ± 3,8                        |
| <b>Atividade Vitamina A (µg RAE/g biomassa)</b> |                             |                             |                                   |             |                                      | 7,6 ± 0,2                         | 6,7 ± 0,6                         | 7,1 ± 0,3                          | 6,2 ± 0,3                          |

**a** = Identificação provisória com base em UV-Visível, **t<sub>R</sub>** = tempos de retenção relativos de HPLC e dados publicados. **b** = Média ± desvio padrão (n = 3, peso seco). **c** = Tempo de retenção na coluna C30. **d** = Gradiente linear de metanol/MTBE. Todos os picos foram quantificados com o padrão comercial autêntico de β-caroteno. RAE = atividade de retinol equivalente.

O fator de conversão NAS-IOM foi utilizado para calcular o valor de vitamina A, considerando 12 µg de (all-*E*)-β-caroteno e 24 µg de (9Z)-β-caroteno e (13Z)-β-caroteno

correspondendo a 1 µg de atividade de retinol equivalente (RAE), sendo os maiores valores de RAE observados para as leveduras que apresentaram maiores teores de β-caroteno na composição. A atividade utilizada foi de 100% para (all-*E*)-β-caroteno e 50% para (9*Z*)-β-caroteno e (13*Z*)-β-caroteno (NAS-IOM, 2001).

O pico 1, identificado como 13*Z*-β-caroteno, exibiu valores de 24,6 a 33,7 µg/g biomassa, enquanto o pico 3 foi identificado como 9*Z*-β-caroteno, com variação no teor de 27,4 a 34,1 µg/g biomassa. Por outro lado, o pico 2, identificado como o carotenoide majoritário (all-*E*)-β-caroteno, apresentou teores de 46,7 a 60,0 µg/g biomassa, representando entre 43% e 55% dos carotenoides identificados.

A cepa PH-18<sub>(I)</sub> a qual teve similaridade de 97,70% no ITS1 e 98,19% no ITS 4 com *Rhodospiridiobolus ruineniae*, mostrou ser capaz de sintetizar os três carotenoides (13*Z*-Caroteno, (all-*E*)-β-Caroteno e 9*Z*-β-Caroteno, sendo a primeira vez que esses carotenoides são relacionados à espécie. A *R. ruineniae* já isolada do solo de plantações de chá de Assam (*Camellia sinensis* var. *assamica*) no norte da Tailândia (Kumla *et al.*, 2020), da polpa de jambo (*Syzygium malaccense*) em Santiago de Cali, Colômbia (Ramírez-Castrillón *et al.*, 2019), em iniciador de cerveja de arroz chamado “emao” na Índia e que apresentou atividade antibacteriana contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* (Boro & Narzary, 2022), em grãos de café na Costa do Marfim que apresentou indícios de mecanismos de inibição contra o crescimento fúngico (Rodríguez *et al.*, 2024), de flores e frutas da Tailândia (Phuengjayaem *et al.*, 2023), este último indicando que essa espécie é produtora de astaxantina (teores de 0,011±0,10 a 0,067±0,14 mg/g; e rendimentos de 0,076±0,001 a 0,545±0,001 mg/L). Até o fechamento desse estudo não houve pesquisas anteriores que relatassem a presença dessa espécie em biomas brasileiros e nem ao filodendro. Assim, é o primeiro estudo que relata a presença dessa espécie no Brasil.

A cepa dPH-8<sub>(II)</sub> no ITS4, apontou similaridade de 94,41% à espécie *Leucosporidium egoroviorum*. A *L. egoroviorum* é uma nova espécie anamórfica das leveduras basidiomicetas, já isolada dos frutos de *Cucurbita pepo* subsp. *pepo* (abobrinha) na Rússia, e pertencente ao gênero *Leucosporidium*, principalmente, psicrofílas, que ocorrem em materiais vegetais, solos e ambientes marinhos de latitudes altas e moderadas (Kachalkin *et al.*, 2023).

Já para a mesma cepa, mas no ITS5 houve a similaridade com as espécies *Lyomyces mascarensis*, *Lyomyces allantosporus* e *Lyomyces gatesiae* com 90,79% semelhança para as três.

*Lyomyces mascarensis* e *Lyomyces allantosporus* já foram localizadas na Ilha da Reunião – França. É um pequeno gênero corticioide com basidiomata odontióide efusivo,

branco ou pálido, fino, liso ou minuciosamente odontoide. O gênero é geralmente considerado como parte de *Hyphodontia sensu lato* (Yurchenko et al., 2017).

*Lyomyces gatesiae*, basidiósporos amplamente elipsóides ou ovóides, com uma grande gota oleosa, hialina, lisa, de paredes finas, acianofilosa, inamilóide, indextrinóide. Já foi encontrada na Austrália e Tasmânia (X.-W. Wang et al., 2021).

Apesar dessas espécies não serem os alvos principais desse trabalho, os resultados adquiridos foram interessantes, pois elas apresentaram carotenoides (Tabela 6) e foram isoladas de amostras da microrregião do bioma Amazônia.

A cepa PH-8<sub>(I)</sub> confirmou similaridade de 98,06% no ITS4 COM A *Hannaella pagnoccae*. A *H. pagnoccae* sp. nov. foi descoberta por Landell et al. (2014) após análises de sequenciamento de isolados do Rio Grande do Sul (RS), Minas Gerais (MG), Rio de Janeiro (RJ), Tocantins (TO), Oklahoma (USA), Hsinchu (Taiwan) e Bangkok (Thailand). Pertencente ao gênero *Hannaella*, essa espécie é recorrente na filosfera (a superfície das folhas) de plantas (Boekhout et al., 2011; Llanos-Gómez et al., 2024; Q.-M. Wang & Bai, 2008) e foi isolada de locais distantes com climas tropicais à subtropicais semelhantes, associados a diferentes plantas e solos. A espécie pode ainda estar associada a substratos ricos em matéria orgânica em decomposição (Landell et al., 2014). Até o fechamento do levantamento bibliográfico desse trabalho não foi encontrado trabalhos relatando produção de carotenoides ou pigmentos nessa espécie.

Logo, com os resultados das espécies citadas acima nesse presente trabalho, foi a primeira vez relatada a presença de carotenoides nelas e isoladas da filosfera de *Philodendron hederaceum*.

A cepa de dPH-8<sub>(I)</sub> apontou similaridade no IT1 de 97,65% e cobertura de 45% com a espécie *Rhynchogastrema noutii*. Seu basionimo *Bandoniozyma noutii* já foi isolado de exsudatos vegetais de nespereira - *Eriobotrya japonica* (Rosaceae), na floresta da Tijuca, RJ, Brasil; e é capaz de fermentar sacarose e rafinose, os açúcares mais comuns em exsudatos (Valente et al., 2012). Todavia, não há relatos de espécie ou de seu basionimo na filosfera de filodendro ou de alguma síntese de carotenoides. Assim, esse estudo foi primeiro a relatar tais associações.

Apesar dessas espécies não serem os alvos principais desse trabalho, os resultados adquiridos foram interessantes, pois elas apresentaram carotenoides (Tabela 6) e foram isoladas de amostras da microrregião do bioma Amazônia.

