

**JACQUELINE HENRIQUE SOARES DA SILVA**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE CAROTENOIDES DE  
*RHODOTORULA MUCILAGINOSA* PARA APLICAÇÃO  
COSMÉTICA**



**Monografia apresentado ao  
Instituto de Microbiologia Paulo de  
Góes, da Universidade Federal do Rio de  
Janeiro, como pré-requisito para a  
obtenção do grau de Bacharel em  
Ciências Biológicas: Microbiologia e  
Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO | RJ**

**JULHO/2023**

**Trabalho realizado no Laboratório  
Bioinnovar, do Instituto de Microbiologia  
Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do(a)  
Professor(a) Alane Beatriz Vermelho  
coorientação de João Vítor Barreto**

**FICHA CATALOGRÁFICA**

## CIP - Catalogação na Publicação

S586i Silva, Jacqueline Henrique Soares da  
Isolamento e identificação de carotenoides de  
Rhodotorula mucilaginosa para aplicação cosmética /  
Jacqueline Henrique Soares da Silva. -- Rio de  
Janeiro, 2023.  
58 f.

Orientadora: Alane Beatriz Vermelho.  
Coorientador: João Vitor Barreto.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto  
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia, 2023.

1. Pigmento microbiano. 2. Rhodotorula  
mucilaginosa. 3. Carotenoides. 4. Esmaltes. I.  
Vermelho, Alane Beatriz, orient. II. Barreto, João  
Vitor, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

### INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

#### ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

ALUNO: **Jacqueline Henrique Soares da Silva**  
DRE: 119021137

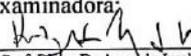
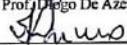
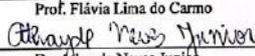
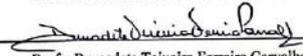
BANCA EXAMINADORA: Prof. Diogo De Azevedo Jurelevicius (Presidente)  
Prof. Flávia Lima do Carmo  
Dr. Athayde Neves Junior  
Profa. Karla Rodrigues Miranda (Suplente)

Título da Monografia: **“Isolamento e identificação de carotenoides de  
*Rhodotorula mucilaginosa* para aplicação cosmética”**

Local: **Sala Vermelha da Pós-graduação / IMPG / CCS / UFRJ**  
Data e hora de início: **13 de julho de 2023 às 10:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 13 de julho de 2023.

NOTA	Banca Examinadora:
<u>10,0</u>	 Prof. Diogo De Azevedo Jurelevicius
<u>10,0</u>	 Prof. Flávia Lima do Carmo
<u>10,0</u>	 Dr. Athayde Neves Junior
	 Profa. Karla Rodrigues Miranda
Aluno:	 Jacqueline Henrique Soares da Silva
Orientador:	 Prof. Alane Beatriz Vermelho Coorientador: M.Sc. João Vitor Barreto
Coordenador de TCC	 Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Dedico este trabalho a minha mãe Sandra  
Damiana da Silva, que sempre apoiou e  
incentivou os meus estudos.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar sou grata a Deus, por estar presente a cada momento da minha vida. Ele me amou primeiro, é por meio dEle e para Ele que vivo. Ele me sustentou, me deu conhecimento e sabedoria para viver cada momento dentro da UFRJ, renovando minhas forças ao longo desses anos de graduação. A Ele toda honra, glória e louvor.

Agradeço a minha mãe Sandra, uma mulher incrível e forte, que é mãe e pai para mim desde os 5 anos de idade. Ela nunca mediu esforços para me ver feliz e com todas as minhas necessidades supridas, me dando muito mais do que é necessário. Obrigada por me ensinar e educar, não somente com palavras, mas também por meio da sua vida. Obrigada por me amar incondicionalmente, sempre me apoiar e estar ao meu lado. Tenho certeza que meu pai estaria todo bobo e feliz com essa conquista, mas ela não é só minha, é sua também mãe, porque sem você nada disso seria possível. Palavras não são capazes de medir o amor que sinto por você, nem todos os meus dias nessa terra serão suficientes para expressar o quanto eu te amo, mas enquanto eu viver farei tudo o quanto for possível para te mostrar.

Ao meu irmão Guilherme! Um homem reto e de caráter ao qual eu tenho orgulho de chamar de irmão. Obrigada por todo cuidado e amor que tem por mim, o meu papai 2, super Guile, sempre será uma referência para mim! Te amo maninho! Agradeço também à toda minha família, pelo amor e carinho.

Agradeço também a todos os meus amigos e irmãos que a vida me deu. A presença de vocês ao meu lado ao longo desses anos tornou tudo mais leve, Deus sabe como sou grata por tê-los! Agradeço em especial a Yasmin, Esther e Gabriel Krull, por sempre ouvirem minhas reclamações, choros e alegrias. Obrigada por cada abraço, risada, zueira, sem isso eu não teria chegado até aqui. Agora uma nova porta se abre! Entro sem medo nessa nova trajetória, pois sei que tenho as pessoas certas ao meu lado, seja em momentos como esse de celebração, como também nos dias de luta, amo vocês!

Sou grata pelas amigas que a Micro me deu, nunca passou pela minha cabeça fazer parte de um grupo de mulheres tão incríveis durante a graduação. O nosso Grupo Secreto foi suporte, risada, porto seguro, central de reclamação, dúvidas e revisões ao longo desses 4 anos. Ter pessoas ao qual a gente pode contar, vivendo na pele cada luta, prova e dificuldade, fez toda a diferença, obrigada Carol, Lídia, Bia, Vitória, Isa, Raquel e Nath por serem essas pessoas. Amo vocês!

Agradeço ao Laboratório de Bioinovar, especialmente à Prof.<sup>a</sup> Alane Beatriz Vermelho por me orientar desde os estágios até a minha monografia. Professora, obrigada por todas as oportunidades que me concedeu dentro do laboratório, seja na pesquisa científica, como na extensão Ciência com Micróbios, que agregou muito a minha formação! Obrigada por não medir esforços para sempre entregar o melhor para os seus alunos do laboratório.

Sou grata ao meu coorientador João Vitor Barreto, que além de ser coorientar, se tornou um grande amigo e parceiro de vida, eu tenho grande admiração por você! Obrigada por tornar a pesquisa científica mais leve e sempre estar ao meu lado, seja para questões da universidade como também para vida! Sem você eu não sei como teria chegado até aqui, obrigada por todos incentivos e por acreditar em mim e no meu potencial. Amo você!

Sou grata a todos amigos e colegas do Laboratório Bioinovar, por serem ser solícitos para ajudar, explicar e tonarem as manhãs e tardes de experimentos no laboratório mais felizes. Em especial desejo agradecer a Lívia e Verônica, por colaborarem com meus experimentos e por terem paciente comigo em meio a todas as perguntas e interpretação de resultados. Tem muitas pessoas que me acompanharam ao longo desses anos de laboratório, mas gostaria de destacar a Camilla, minha parceira de laboratório, muito além de uma relação de ICs, nos tornamos amigas nessa caminha, amo você!

Por fim, agradeço ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes e a todos seus funcionários. Obrigada pela imensa contribuição para minha formação acadêmica e profissional. Agradeço também aos professores desta banca, que aceitaram a fazer parte deste momento tão especial na graduação! Obrigada pela disponibilidade de contribuir com essa pesquisa e com a minha formação acadêmica!

## RESUMO

**JACQUELINE HENRIQUE SOARES DA SILVA**

### **ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE CAROTENOIDES DE *RHODOTORULA MUCILAGINOSA* PARA APLICAÇÃO COSMÉTICA**

**Orientador: Alane Beatriz Vermelho**

**Coorientador: João Vitor Barreto**

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O mercado de cosméticos tem se direcionado para produtos que sejam sustentáveis e ecologicamente corretos. Nesse contexto, os produtos de origem microbiana, atendem a essa demanda. Existe uma grande variedade de microrganismos capazes de sintetizar pigmentos com alto potencial biotecnológico, que podem ser aplicados em diferentes setores industriais, como farmacêutico, alimentício e cosmético. Levando em consideração sua cor laranja característica, a levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, presente na coleção de microrganismos do laboratório Bioinovar, foi selecionada com o objetivo de se obter, identificar e aplicar seus pigmentos na formulação de esmalte para unhas. O cultivo da levedura ocorreu em condições específicas para chegar fase estacionária da curva crescimento, onde ocorre a maior produção de carotenoides. A extração dos pigmentos foi realizada empregando diferentes solventes na proporção de 1:10 entre a biomassa seca e os solventes utilizados, as quais foram dimetilsulfóxido (DMSO), acetona, éter de petróleo e NaCl (20%), sendo a fase superior que contém os pigmentos solubilizados em éter de petróleo evaporada para as análises subsequentes. A identificação e quantificação dos carotenoides totais foram realizados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, identificando três pigmentos majoritários: torularrodina, toruleno e  $\beta$ -caroteno, respectivamente. A levedura demonstrou a capacidade de produzir 878,48  $\mu\text{g/g}$  de carotenoides totais em 96 horas de fermentação. Os carotenoides produzidos pela levedura foram testados quanto à sua citotoxicidade, a fim de avaliar a viabilidade celular de fibroblastos e queratinócitos humanos quando expostos a diferentes concentrações do pigmento. Como resultado, os carotenoides da levedura, mostraram-se seguros para serem aplicados na coloração de esmaltes de unha. O esmalte protótipo foi preparado solubilizando o pigmento da levedura em óleo de banana e, em seguida, misturado a um esmalte branco em diferentes proporções. Os resultados demonstraram uma boa incorporação do pigmento no esmalte neste protótipo, sendo necessário estudos posteriores para formulações mais adequadas. Esta pesquisa contribui para o desenvolvimento de produtos cosméticos mais sustentáveis e inovadores, atendendo às

demandas do mercado por ingredientes ecologicamente corretos, sendo uma alternativa aos pigmentos tradicionais utilizados na indústria.