Por exemplo, a cepa PH-18<sub>(I)</sub> apesar de apresentar um rendimento de -73,68% na viabilidade celular (Tabela 2) e variar o rendimento da biomassa de 0,26% a 0,76% na

determinação de biomassa no processo fermentativo de 5 dias (Tabela 4), foi a cepa que teve o maior teor de carotenoides totais ( $139,70 \pm 0,04 \mu\text{g/g}$  biomassa seca) (Tabela 5) e a segunda maior no teor de carotenoides por HPLC-DAD ( $115 \pm 2,3 \mu\text{g/g}$  biomassa seca) (Tabela 6). Como já mencionado, diversos fatores podem afetar a viabilidade celular, rendimento e determinação da biomassa das leveduras, como temperatura (Allahkarami et al., 2021), pH (Zhao et al., 2019), oxigênio (Saenge et al., 2011), agitação (Bento et al., 2019), exposição à luz (Pham et al., 2020), taxa de C/N (Hien & Dao, 2020) entre outros. Por outro lado, mesmo com esses números adversos, a cepa ainda teve ótimos números nos teores de carotenoides totais e no perfil deles em HPLC-DAD. Logo, somente alguns ajustes nos parâmetros fermentativos seriam necessários para melhorar a biomassa.

As cepas dPH-8, sendo a dPH-8<sub>(I)</sub> apresentou -29,27% de rendimento na viabilidade celular; variou de 0,43% a 0,96% no rendimento da determinação de biomassa;  $54,26 \pm 0,04 \mu\text{g/g}$  biomassa seca no teor de carotenoides totais; e  $108,7 \pm 7,7 \mu\text{g/g}$  biomassa seca no na soma de carotenoides identificados por HPLC-DAD. A cepa dPH-8<sub>(II)</sub> apresentou o rendimento na viabilidade celular de 88,82%; no rendimento da biomassa de 0,35% a 1,12%; no teor de carotenoides totais de  $52,71 \pm 0,02 \mu\text{g/g}$  biomassa seca; e na soma de carotenoides identificados por HPLC-DAD de  $118,7 \pm 4,9 \mu\text{g/g}$  biomassa. A dPH-8<sub>(I)</sub> teve uma viabilidade muito menor se comparado com a dPH-8<sub>(II)</sub>, mas com o comportamento na determinação semelhantes, em ambas a biomassa aumentou após o processo fermentativo e sobre o perfil dos carotenoides, a dPH-8<sub>(II)</sub>, números maiores também. Essas cepas e a PH-18<sub>(I)</sub> podem ter uma boa aplicação biotecnológica, se trabalhadas corretamente.

Ainda, pontos em comum com a maioria das espécies identificadas das cepas PH-18<sub>(I)</sub>, dPH-8<sub>(I)</sub>, dPH-8<sub>(II)</sub> e PH-22<sub>(II)</sub> acima são a ausência de carotenoides e o não isolamento de folhas como da espécie *Philodendron hederaceum*, além de não estarem presentes no bioma amazônico, são o caso da *Hannaella pagnoccae* e *Rhynchogastrema noutii*, *Leucosporidium egoroviorum*, *Lyomyces mascarensis*, *Lyomyces allantosporus*, *Lyomyces gatesiae* com excessão espécie da *Rhodospiridiobolus ruinenia*, a qual produz astaxantina, de acordo com as literaturas. Até o encerramento desta pesquisa, não houve relatos nas literaturas sobre as espécies *H. pagnoccae*, *R. noutii*, *L. egoroviorum*, *L. mascarensis*, *L. allantosporus* e *L. gatesiae* com síntese de carotenoides. Assim, seria bem interessante futuros trabalhos com aplicações biotecnológicas com elas.

A cepa PH-22<sub>(II)</sub> que apresentou similaridade no ITS1 de 91,87% para *Rhodotorula diabovata* e no ITS4 de 91,20% para *Rhodotorula glutinis*. Essa cepa teve uma ótima viabilidade celular após 5 dias de fermentação, chegando 92,76% mostrando ótima atividade e

longevidade das células. Os rendimentos da biomassa foram 11,63% e 23,67% (n=2); o teor total de carotenoides foi de  $44,98 \pm 0,03 \mu\text{g/g}$  biomassa seca e de  $101,3 \pm 3,8 \mu\text{g/g}$  biomassa seca na soma dos carotenoides identificados em HPLC-DAD. No estudo de Peng et al. (2021), a torularrodina foi o carotenoide majoritário (298,3 mg/L) nessa espécie, seguida de quantidades menores de  $\gamma$ -caroteno e toruleno, com valores menores que 50 mg/L. Logo, os carotenoides 13Z- $\beta$ -Caroteno; (all-E)- $\beta$ -Caroteno e 9Z- $\beta$ -Caroteno são uma novidade para *R. diobovata*.

Para *R. glutinis*, o licopeno e o  $\beta$ -caroteno foram majoritários (Malisorn & Suntornsuk, 2009) e suas colônias apresentam uma coloração vermelho-alaranjado (Mussagy et al., 2022) ou laranja-rosado (Uludag Altun et al., 2014), o que foi detectado na cepa PH-22(II) isolada nesse estudo.

#### 4. CONCLUSÃO

Nesse trabalho de bioprospecção de espécies de leveduras presentes na microrregião do bioma Amazônia com potencial para a produção de carotenoides se conseguiu encontrar espécies do gênero *Rhodotorula* com considerável síntese desses compostos bioativos, sendo elas a *Rhodotorula araucariae*, a *Rhodotorula diobovata*, a *Rhodotorula glutinis*, a *Rhodotorula kravtchvilovae* e a *Rhodotorula paludigena*, além disso, também se descobriu espécies que produziram esses carotenoides, uma descoberta que ainda não foi reportada em estudos anteriores a esse, sendo as espécies *Hannaella pagnoccae*, *Leucosporidium egoroviorum*, *Lyomyces mascarensis*, *Lyomyces allantosporus*, *Lyomyces gatesiae* e *Rhynchogastrema noutii* com exceção *Rhodospiridiobolus ruinenia*, a qual produz astaxantina. Todas as leveduras selecionadas neste estudo apresentaram o mesmo perfil de produção de carotenoides, conforme HPLC-DAD, exibindo o (all-E)- $\beta$ -caroteno como carotenoide majoritário, seguido dos seus isômeros Z (13Z- $\beta$ -Caroteno, e 9Z- $\beta$ -Caroteno), sendo as leveduras isoladas em dPH-8(II) e PH-18(I), as que produziram os maiores concentrações,  $118,7 \pm 4,9 \mu\text{g/g}$  e  $115 \pm 2,3 \mu\text{g/g}$ , respectivamente.

Os resultados encontrados neste estudo destacam uma perspectiva muito promissora para futuras prospecções de micro-organismos produtores de pigmentos no bioma Amazônia, principalmente leveduras, assim como futuras aplicações biotecnológicas desses microrganismos nas diversas indústrias, principalmente no setor de alimentos, de fármacos e de cosméticos. Portanto, novos estudos com essas cepas devem ser aprofundados com o intuito de melhor conhecer e aumentar o potencial de aplicação industrial, otimizando os parâmetros de fermentação com foco na produção de elevados teores de biomassa e teor de carotenoides de

interesse, podendo assim vir a substituir o processo de obtenção dos carotenoides por via sintética ou por exploração de fontes vegetais.

## 5. REFERÊNCIAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists. 18th ed., AOAC International: Washington, 2000. <https://www.aoac.org/official-methods-of-analysis/>
- ALLAHKARAMI, S., SEPAHI, A. A., HOSSEINI, H., & RAZAVI, M. R. (2021). Isolation and identification of carotenoid-producing *Rhodotorula sp.* from Pinaceae forest ecosystems and optimization of in vitro carotenoid production. *Biotechnology Reports*, 32, e00687. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00687>
- ALVARADO-HUALLANCO, M. B., & MAUGERI-FILHO, F. (2010). Kinetics and modeling of fructo-oligosaccharide synthesis by immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula sp.* *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(12), 1654–1662. <https://doi.org/10.1002/jctb.2477>
- ANDRADE, R. F. DA S., LIMA, R. A., RIBEAUX, D. R., ARAÚJO, H. W. C., FRANCO, L. O., PESSOA-JÚNIOR, A., & CAMPOS-TAKAKI, G. M. (2016). Production of  $\beta$ -Carotene by a Newly Isolated *Rhodotorula glutinis* UCP1555 Strain and Cytotoxic Effect Evaluation. *Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 10(5), 212–220. <https://doi.org/10.17265/1934-7375/2016.05.003>
- AZMI, W., THAKUR, M., & KUMARI, P. (2011). Production of a heat stable  $\beta$ -caroteno with antioxidant activity by *Rhodotorula sp.* *International Journal of Food and Fermentation Technology*, 1, 83–91. [https://www.researchgate.net/profile/Abhishek-Walia-2/publication/274393006\\_Isolation\\_of\\_an\\_antifungal\\_protein\\_from\\_kiwifruits/links/62453d4e21077329f2e2adb5/Isolation-of-an-antifungal-protein-from-kiwifruits.pdf#page=91](https://www.researchgate.net/profile/Abhishek-Walia-2/publication/274393006_Isolation_of_an_antifungal_protein_from_kiwifruits/links/62453d4e21077329f2e2adb5/Isolation-of-an-antifungal-protein-from-kiwifruits.pdf#page=91)
- BCC RESEARCH. (2022). The Global Market for Carotenoids. <https://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/the-global-market-forcarotenoids.html>
- BENTO, T. F. S. R., VIANA, V. F. M., CARNEIRO, L. M., & SILVA, J. P. A. (2019). Influence of Agitation and Aeration on Single Cell Oil Production by *Rhodotorula glutinis* from Glycerol. *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*, 09(02), 29–43. <https://doi.org/10.4236/jsbs.2019.92003>
- BOEKHOUT, T., BAI, F.-Y., & NAKASE, T. (2011). Bullera. In *The Yeasts* (5th ed., Vol. 3, pp. 1623–1659). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00137-3>
- BORO N and NARZARY D (2022) Amylolytic Fungi in the Ethnic Beer Starter “emao” and Their Beer-Producing Attributes. *Front. Sustain. Food Syst.* 6:869430. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.869430>
- BUYUKSIRIT, T., & KULEASAN, H. (2014). Antimicrobial agents produced by yeasts. *International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering*, 8. <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=fdeb884bc5df3c60abaa2becd460892df26472e4>

- BUZZINI, P., INNOCENTI, M., TURCHETTI, B., LIBKIND, D., VAN BROOCK, M., & MULINACCI, N. (2007). Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, and *Sporidiobolus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(8), 1024–1031. <https://doi.org/10.1139/W07-068>
- BUZZINI, P., MARTINI, A., GAETANI, M., TURCHETTI, B., PAGNONI, U. M., & DAVOLI, P. (2005). 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*, 36(5–6), 687–692. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.12.028>
- CABRAL, M. M. S., CENCE, K., ZENI, J., TSAI, S. M., DURRER, A., FOLTRAN, L. L., TONIAZZO, G., VALDUGA, E., & TREICHEL, H. (2011). Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain by submerged fermentation. *European Food Research and Technology*, 233(1), 159–166. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1510-0>
- CANAL, D., KÖSTER, N., JONES, K. E., KOROTKOVA, N., CROAT, T. B., & BORSCH, T. (2018). Phylogeny and diversification history of the large Neotropical genus *Philodendron* (Araceae): Accelerated speciation in a lineage dominated by epiphytes. *American Journal of Botany*, 105(6), 1035–1052. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1111>
- CANLI, O., ERDAL, S., TASKIN, M., & KURBANOGLU, E. B. (2011). Effects of extremely low magnetic field on the production of invertase by *Rhodotorula glutinis*. *Toxicology and Industrial Health*, 27(1), 35–39. <https://doi.org/10.1177/0748233710380219>
- CANTO, A., HERRERA, C. M., & RODRIGUEZ, R. (2017). Nectar-living yeasts of a tropical host plant community: diversity and effects on community-wide floral nectar traits. *PeerJ*, 5, e3517. <https://doi.org/10.7717/peerj.3517>
- CARVALHO, F. P., DE SOUZA, A. C., MAGALHÃES-GUEDES, K. T., DIAS, D. R., SILVA, C. F., & SCHWAN, R. F. (2013). Yeasts diversity in Brazilian Cerrado soils: Study of the enzymatic activities. *African Journal of Microbiology Research*, 7(32), 4176–4190. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5752>
- CASTELO-BRANCO, D. DE S. C. M., GRAÇA-FILHO, R. V. DA, OLIVEIRA, J. S. DE, ROCHA, M. G. DA, ARAÚJO, G. DOS S., ARAÚJO NETO, M. P. DE, CORDEIRO, R. DE A., PEREIRA-NETO, W. DE A., SIDRIM, J. J. C., BRILHANTE, R. S. N., & ROCHA, M. F. G. (2021). Yeast microbiota of free-ranging amphibians and reptiles from Caatinga biome in Ceará State, Northeast Brazil: High pathogenic potential of *Candida famata*. *Ciência Rural*, 51(7). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200742>
- CHAN, E. W. C., & WONG, S. K. (2015). Phytochemistry and pharmacology of ornamental gingers, *Hedychium coronarium* and *Alpinia purpurata*: a review. *Journal of Integrative Medicine*, 13(6), 368–379. [https://doi.org/10.1016/S2095-4964\(15\)60208-4](https://doi.org/10.1016/S2095-4964(15)60208-4)
- CHEIRSILP, B., KITCHA, S., & TORPEE, S. (2012). Co-culture of an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and a microalga *Chlorella vulgaris* for biomass and lipid production using pure and crude glycerol as a sole carbon source. *Annals of Microbiology*, 62(3), 987–993. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0338-y>

CHÉROLET, B. (2023, December 5). Verão amazônico: entenda as origens do fenômeno e suas consequências. <https://www.educamaisbrasil.com.br/educacao/noticias/veraoamazonico-entenda-as-origens-do-fenomeno-e-suas-consequencias>

CIPOLATTI, E. P., REMEDI, R. D., SÁ, C. DOS S., RODRIGUES, A. B., GONÇALVES RAMOS, J. M., VEIGA BURKERT, C. A., FURLONG, E. B., & FERNANDES DE MEDEIROS BURKERT, J. (2019). Use of agroindustrial by products as substrate for production of carotenoids with antioxidant potential by wild yeasts. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20, 101208. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101208>

CIVIERO, E., PINTUS, M., RUGGERI, C., TAMBURINI, E., SOLLAI, F., SANJUST, E., & ZUCCA, P. (2018). Physiological and Phylogenetic Characterization of *Rhodotorula diobovata* DSBCA06, a Nitrophilous Yeast. *Biology*, 7(3), 39. <https://doi.org/10.3390/biology7030039>

COBBS, C., HEATH, J., STIREMAN, J. O., & ABBOT, P. (2013). Carotenoids in unexpected places: Gall midges, lateral gene transfer, and carotenoid biosynthesis in animals. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 68(2), 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.03.012>

COELHO, A. R., NÓBREGA, G. M. DE A., PAGNOCCA, F. C., HOFFMANN, F. L., HARADA, K., & HIROOKA, E. Y. (2011). Avaliação do potencial antagônico de leveduras, visando biocontrole de deterioração por *Penicillium expansum*. *Semina: Ciências Agrárias*, 32(4Sup1), 1879. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2011v32n4Sup1p1879>