Palavras-chave: Pigmento microbiano; *Rhodotorula mucilaginosa*; Carotenoides; Esmaltes

**ABSTRACT****JACQUELINE HENRIQUE SOARES DA SILVA****ISOLATION AND IDENTIFICATION OF CAROTENOIDS FROM  
*RHODOTORULA MUCILAGINOSA* FOR COSMETIC APPLICATION****Orientador: Alane Beatriz Vermelho****Coorientador: João Vitor Barreto**

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

The cosmetics market has been moving towards sustainable and environmentally friendly products. In this context, products of microbial origin meet this demand. There is a wide variety of microorganisms capable of synthesizing pigments with high biotechnological potential, which can be applied in different industrial sectors, such as pharmaceutical, food, and cosmetic industries. Considering its characteristic orange color, the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*, found in the collection of microorganisms at the Bioinnovar laboratory, was selected with the aim of obtaining, identifying, and applying its pigments in nail polish formulations. The yeast cultivation was carried out under specific conditions to reach the stationary phase of the growth curve, where the highest production of carotenoids occurs. Pigment extraction was performed using different solvents in a ratio of 1:10 between the dry biomass and the solvents used, which included dimethyl sulfoxide (DMSO), acetone, petroleum ether, and NaCl (20%). The upper phase containing the solubilized pigments in petroleum ether was evaporated for subsequent analyses. Identification and quantification of total carotenoids were carried out using high-performance liquid chromatography, identifying three major pigments: torulorhodin, torulene, and  $\beta$ -carotene, respectively. The yeast demonstrated the ability to produce 878.48  $\mu\text{g/g}$  of total carotenoids in 96 hours of fermentation. Carotenoids produced by the yeast were tested for their

cytotoxicity to evaluate the cell viability of human fibroblasts and keratinocytes when exposed to different concentrations of the pigment. The results showed that the yeast carotenoids were safe for use in nail polish coloring. The prototype nail polish was prepared by solubilizing the yeast pigment in banana oil and then mixing it with white nail polish in different proportions. The results demonstrated a good incorporation of the pigment in the nail polish in this prototype, requiring further studies for more suitable formulations. This research contributes to the development of more sustainable and innovative cosmetic products, meeting the market demands for environmentally friendly ingredients and providing an alternative to traditional pigments used in the industry.

Key-words: Microbial pigment; *Rhodotorula mucilaginosa*; Carotenoids; Nail polishes.

## RESUMO PARA LEIGOS

JACQUELINE HENRIQUE SOARES DA SILVA

### ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE CAROTENOIDES DE *RHODOTORULA MUCILAGINOSA* PARA APLICAÇÃO COSMÉTICA

**Orientador: Alane Beatriz Vermelho**

**Coorientador: João Vitor Barreto**

Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Os consumidores de cosméticos estão cada vez mais buscando produtos que sejam orgânicos, sustentáveis e ecologicamente corretos. Nesse contexto, os produtos de origem biológica, como produzidos por insetos e microrganismos, ganham destaque por atenderem a essa demanda e agregarem valor aos produtos finais. Entre os microrganismos, existem aqueles que possuem coloração, pois são capazes de produzir pigmentos naturais que possuem alto potencial biotecnológico, podendo ser utilizados em diferentes indústrias, como a farmacêutica, alimentícia e cosmética. Um exemplo é a levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, conhecida por sua cor laranja característica. Devido a isso, essa levedura foi selecionada com o objetivo de extrair, identificar e utilizar seus pigmentos na formulação de esmaltes para unhas. Vale ressaltar que esses pigmentos estão localizados dentro das células da levedura, sendo necessário promover o crescimento das células para, posteriormente, rompê-las e obter o pigmento desejado. O crescimento da levedura foi realizado em condições específicas de nutrientes, temperatura e agitação, com a produção mais alta de carotenoides observada após 96 horas. Os pigmentos foram extraídos e posteriormente identificados. Testes realizados demonstraram que os pigmentos são seguros para serem utilizados em esmaltes de unha, não apresentando toxicidade para células humanas. O extrato de pigmentos totais foram incorporados aos

esmaltes em diferentes proporções, sendo selecionado aquele que manteve as características de um esmalte convencional, como tempo de secagem e brilho. Essa pesquisa tem implicações significativas, contribuindo para o desenvolvimento de produtos cosméticos mais sustentáveis e inovadores ao utilizar pigmentos naturais da levedura *Rhodotorula mucilaginosa*. Isso reduz a dependência de pigmentos sintéticos e químicos, que frequentemente causam impactos negativos no meio ambiente e na saúde humana. Sendo assim, esse trabalho oferece uma alternativa sustentável e promove uma mudança positiva na indústria cosmética. Novas formulações precisam, posteriormente, ser realizadas com o objetivo de obter uma formulação cosmética mais avançada.

## ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	Aplicação de pigmentos microbianos na indústria.....	1
1.2	Carotenoides .....	5
1.2.1	Produção de carotenoides por fungos.....	6
1.3.	Pigmentos de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> .....	8
1.3.1.	$\beta$ -caroteno.....	10
1.3.2.	Toruleno e torularodina.....	10
1.4.	Cosméticos.....	11
1.4.1	Esmaltes .....	13
2.	JUSTIFICATIVA.....	14
3.	OBJETIVO.....	15
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1.	Obtenção dos microrganismos .....	16
4.2	Identificação do microrganismo por MALDI-TOF ( <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i> ).....	16
4.3.	Cultivo.....	16
4.4.	Curva de crescimento .....	17
4.5.	Extração dos carotenoides .....	17
4.6.	Identificação do pigmento e quantificação de carotenoides totais e majoritários .....	18
4.7.	Teste de citotoxicidade.....	18
4.8.	Formulação de esmalte com os pigmentos de <i>R.mucilaginosa</i> .....	19
4.8.1.	Teste de clareza .....	19
4.8.2.	Teste de brilho .....	20
4.8.3.	Teste tempo de secagem.....	20
4.8.4.	Teste de resistência a água .....	20
4.8.5.	Teste de aspecto .....	20
5.	RESULTADOS .....	21

5.1 Identificação do microrganismo por MALDI-TOF ( <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i> ).....	21
5.2 Curva de crescimento .....	21
5.3 Extração dos carotenoides .....	22
5.4 Identificação do pigmento e quantificação de carotenoides totais e majoritários .....	23
5.5 Teste de citotoxicidade .....	26
5.6 Coloração do esmalte.....	27
5.6.1 Teste de clareza.....	28
5.6.2 Teste de brilho .....	29
5.6.3 Teste de tempo de secagem .....	30
5.6.4 Teste de resistência a água .....	31
5.6.5 Teste de aspecto .....	31
6. DISCUSSÃO.....	33
7. CONCLUSÃO .....	37
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	38

## 1. INTRODUÇÃO

As cores em objetos, tecidos, alimentos e cosméticos trazem vida aos olhos humanos. Devido a isso, na avaliação do consumidor sobre um produto, a coloração tem influência sendo um dos aspectos focados pelo marketing do produto para influenciar a compra pelo consumidor (Ashokkumar et al. 2022).

Os pigmentos são substâncias que conferem cor quando aplicados a um material, sendo capazes de absorver e refletir a luz na faixa de comprimento de onda de 400 – 700 nm, expressando assim uma cor (Lopes e Ligabue-Braun 2021). Os pigmentos podem ser hidrofóbicos e hidrofílicos. Os pigmentos hidrofóbicos, são praticamente insolúveis em água, entretanto são solúveis em outros compostos hidrofóbicos, como óleos e solventes orgânicos. Pigmentos solúveis em água, pigmentos hidrofílicos ou corantes são extraídos e concentrados usando água ou álcoois inferiores (Solehin et al. 2020).

### 1.1. Aplicação de pigmentos microbianos na indústria

O uso de pigmento pelos humanos não se detém aos dias atuais, já que desde o período paleolítico e das antigas civilizações já se fazia o seu uso para dar cor aos alimentos e tecidos, pintar, maquiagem, entre outras aplicabilidades (Lyu et al. 2022).

Na indústria, corantes e pigmentos sintéticos são usados para dar cor ao produto produzido. O custo destes pigmentos é mais baixo do que os pigmentos naturais (Sen, Barrow e Deshmukh, 2019). Em adição, os pigmentos sintéticos podem ser produzidos em larga escala, o que é importante para atender a alta demanda do mercado (Pailliè-Jiménez, Stincone e Brandelli, 2020).

Entretanto, os pigmentos sintéticos podem ocasionar problemas toxicológicos como carcinogenicidade e genotoxicidade (Ramesh et al. 2019). Além de não serem renováveis e biodegradáveis, trazem prejuízos ao meio ambiente, como o descarte inadequado de pigmentos em rios e mares provindos da indústria têxtil, afetando a qualidade da água, penetração de luz e conseqüentemente a vida aquática (Zerin et al. 2019). Somando-se a esse cenário, a demanda no mercado por pigmentos ecologicamente corretos e de origem natural tem crescido gradualmente, devido a busca por produtos saudáveis e sustentáveis pelos consumidores (Lyu et al. 2022).