CORREIA-DA-SILVA, M., VASCONCELOS, S., SOARES, M. DE L. DA C., MAYO, S. J., & BENKO-ISEPPON, A. M. (2014). Chromosomal diversity in *Philodendron* (Araceae): taxonomic significance and a critical review. *Plant Systematics and Evolution*, 300(5), 1111–1122. <https://doi.org/10.1007/s00606-013-0949-9>

CROAT, T. B., MINES, T. E., & KOSTELAC, C. V. (2019). A review of *Philodendron subg.* *Philodendron* (Araceae) from South America with the descriptions of 22 new species. *Webbia*, 74(2), 193–246. <https://doi.org/10.1080/00837792.2019.1660559>

DA SILVA, J., HONORATO DA SILVA, F. L., SANTOS RIBEIRO, J. E., NÓBREGA DE MELO, D. J., SANTOS, F. A., & LUCENA DE MEDEIROS, L. (2020). Effect of supplementation, temperature and pH on carotenoids and lipids production by *Rhodotorula mucilaginosa* on sisal bagasse hydrolyzate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 30, 101847. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101847>

EASTERLING, E. R., FRENCH, W. T., HERNANDEZ, R., & LICHA, M. (2009). The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Technology*, 100(1), 356–361. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.030>

EL-BANNA, A. A., EL-RAZEK, A. M. A., & EL-MAHDY, A. R. (2012). Some Factors Affecting the Production of Carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*. *Food and Nutrition Sciences*, 03(01), 64–71. <https://doi.org/10.4236/fns.2012.31011>

ESTRELA JUNIOR, A. DA S., SOLÍS, K., PIMENTA NETO, A. A., VERA, D. I., GARZÓN, I., PEÑAHERRERA, S., DIORATO, V. S., GRAMACHO, K. P., & LARANJEIRA, D. (2022). Effect of antagonistic yeasts from cacao tissues on controlling growth and sporulation of

*Moniliophthora roreri*. Biological Control, 172, 104956.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.104956>

FAKANKUN, I., FRISTENSKY, B., & LEVIN, D. B. (2021). Genome Sequence Analysis of the Oleaginous Yeast, *Rhodotorula diobovata*, and Comparison of the Carotenogenic and Oleaginous Pathway Genes and Gene Products with Other Oleaginous Yeasts. *Journal of Fungi*, 7(4), 320. <https://doi.org/10.3390/jof7040320>

FELL, J. W., STATZELL-TALLMAN, A., SCORZETTI, G., & GUTIÉRREZ, M. H. (2011). Five new species of yeasts from fresh water and marine habitats in the Florida Everglades. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(3), 533–549. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9521-6>

FRENGOVA, G. I., & BESHKOVA, D. M. (2009). Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(2), 163–180. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0492-9>

GALAFASSI, S., CUCCHETTI, D., PIZZA, F., FRANZOSI, G., BIANCHI, D., & COMPAGNO, C. (2012). Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. *Bioresource Technology*, 111, 398–403. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.004>

GONG, G., ZHANG, X., & TAN, T. (2020). Simultaneously enhanced intracellular lipogenesis and  $\beta$ -carotene biosynthesis of *Rhodotorula glutinis* by light exposure with sodium acetate as the substrate. *Bioresource Technology*, 295, 122274. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122274>

GOSALAWIT, C., IMSOONTHORNRUKSA, S., GILROYED, B. H., MCNEA, L., BOONTAWAN, A., & KETUDAT-CAIRNS, M. (2021). The potential of the oleaginous yeast *Rhodotorula paludigena* CM33 to produce biolipids. *Journal of Biotechnology*, 329, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.01.021>

GRBIĆ, M., VAN LEEUWEN, T., CLARK, R. M., ROMBAUTS, S., ROUZÉ, P., GRBIĆ, V., OSBORNE, E. J., DERMAUW, W., THI NGOC, P. C., ORTEGO, F., HERNÁNDEZCRESPO, P., DIAZ, I., MARTINEZ, M., NAVAJAS, M., SUCENA, É., MAGALHÃES, S., NAGY, L., PACE, R. M., DJURANOVIĆ, S., ... VAN DE PEER, Y. (2011). The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. *Nature*, 479(7374), 487–492. <https://doi.org/10.1038/nature10640>

GRIGORE, D.-M., UNGUREANU-IUGA, M., POGURSCHI, E. N., & BĂBEANU, N. E. (2023). Transforming *Rhodotorula sp.* Biomass to Active Biologic Compounds for Poultry Nutrition. *Agriculture*, 13(6), 1159. <https://doi.org/10.3390/agriculture13061159>

GRINBERGS, J., & YARROW, D. (1970). *Rhodotorula araucariae* sp. n. *Antonie van Leeuwenhoek*, 36(1), 455–457. <https://doi.org/10.1007/BF02069046>

GUO, R., LIU, T., GUO, C., CHEN, G., FAN, J., & ZHANG, Q. (2022). Carotenoid biosynthesis is associated with low-temperature adaptation in *Rhodospiridium kratochvilovae*. *BMC Microbiology*, 22(1), 319. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02728-2>

HARTMAN, L., HAWKE, J. C., SHORLAND, F. B., & DI MENNA, M. E. (1959). The fatty acid composition of *Rhodotorula graminis* fat. Archives of Biochemistry and Biophysics, 81(2), 346–352. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90212-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90212-7)

HE, M., GUO, R., CHEN, G., XIONG, C., YANG, X., WEI, Y., CHEN, Y., QIU, J., & ZHANG, Q. (2023). Comprehensive Response of *Rhodospiridium kratochvilovae* to Glucose Starvation: A Transcriptomics-Based Analysis. Microorganisms, 11(9), 2168. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092168>

HE, M., YANG, X., LIU, T., ZHANG, X., JI, X., WEI, Y., & ZHANG, Q. (2022). Hybrid histidine kinase HisK2301 modulates carotenoid production to counteract cold-induced oxidative stress in *Rhodospiridium kratochvilovae* YM25235 under low temperature. Antonie van Leeuwenhoek, 115(12), 1393–1404. <https://doi.org/10.1007/s10482-022-01783-z>

HERNÁNDEZ-ALMANZA, A., CESAR MONTANEZ, J., AGUILAR-GONZÁLEZ, M. A., MARTÍNEZ-ÁVILA, C., RODRÍGUEZ-HERRERA, R., & AGUILAR, C. N. (2014). *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. Food Bioscience, 5, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2013.11.007>

HIEN, L. T. M., & DAO, D. T. A. (2020). Effects of nutritional and environmental conditions on carotenoid biosynthesis by *Rhodotorula sp.* Engineering and Technology, 8(2), 22–29. <https://doi.org/10.46223/HCMCOUJS.tech.en.8.2.343.2018>

HOONDEE, P., PHUENGJAYAEM, S., KINGKAEW, E., ROJSITTHISAK, P., SRITULARAK, B., THOMPPO, S., PORNPUTTAPONG, N., THITIKORNPONG, W., & TANASUPAWAT, S. (2024). Comparative genomic analysis and optimization of astaxanthin production of *Rhodotorula paludigena* TL35-5 and *Rhodotorula sampaoiana* PL61-2. PLOS ONE, 19(7), e0304699. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0304699>

HOONDEE, P., WATTANAGONNIYOM, T., WEERAPHAN, T., TANASUPAWAT, S., & SAVARAJARA, A. (2019). Occurrence of oleaginous yeast from mangrove forest in Thailand. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 35(7), 108. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2680-3>

IGREJA, W. S., MAIA, F. DE A., LOPES, A. S., & CHISTÉ, R. C. (2021). Biotechnological Production of Carotenoids Using Low Cost-Substrates Is Influenced by Cultivation Parameters: A Review. International Journal of Molecular Sciences, 22(16), 8819. <https://doi.org/10.3390/ijms22168819>

INTO, P., PONTES, A., SAMPAIO, J. P., & LIMTONG, S. (2020). Yeast Diversity Associated with the Phylloplane of Corn Plants Cultivated in Thailand. Microorganisms, 8(1), 80. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010080>

JIRU, T. M., GROENEWALD, M., POHL, C., STEYN, L., KIGGUNDU, N., & ABATE, D. (2017). Optimization of cultivation conditions for biotechnological production of lipid by *Rhodotorula kratochvilovae* (syn, *Rhodospiridium kratochvilovae*) SY89 for biodiesel preparation. 3 Biotech, 7(2), 145. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0769-7>

JIRU, T. M., STEYN, L., POHL, C., & ABATE, D. (2018). Production of single cell oil from cane molasses by *Rhodotorula kratochvilovae* (syn, *Rhodospiridium kratochvilovae*) SY89 as

a biodiesel feedstock. *Chemistry Central Journal*, 12(1), 91. <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0457-7>

KACHALKIN, A. V., GLUSHAKOVA, A. M., & TOMASHEVSKAYA, M. A. (2023). *Leucosporidium egoroviorum* f.a., sp. nov., a New Yeast Species Isolated from Zucchini. *Microbiology*, 92(1), 30–35. <https://doi.org/10.1134/S0026261722602494>

KHOO, K. S., LEE, S. Y., OOI, C. W., FU, X., MIAO, X., LING, T. C., & SHOW, P. L. (2019). Recent advances in biorefinery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 288, 121606. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121606>

KIM, J., LEE, E.-J., LEE, K.-E., NHO, Y.-H., RYU, J., KIM, S. Y., YOO, J. K., KANG, S., & SEO, S. W. (2023). Lipid extract derived from newly isolated *Rhodotorula toruloides* LAB-07 for cosmetic applications. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 21, 2009–2017. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.03.018>

KOT, A. M., BŁAŻEJAK, S., GIENTKA, I., KIELISZEK, M., & BRYŚ, J. (2018). Torulene and torularhodin: “new” fungal carotenoids for industry? *Microbial Cell Factories*, 17(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0893-z>

KUMLA, J., NUNDAENG, S., SUWANNARACH, N., & LUMYONG, S. (2020). Evaluation of Multifarious Plant Growth Promoting Trials of Yeast Isolated from the Soil of Assam Tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*) Plantations in Northern Thailand. *Microorganisms*, 8(8), 1168. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081168>

LABABPOUR, A., SHIMAHARA, K., HADA, K., KYOUI, Y., KATSUDA, T., & KATOH, S. (2005). Fed-batch culture under illumination with blue light emitting diodes (LEDs) for astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(3), 339–342. <https://doi.org/10.1263/jbb.100.339>

LAICH, F., VACA, I., & CHÁVEZ, R. (2013). *Rhodotorula portillonensis* sp. nov., a basidiomycetous yeast isolated from Antarctic shallow-water marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt\_10), 3884–3891. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.052753-0>

LANDELL, M. F., BRANDÃO, L. R., BARBOSA, A. C., RAMOS, J. P., SAFAR, S. V. B., GOMES, F. C. O., SOUSA, F. M. P., MORAIS, P. B., BROETTO, L., LEONCINI, O., RIBEIRO, J. R., FUNGSIN, B., TAKASHIMA, M., NAKASE, T., LEE, C.-F., VAINSTEIN, M. H., FELL, J. W., SCORZETTI, G., VISHNIAC, H. S., ... VALENTE, P. (2014). *Hannaella pagnoccae* sp. nov., a tremellaceous yeast species isolated from plants and soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt\_6), 1970–1977. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.059345-0>

LANGI, P., KIOKIAS, S., VARZAKAS, T., & PROESTOS, C. (2018). Carotenoids: From Plants to Food and Feed Industries. In *Microbial Carotenoids: Methods and Protocols* (Vol. 1852, pp. 57–71). Humana Press, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8742-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8742-9_3)

LEITE JÚNIOR, D. P., PEREIRA, R. S., DE ALMEIDA, W. S., ALVES SIMÕES, S. DE A., YAMAMOTO, A. C. A., DE SOUZA, J. V. R., MARTINS, E. R., DOS SANTOS, F. A. L., & HAHN, R. C. (2018). Indoor Air Mycological Survey and Occupational Exposure in Libraries

in Mato Grosso-Central Region—Brazil. *Advances in Microbiology*, 08(04), 324–353. <https://doi.org/10.4236/aim.2018.84022>

LINGAPPA, S., GANAPATHY, S., AWASTHI, S., & THIRUGNANASAMBANDAN, S. (2022). Isolation and Characterization of Marine fungi for their Bioactive pigments. *Advances in BioResearch*, 13, 62–65. <https://doi.org/10.15515/abr.0976-4585.13.4.6275>

LLANOS-GÓMEZ, K. J., AIME, M. C., & DÍAZ-VALDERRAMA, J. R. (2024). The surface of leaves and fruits of Peruvian cacao is home for several *Hannaella* yeast species, including the new species *Hannaella theobromatis* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, 117(1), 43. <https://doi.org/10.1007/s10482-024-01936-2>

LOPES DA SILVA, T., FEIJÃO, D., ROSEIRO, J. C., & REIS, A. (2011). Monitoring *Rhodotorula glutinis* CCM1 145 physiological response and oil production growing on xylose and glucose using multi-parameter flow cytometry. *Bioresource Technology*, 102(3), 2998–3006. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.008>

LOSS-OLIVEIRA, L., SAKURAGUI, C., SOARES, M. DE L., & SCHRAGO, C. G. (2016). Evolution of Philodendron (Araceae) species in Neotropical biomes. *PeerJ*, 4, e1744. <https://doi.org/10.7717/peerj.1744>

LOURENÇO, A. R., & BOVE, C. P. (2019). Flora do Rio de Janeiro: Lemnoideae (Araceae). *Rodriguésia*, 70. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201970042>

MACHADO, W. R. C. (2018). Bioprospecção de levedura para a produção de carotenoides microbianos [Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”]. <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/22c8edd7-e921-4938-94aa-534d59217fa2/content>

MACHADO, W. R. C., & BIANCHI, V. L. DEL. (2021). Production of microbial carotenoids by *Rhodotorula lactosa* isolated in the Brazilian tropical savanna / Produção de carotenoides microbianos por *Rhodotorula lactosa* isolada na savana tropical brasileira. *Brazilian Journal of Development*, 7(9), 89302–89322. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n9-205>

MACHADO, W. R. C., SILVA, L. G. DA, VANZELA, E. S. L., & DEL BIANCHI, V. L. (2019). Evaluation of the process conditions for the production of microbial carotenoids by the recently isolated *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409. *Brazilian Journal of Food Technology*, 22. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.26718>

MACHADO, W. R. M., SILVA, L. G., VANZELA, E. S., & DEL BIANCHI, V. (2019). Production of carotenoids by *Rhodotorula toruloides* isolated from Brazilian tropical savannah. In *International Food Research Journal* (Vol. 26, Issue 4). [http://ifrj.upm.edu.my/26%20\(04\)%202019/16%20-%20IFRJ181068.R2-Final.pdf](http://ifrj.upm.edu.my/26%20(04)%202019/16%20-%20IFRJ181068.R2-Final.pdf)