Os pigmentos naturais são biodegradáveis e podem ser produzidos por diferentes fontes biológicas como plantas, insetos e microrganismos. Devido à grande diversidade de cores e estruturas químicas, os pigmentos de microrganismos tem se destacado. Estes pigmentos estão relacionados a adaptação do organismo ao ambiente, fotossíntese, estresse oxidativo, defesa, entre outras funções (Martins et al. 2014; Ramesh et al. 2019). Além de poder ser aplicado para dar cor à alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos, os pigmentos de origem biológica também possuem propriedades bioativas, adicionando potenciais benefícios medicinais ao produto final (Bhosale, Waghmode e Patil, 2022).

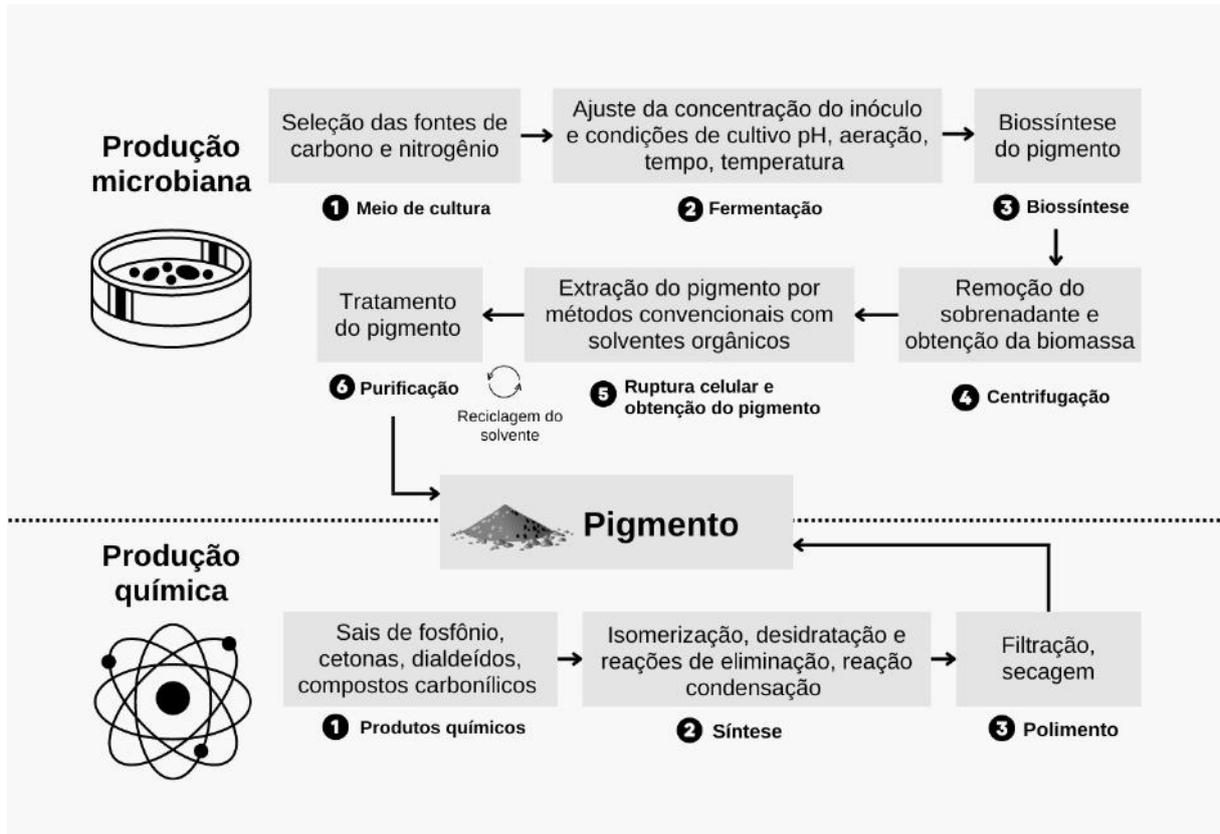
No campo da microbiologia existe uma grande diversidade de microrganismos com formas e cores diferentes, tornando cada microrganismo singular. Os pigmentos microbianos são metabólitos secundários, ou seja, para sua produção e otimização é necessário levar em consideração fatores como fontes de carbono e nitrogênio, pH, temperatura, aeração e agitação (Aman Mohammadi et al. 2022; Bhosale, Waghmode e Patil, 2022). Eles podem ser encontrados em bactérias, fungos, leveduras e algas, podendo ser carotenoides, melaninas, flavinas, quininas, monascinas, violaceína, entre outros. Além de sua aplicação como agente colorante na indústria, os pigmentos microbianos também possuem ação anticâncer, antioxidante, antimicrobiana entre outras, como poder ser observado na **tabela 1**.