MAIA, F. DE A., IGREJA, W. S., XAVIER, A. A. O., MERCADANTE, A. Z., LOPES, A. S., & CHISTÉ, R. C. (2023). Concentrated Manipueira as an Alternative Low-Cost Substrate to *Rhodotorula glutinis* for Biotechnological Production of High Contents of Carotenoids. *Fermentation*, 9(7), 617. <https://doi.org/10.3390/fermentation9070617>

- MALDONADE, I. R., RODRIGUEZ-AMAYA, D. B., & SCAMPARINI, A. R. P. (2008). Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. *Food Chemistry*, 107(1), 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.075>
- MALISORN, C., & SUNTORNSUK, W. (2009). Improved  $\beta$ -carotene production of *Rhodotorula glutinis* in fermented radish brine by continuous cultivation. *Biochemical Engineering Journal*, 43(1), 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.08.005>
- MANDELLI, F., MIRANDA, V. S., RODRIGUES, E., & MERCADANTE, A. Z. (2012). Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced by extremophile microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1781–1790. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0993-y>
- MAOKA, T. (2020). Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*, 74(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01364-x>
- MARTÍN-HERNÁNDEZ, G. C., MÜLLER, B., CHMIELARZ, M., BRANDT, C., HÖLZER, M., VIEHWEGER, A., & PASSOTH, V. (2021). Chromosome-level genome assembly and transcriptome-based annotation of the oleaginous yeast *Rhodotorula toruloides* CBS 14. *Genomics*, 113(6), 4022–4027. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.10.006>
- MAŠÍNOVÁ, T., PONTES, A., CARVALHO, C., SAMPAIO, J. P., & BALDRIAN, P. (2017). *Libkindia masarykiana* gen. et sp. nov., *Yurkovia mendeliana* gen. et sp. nov. and *Leucosporidium krtinense* f.a. sp. nov., isolated from temperate forest soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(4), 902–908. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001707>
- MATA-GÓMEZ, L. C., MONTAÑEZ, J. C., MÉNDEZ-ZAVALA, A., & AGUILAR, C. N. (2014). Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-12>
- MESQUITA, S. DA S., TEIXEIRA, C. M. L. L., & SERVULO, E. F. C. (2017). Carotenoids: Properties, Applications and Market. *Revista Virtual de Química*, 9, 672–688. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170040>
- MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, C. E. e S. (2023, August 2). COMEX STAT. <http://comexstat.mdic.gov.br/pt/home>
- MIRAS, K. (2024). Exploring the costs of phenotypic plasticity for evolvable digital organisms. *Scientific Reports*, 14(1), 108. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-50683-3>
- MORAN, N. A., & JARVIK, T. (2010). Lateral Transfer of Genes from Fungi Underlies Carotenoid Production in Aphids. *Science*, 328(5978), 624–627. <https://doi.org/10.1126/science.1187113>
- MUSSAGY, C. U., RIBEIRO, H. F., SANTOS-EBINUMA, V. C., SCHUUR, B., & PEREIRA, J. F. B. (2022). *Rhodotorula sp.*-based biorefinery: a source of valuable biomolecules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(22), 7431–7447. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12221-5>

MYINT, K. T., OTSUKA, M., OKUBO, A., MITSUHASHI, R., OGURO, A., MAEDA, H., SHIGENO, T., SATO, K., & NAKAJIMA-KAMBE, T. (2020). Isolation and identification of flower yeasts for the development of mixed culture to produce single-cell protein from waste milk. *Bioresource Technology Reports*, 10, 100401. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100401>

NAGARAJ, Y. N., BURKINA, V., OKMANE, L., BLOMQVIST, J., RAPOPORT, A., SANDGREN, M., PICKOVA, J., SAMPELS, S., & PASSOTH, V. (2022). Identification, Quantification and Kinetic Study of Carotenoids and Lipids in *Rhodotorula toruloides* CBS 14 Cultivated on Wheat Straw Hydrolysate. *Fermentation*, 8(7), 300. <https://doi.org/10.3390/fermentation8070300>

NAH, G., JEONG, J. R., LEE, J. H., SOH, S. Y., & NAM, S. Y. (2024). The complete chloroplast genome of *Philodendron hederaceum* (Jacq.) Schott 1829 (Alismatales: Araceae). *Mitochondrial DNA Part B*, 9(2), 262–266. <https://doi.org/10.1080/23802359.2024.2311748>

NAS-IOM. (2001). Dietary reference intakes for vitamin a, vitamin k, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. (National Academic of Science, Ed.). [https://books.google.com.br/books?hl=ptBR&lr=&id=ZhpCNC8jsAgC&oi=fnd&pg=PT23&dq=NASIOM+\(2001\).+Dietary+reference+intakes+for+vitamin+a,+vitamin+k,+arsenic,+boro,+chromium,+copper,+iodine,+iron,+manganese,+molybdenum,+nickel,+silicon,+vanadium,+and+zinc.+WA:+National+Academy+Press92.&ots=pUOl rDfv3Z&sig=TiZgR3gAXOfzGW7DmlUdQTM RKnI&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=ptBR&lr=&id=ZhpCNC8jsAgC&oi=fnd&pg=PT23&dq=NASIOM+(2001).+Dietary+reference+intakes+for+vitamin+a,+vitamin+k,+arsenic,+boro,+chromium,+copper,+iodine,+iron,+manganese,+molybdenum,+nickel,+silicon,+vanadium,+and+zinc.+WA:+National+Academy+Press92.&ots=pUOl rDfv3Z&sig=TiZgR3gAXOfzGW7DmlUdQTM RKnI&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)

NEIDIGH, J. W., DARWANTO, A., WILLIAMS, A. A., WALL, N. R., & SOWERS, L. C. (2009). Cloning and Characterization of *Rhodotorula glutinis* Thymine Hydroxylase. *Chemical Research in Toxicology*, 22(5), 885–893. <https://doi.org/10.1021/tx8004482>

NETO, A. A. P., SANTOS, T. R., DUARTE, E. A. A., DE OLIVEIRA, T. A. S., DE ANDRADE SILVA, E. M., UETANABARO, A. P. T., DA COSTA, A. M., LUZ, E. D. M. N., & LARANJEIRA, D. (2021). Yeasts associated with aerial parts of *Theobroma cacao* L. in southern Bahia, Brazil, as prospective biocontrol agents against *Moniliophthora perniciosa*. *Tropical Plant Pathology*, 46(1), 109–128. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00418-w>

OSMAN, M. E., ABDEL-RAZIK, A. B., ZAKI, K. I., MAMDOUH, N., & EL-SAYED, H. (2022). Isolation, molecular identification of lipid-producing *Rhodotorula diobovata*: optimization of lipid accumulation for biodiesel production. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s43141-022-00304-9>

OTERO, D. M., BULSING, B. A., HUERTA, K. DA M., ROSA, C. A., ZAMBIAZI, R. C., BURKERT, C. A. V., & DE M BURKERT, J. F. (2019). Carotenoid-producing yeasts in the Brazilian biodiversity: isolation, identification and cultivation in agroindustrial waste. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 36(1), 117–129. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20190361s20170433>

PAPAPARASKEVAS, D., CHRISTAKOPOULOS, P., KEKOS, D., & MACRIS, B. J. (1992). Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*. *Biotechnology Letters*, 14(5), 397–402. <https://doi.org/10.1007/BF01021254>

PENG, T., FAKANKUN, I., & LEVIN, D. B. (2021). Accumulation of neutral lipids and carotenoids of *Rhodotorula diobovata* and *Rhodospiridium babjevae* cultivated under nitrogen-limited conditions with glycerol as a sole carbon source. *FEMS Microbiology Letters*, 368(18). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnab126>

PEREIRA, G. V. DE M., SOCCOL, V. T., PANDEY, A., MEDEIROS, A. B. P., LARA, J. M. R. A., GOLLO, A. L., & SOCCOL, C. R. (2014). Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. *International Journal of Food Microbiology*, 188, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.008>

PEREIRA, M. L. DE S. (2021). Diversidade da microbiota da caverna Furna dos Morcegos em área de Caatinga, Pernambuco [UFPE (Universidade Federal de Pernambuco)]. <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/46553>

PHAM, K. D., SHIDA, Y., MIYATA, A., TAKAMIZAWA, T., SUZUKI, Y., ARA, S., YAMAZAKI, H., MASAKI, K., MORI, K., ABURATANI, S., HIRAKAWA, H., TASHIRO, K., KUHARA, S., TAKAKU, H., & OGASAWARA, W. (2020). Effect of light on carotenoid and lipid production in the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 84(7), 1501–1512. <https://doi.org/10.1080/09168451.2020.1740581>

PHUENGJAYAEM, S., KINGKAEW, E., HOONDEE, P., ROJSITTHISAK, P., SRITULARAK, B., THITIKORNPONG, W., THOMPSON, S., PORNPUTTAPONG, N., & TANASUPAWAT, S. (2023). Diversity, astaxanthin production, and genomic analysis of *Rhodotorula paludigena* SP9-15. *Heliyon*, 9(7), e18280. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18280>

PICCININI, F., TESEI, A., ARIENTI, C., & BEVILACQUA, A. (2017). Cell Counting and Viability Assessment of 2D and 3D Cell Cultures: Expected Reliability of the Trypan Blue Assay. *Biological Procedures Online*, 19(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s12575-017-0056-3>

QIN, L., LIU, L., ZENG, A.-P., & WEI, D. (2017). From low-cost substrates to Single Cell Oils synthesized by oleaginous yeasts. *Bioresource Technology*, 245, 1507–1519. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.163>

RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M., USMAN, L. M., SILVA-BEDOYA, L. M., & OSORIOCADAVID, E. (2019). Dominant yeasts associated to mango (*Mangifera indica*) and rose apple (*Syzygium malaccense*) fruit pulps investigated by culture-based methods. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 91(4). <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920190052>

RATLEDGE, C., & WYNN, J. P. (2002). The Biochemistry and Molecular Biology of Lipid Accumulation in Oleaginous Microorganisms (pp. 1–52). [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(02\)51000-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(02)51000-5)

RISS, T., NILES, A., MORAVEC, R., KARASSINA, N., & VIDUGIRIENE, J. (2004). Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540958/pdf/Bookshelf\\_NBK540958.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540958/pdf/Bookshelf_NBK540958.pdf)

RODRÍGUEZ, C.L.; STRUB, C.; FONTANA, A.; VERHEECKE-VAESSEN, C.; DURAND, N.; BEUGRÉ, C.; GUEHI, T.; MEDINA, A.; SCHORR-GALINDO, S. Biocontrol activities of

yeasts or lactic acid bacteria isolated from *Robusta coffee* against *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production in vitro, International Journal of Food Microbiology, Volume 415, 2024, 110638, ISSN 0168-1605, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110638>

SAENGE, C., CHEIRSILP, B., SUKSAROG, T. T., & BOURTOOM, T. (2011). Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. Process Biochemistry, 46(1), 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.009>

SALVADORI, M. R., ANDO, R. A., NASCIMENTO, C. A. O., & CORRÊA, B. (2017). Dead biomass of Amazon yeast: A new insight into bioremediation and recovery of silver by intracellular synthesis of nanoparticles. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 52(11), 1112–1120. <https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1340754>

SALVADORI, M. R., ANDO, R. A., OLLER DO NASCIMENTO, C. A., & CORRÊA, B. (2014). Intracellular biosynthesis and removal of copper nanoparticles by dead biomass of yeast isolated from the wastewater of a mine in the Brazilian Amazonia. PLoS ONE, 9(1), e87968. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087968>

SAMPAIO, J. P. (2011). *Rhodotorula*. In The Yeasts (pp. 1873–1927). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00155-5>

SCHIEBER, A., & WEBER, F. (2016). Carotenoids. In Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages (pp. 101–123). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100371-8.00005-1>

SERETI, F., ALEXANDRI, M., PAPADAKI, A., PAPAPOSTOULOU, H., & KOPSAHELIS, N. (2024). Natural lycopene and  $\beta$ -carotene synthesis by *Rhodospiridium kratochvilovae* yeasts: Sustainable production, chemical characterization and antioxidative properties. Food Bioscience, 57, 103425. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103425>

SERETI, F., PAPADAKI, A., ALEXANDRI, M., KACHRIMANIDOU, V., & KOPSAHELIS, N. (2023). Exploring the potential of novel *R. kratochvilovae* red yeasts towards the sustainable synthesis of natural carotenoids. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 31, 100927. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100927>

SILVA, R. C., LIMA, A., & SOUZA, L. C. DA S. (2022). Principais métodos de sequenciamento de DNA. Scientific Electronic Archives, 15(10). <https://doi.org/10.36560/15820221603>

SINGH, T., PANDEY, V. K., DASH, K. K., ZANWAR, S., & SINGH, R. (2023). Natural biocolorant and pigments: Sources and applications in food processing. Journal of Agriculture and Food Research, 12, 100628. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100628>

SQUINA, F. M., & MERCADANTE, A. Z. (2003). Análise, por CLAE, de carotenoides de cinco linhagens de *Rhodotorula*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 39(3). <https://doi.org/10.1590/S1516-93322003000300010>

SRIPHUTTHA, C., LIMKUL, S., PONGSETKUL, J., PHIWTHONG, T., MASSU, A., SUMNIANGYEN, N., BOONTAWAN, P., KETUDAT-CAIRNS, M., BOONTAWAN, A., & BOONCHUEN, P. (2023). Effect of fed dietary yeast (*Rhodotorula paludigena* CM33) on

shrimp growth, gene expression, intestinal microbial, disease resistance, and meat composition of *Litopenaeus vannamei*. *Developmental & Comparative Immunology*, 147, 104896. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2023.104896>

SRISUK, N., NUTARATAT, P., SURUSSAWADEE, J., & LIMTONG, S. (2019). Yeast Communities in Sugarcane Phylloplane. *Microbiology*, 88(3), 353–369. <https://doi.org/10.1134/S0026261719030135>

STROBER, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*, 111(1). <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>

TAMIELLO, C. S., ADAMI, E. R., DE OLIVEIRA, N. M. T., ACCO, A., IACOMINI, M., & CORDEIRO, L. M. C. (2018). Structural features of polysaccharides from edible jambo (*Syzygium jambos*) fruits and antitumor activity of extracted pectins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 1414–1421. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.164>

TANG, W., WANG, Y., ZHANG, J., CAI, Y., & HE, Z. (2019). Biosynthetic Pathway of Carotenoids in *Rhodotorula* and Strategies for Enhanced Their Production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(4), 507–517. <https://doi.org/10.4014/jmb.1801.01022>

TASKIN, E., & DURSUN, N. (2012). The Protection of Selenium on Adriamycin-Induced Mitochondrial Damage in Rat. *Biological Trace Element Research*, 147(1–3), 165–171. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-9273-9>