**Tabela 1.** Microrganismos produtores de pigmentos e suas bioatividades adaptado de (Sen et al. 2019)

Pigmento	Cor	Microrganismo	Reino	Atividade	Referência
Astaxantina	Rosa-vermelho	<i>Agrobacterium auranticaum</i>	Bactéria	Antioxidante, fotoprotetor, anticâncer, anti-inflamatório	(Yokoyama and Miki 1995)
Cantaxantina	Laranja	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	Bactéria	Antioxidante, anticâncer	(Lorquin et al. 1997; Chew et al. 1999)
Prodigiosina	Vermelho	<i>Serratia marcescens</i>	Bactéria	Anticâncer, imunossupressor	(Deorukhkar et al. 2007)
Violaceína	Roxo	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Bactéria	Antioxidante, desintoxicar ROS	(Durán et al. 2012)
Ancaflavina	Amarelo	<i>Monascus</i> spp.	Fungo	Antitumoral, Anti-inflamatório	(Hsu et al. 2011)
Cantaxantina	Laranja, rosa	<i>Monascus roseus</i>	Fungo	Antioxidante, anticâncer	(Cooney et al. 1966; Chew et al. 1999)
Licopeno	Vermelho	<i>Fusarium Sporotrichioides*</i> , <i>Blakeslea trispora*</i>	Fungo	Antioxidante, anticâncer	(Giovannucci et al. 2002)
$\beta$ -caroteno	Laranja	<i>Blakeslea trispora*</i> , <i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>Rhodotorula</i> spp.	Fungo	Anticâncer, antioxidante	(Stahl e Sies 2005; Mannazzu et al. 2015)
Astaxantina	Vermelho, Rosa-vermelho	<i>Phaffia rhodozyma</i>	Fungo	Antioxidante, fotoprotetor, anticancerígeno, anti-inflamatório	(Ramírez et al. 2000)
Toruladorina e toruleno	Vermelho-alaranjado	<i>Rhodotorula</i> spp.	Fungo	Antioxidante, antimicrobiano	(Kot et al. 2018)
Astaxantina	Vermelho	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Microalga	Antioxidante, fotoprotetor, anticancerígeno, anti-inflamatório	(Dufossé et al. 2005)
$\beta$ -caroteno	Laranja	<i>Dunaliella salina</i>	Microalga	Anticâncer, antioxidante	(Dufossé et al. 2005)
Luteína	Amarelo	<i>Chlorella e outras microalgas</i>	Microalga	Antioxidante	(Dufossé et al. 2005; Chen et al. 2016)

Os pigmentos sintéticos, possuem menos etapas de síntese quando comparado a produção pelos microrganismos, como observado na **figura 1**. Todavia, as pesquisas para aplicação de pigmentos microbianos na indústria é crescente, baseada na demanda por substituição dos pigmentos sintéticos por naturais (Tuli et al. 2015; Sen, Barrow e Deshmukh, 2019; Venil, Dufossé e Renuka, 2020). Porém, antes dos pigmentos microbianos serem utilizados na indústria, alguns requisitos como: o microrganismo deve ter crescimento rápido, alta produção de pigmento em um curto período de tempo, não ser patogênico e, preferencialmente, suportar temperaturas e pH variáveis (Ramesh et al., 2019, Lopes e Ligabue-Braun 2021).

Apesar das implicações relatadas anteriormente a produção de pigmentos microbianos ainda é vantajosa. Podem ser produzidos em condições físico-químicas controladas em biorreatores, com alta reprodutibilidade, ocupando espaços pequenos na produção e sem competir com terras aráveis, não dependendo de condições climáticas e sazonais, ao contrário das plantas. Além disto, com ao avanço de técnicas moleculares integradas com as ciências ômicas, é possível realizar bioprospecções de forma dinâmica e aumentar a produção com uso de biologia sintética. A otimização da produção do pigmento pode ser feita aprimorando as condições de cultivo (pH, aeração, temperatura, agitação); estratégias de fermentação podem ser aplicadas para escalonar a produção; é possível utilizar meios de cultivo à base de subprodutos e resíduos agroindustriais, barateando a produção (Mazotto et al. 2013; Tuli et al. 2015; Nawaz et al. 2021; Aman Mohammadi et al. 2022).



**Figura 1.** Esquema representativo da produção de carotenoides microbianos e sintéticos (adaptado de Mussagy et al. 2022)

## 1.2 Carotenoides

Os carotenoides são uma família de pigmentos isoprenóides lipofílicos, sendo mais de 1.100 carotenoides descritos com diferentes estruturas, assim como funções biológicas (Yabuzaki, 2017). Eles são produzidos por plantas e microrganismos, como bactérias (por exemplo, *Corynebacterium michiganens* e *Micrococcus roseus*), fungos como o *Blakeslea trispora*, *Rhodotorula* spp e microalgas como o gênero *Chlorella* e *Dunaliella* (Saini e Keum, 2019; Lyu et al. 2022). Os carotenoides apresentam cores como amarelo, alaranjado, vermelho e podem ser classificados, principalmente, em dois subgrupos: hidrocarbonetos-carotenos (por exemplo,  $\beta$ -caroteno) e xantofilas que apresentam como diferença a presença de oxigênio em sua estrutura como, a astaxantina (Lyu et al. 2022). Ao analisar a parte estrutural dos carotenoides, observa-se que as ligações duplas conjugadas são a de maior relevância, pois elas determinam a cor e ação biológica desse pigmento (Sandmann, 2001). Os carotenoides são substâncias sensíveis ao calor, luz e oxigênio, devido a isso durante sua análise, é necessário

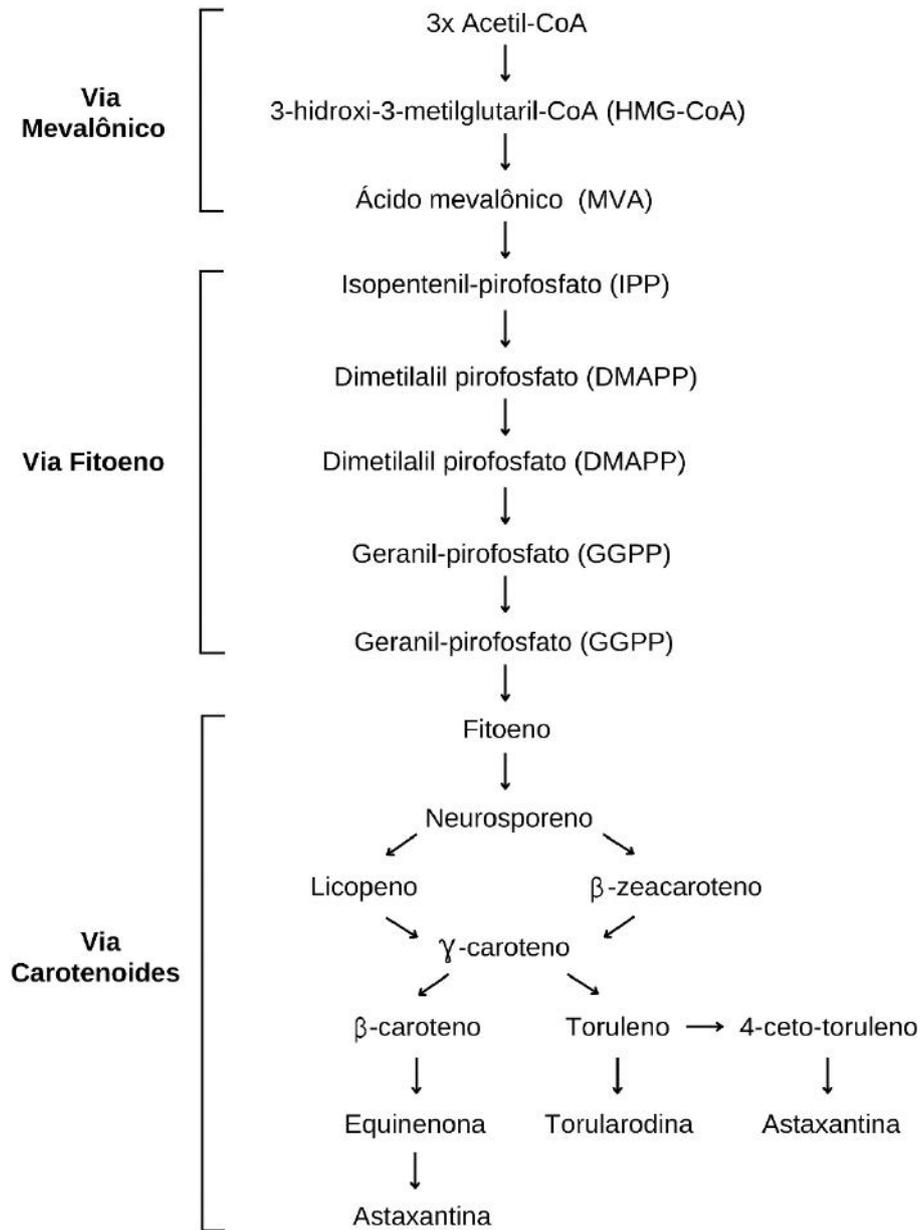
ficar atento a esses aspectos durante sua manipulação para evitar a degradação (Meléndez-Martínez et al., 2022).

Nos organismos fotossintéticos, eles possuem uma função importante na captação de luz e fotoproteção, em organismos não fotossintéticos eles desempenham o papel de fotoproteção, assim como ação contra o estresse oxidativo (Saini and Keum 2019; Reis-Mansur et al. 2019). Os animais não são capazes de sintetizar carotenoides, portanto sua aquisição é por meio da dieta, sendo essencial o seu consumo para o corpo humano (Ram et al. 2020). Os carotenoides apresentam diversos benefícios para a saúde humana como atividades antioxidante, pró-vitamina A e ação anticancerígena (Saini e Keum, 2019).