TASKIN, M., SISMAN, T., ERDAL, S., & KURBANOGU, E. B. (2011). Use of waste chicken feathers as peptone for production of carotenoids in submerged culture of *Rhodotorula glutinis* MT-5. *European Food Research and Technology*, 233(4), 657–665. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1561-2>

TATSCH, P. O. (2008). Produção de Carotenoides em meio sintético por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS2636 em biorreator [Dissertação, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões]. [https://www.uricer.edu.br/cursos/arq\\_trabalhos\\_usuario/579.pdf](https://www.uricer.edu.br/cursos/arq_trabalhos_usuario/579.pdf)

THUMKASEM, N., ON-MEE, T., CHITTAPUN, S., PORNPUKDEEWATTANA, S., KETUDAT-CAIRNS, M., THONGPRAJUKAEW, K., ANTIMANON, S., & CHAROENRAT, T. (2023). *Rhodotorula paludigena* CM33 cultivation process development for high  $\beta$ -carotene single cell protein production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 54, 102926. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102926>

TRUJILLO, L. C., & ECHEVERRY HERNÁNDEZ, S. (2015). Aislamiento y caracterización de levaduras presentes en el fruto del *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & L.M Perry (pomorroso) en la comuna 1 de la ciudad de Neiva- Huila. *Ingeniería y Región*, 13(1), 37. <https://doi.org/10.25054/22161325.707>

ULUDAG ALTUN, H., MERAL, T., TURK ARIBAS, E., GORPELIOGLU, C., & KARABICAK, N. (2014). A Case of Onychomycosis Caused by *Rhodotorula glutinis*. *Case Reports in Dermatological Medicine*, 2014, 1–4. <https://doi.org/10.1155/2014/563261>

VALDUGA, E., VALÉRIO, A., TREICHEL, H., LUCCIO, M. DI, JACQUES, R. A., & FÚRIGO JÚNIOR, A. (2007). Pré-tratamentos de melão de cana-de-açúcar e água de

maceração de milho para a bioprodução de carotenoides. *Química Nova*, 30(8), 1860–1866. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000800012>

VALENTE P., BOEKHOUT T., LANDELL M. F., CRESTANI J., PAGNOCCA F.C., SETTE L. D., PASSARINI M. R., ROSA C. A., BRANDÃO L. R., PIMENTA R. S., RIBEIRO J. R., GARCIA K. M., LEE C. F., SUH S. O., PÉTER G., DLAUCHY D., FELL J. W., SCORZETTI G., THEELEN B., VAINSTEIN M. H. *Bandoniozyma* gen. nov., a genus of fermentative and non-fermentative tremellaceous yeast species. *PLoS One*. 2012;7(10): e46060. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046060> . Epub 2012 Oct 9. PMID: 23056233; PMCID: PMC3467267.

VIDAL-VERDÚ, À., LATORRE-PÉREZ, A., MOLINA-MENOR, E., BAIXERAS, J., PERETÓ, J., & PORCAR, M. (2022). Living in a bottle: Bacteria from sediment-associated Mediterranean waste and potential growth on polyethylene terephthalate. *Microbiology Open*, 11(1). <https://doi.org/10.1002/mbo3.1259>

VILA, M., COUSO, I., & LEÓN, R. (2008). Carotenoid content in mutants of the chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* with low expression levels of phytoene desaturase. *Process Biochemistry*, 43(10), 1147–1152. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.06.014>

VITAL, M. J. S., ABRANCHES, J., HAGLER, A. N., & MENDONÇA-HAGLER, L. C. (2002). Mycocinogenic yeasts isolated from Amazon soils of the Maracá Ecological Station, Roraima-Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33(3), 230–235. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822002000300008>

WANG, M., MAO, W., WANG, X., LI, F., WANG, J., CHI, Z., CHI, Z., & LIU, G. (2019). Efficient simultaneous production of extracellular polyol esters of fatty acids and intracellular lipids from inulin by a deep-sea yeast *Rhodotorula paludigena* P4R5. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 149. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1200-3>

WANG, Q.-M., & BAI, F.-Y. (2008). Molecular phylogeny of basidiomycetous yeasts in the *Cryptococcus luteolus* lineage (Tremellales) based on nuclear rRNA and mitochondrial cytochrome b gene sequence analyses: proposal of *Derxomyces* gen. nov. and *Hannaella* gen. nov., and description of eight novel *Derxomyces* species. *FEMS Yeast Research*, 8(5), 799–814. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00403.x>

WANG, Q.-M., YURKOV, A. M., GÖKER, M., LUMBSCH, H. T., LEAVITT, S. D., GROENEWALD, M., THEELEN, B., LIU, X.-Z., BOEKHOUT, T., & BAI, F.-Y. (2015). Phylogenetic classification of yeasts and related taxa within Pucciniomycotina. *Studies in Mycology*, 81(1), 149–189. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.12.002>

WANG, X.-W., MAY, T. W., LIU, S.-L., & ZHOU, L.-W. (2021). Towards a Natural Classification of Hyphodontia Sensu Lato and the Trait Evolution of Basidiocarps within Hymenochaetales (Basidiomycota). *Journal of Fungi*, 7(6), 478. <https://doi.org/10.3390/jof7060478>

WATCHARAWIPAS, A., & RUNGUPHAN, W. (2023). Red yeasts and their carotenogenic enzymes for microbial carotenoid production. *FEMS Yeast Research*, 23, 1–17. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foac063>

- XUE, S.-J., LI, X.-C., LIU, J., ZHANG, X.-T., XIN, Z.-Z., JIANG, W.-W., & ZHANG, J.-Y. (2024). Efficient sugar utilization and high tolerance to inhibitors enable *Rhodotorula toruloides* C23 to robustly produce lipid and carotenoid from lignocellulosic feedstock. *Bioresource Technology*, 407, 131146. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.131146>
- YANG, S.-P., WU, Z.-H., & JIAN, J.-C. (2011). Distribution of Marine Red Yeasts in Shrimps and the Environments of Shrimp Culture. *Current Microbiology*, 62(5), 1638–1642. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9910-8>
- YURCHENKO, E., RIEBESEHL, J., & LANGER, E. (2017). Clarification of *Lyomyces sambuci* complex with the descriptions of four new species. *Mycological Progress*, 16(9), 865–876. <https://doi.org/10.1007/s11557-017-1321-1>
- ZENI, J., COLET, R., CENCE, K., TIGGEMANN, L., TONIAZZO, G., CANSIAN, R. L., DI LUCCIO, M., OLIVEIRA, D., & VALDUGA, E. (2011). Screening of microorganisms for production of carotenoids/Selección de microorganismos para la producción de carotenoides. *CyTA - Journal of Food*, 9(2), 160–166. <https://doi.org/10.1080/19476337.2010.499570>
- ZHANG, C., CHEN, X., & TOO, H.-P. (2020). Microbial astaxanthin biosynthesis: recent achievements, challenges, and commercialization outlook. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(13), 5725–5737. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10648-2>
- ZHANG, Z., ZHANG, X., & TAN, T. (2014). Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* under irradiation/high-temperature and dark/low-temperature cultivation. *Bioresource Technology*, 157, 149–153. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.039>
- ZHAO, Y., GUO, L., XIA, Y., ZHUANG, X., & CHU, W. (2019). Isolation, Identification of Carotenoid-Producing *Rhodotorula sp.* from Marine Environment and Optimization<sup>13</sup> for Carotenoid Production. *Marine Drugs*, 17(3), 161. <https://doi.org/10.3390/md17030161>