Os carotenoides de origem natural também apresentam um papel relevante no comércio, o relatório de 2020 da *Fortune Business Insights* demonstra um cenário positivo para o mercado de carotenoides naturais, apontando um impulsionamento em sua demanda devido a preferência do consumidor por produtos que não sejam de origem sintética e tragam benefícios à saúde e beleza, prevê-se que o mercado global de carotenoides deve atingir US\$ 1,84 bilhão até 2027, sendo o  $\beta$ -caroteno e a astaxantina dominantes no mercado por sua maior utilização industrial.

### 1.2.1 Produção de carotenoides por fungos

Em relação a produção de carotenoides por microrganismos, os fungos se destacam na produção de pigmentos como exemplo citamos a *Phaffia rhodozyma* e espécies dos gêneros *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* e *Sporidiobolus* (Rapoport et al. 2021). O tipo de pigmento, assim como a sua concentração irá variar conforme a espécie podendo ser  $\beta$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno, toruleno, luteína, torularodina, zeaxantina e astaxantina (Mussagy et al. 2019). Devido a sua lipofilicidade, a localização dos carotenoides nos fungos é intracelular, encontrando-se nas membranas e outros compartimentos lipofílicos na célula (Stahl e Sies 2005). Os carotenoides são sintetizados nas células fúngicas pela via do mevalonato, onde o ácido mevalônico é sintetizado a partir da conversão do acetil-CoA e transformado em isopentenil pirofosfato que é sucessivamente condensado até formar o fitoeno (Moliné, Libkind e van Broock, 2012). As reações bioquímicas sucessivas na molécula de fitoeno resultam em diferentes carotenoides como observado na **figura 2**.



**Figura 2.** Via de produção de carotenoides por fungos (adaptado de Igreja et al. 2021)

A produção de carotenoides por fungos apresenta diversas vantagens, pois eles podem utilizar diversas fontes de carbono e nitrogênio (Mapelli-Brahm et al. 2020), o ciclo de síntese de carotenoides por fungos é curto, podendo ser utilizado a fermentação contínua para uma produção mais eficiente e após a fermentação o sobrenadante do meio de cultivo, é rico em substratos como proteínas, gorduras e carboidratos que podem ser reaproveitados para outras aplicações industriais (Liu et al. 2021).

A síntese de carotenoides por fungos pode ser influenciada por diversos fatores relacionados a condições de cultivo. Por exemplo, o pH, modulando o crescimento fúngico e a biossíntese de carotenoides; temperatura, pois ela modula o crescimento e o funcionamento de enzimas presentes na via biossintética de carotenoides; incidência de luz, pois os carotenoides que tem a função fotoprotetora, sendo assim a exposição a luz durante o crescimento pode ser utilizada positivamente para a produção de carotenoides; agitação e aeração, influenciando na assimilação do substrato e conseqüentemente no crescimento microbiano, uma vez que o processo de carotenogênese é aeróbica e a composição nutritiva do meio de cultura, tendo destaque para a fonte de carbono, pois o metabolismo das levedura dependem dessa fonte no meio (Mata-Gómez et al. 2014; Igreja et al. 2021).

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para aumentar a biossíntese de carotenoides por fungos e baratear o seu processo de produção. Por exemplo, modular as condições de cultivo que influenciam a síntese de carotenoides, como pH, temperatura, iluminação (Igreja et al. 2021). Além disso, a aplicação de fatores de estresse celular como por compostos químicos e adição de íons metálicos ao meio de cultura pode ser aplicada (Mannazzu et al. 2015). A utilização de biologia sintética para otimização da via biosintética dos carotenoides tem tido uma aplicação crescente no setor industrial mundial, assim como uso de resíduos agroindustriais como base de meio de cultura em biorreatores visando baixar o custo da produção (Kot et al. 2018; Rapoport et al. 2021)

### 1.3. Pigmentos de *Rhodotorula mucilaginosa*

A levedura *Rhodotorula mucilaginosa* pertence ao filo *Basidiomycota*, apresenta cor vermelho-alaranjada por produzir pigmentos carotenoides, é heterotrófica, aeróbica e se apresenta na forma unicelular, não hifálico, sendo amplamente distribuída na natureza em habitats como solo, água, ar (Hof 2019; de Menezes et al. 2019). Além disso, a *R. mucilaginosa* pode ser encontrada na microbiota humana como microrganismo comensal da pele, unhas, trato urinário, trato gastrointestinal e respiratório (Jarros et al. 2020).

Os relatos de micose causados pela levedura são restritos, principalmente, a infecções hospitalares e em indivíduos imunossuprimidos, dessa maneira o gênero pode ser classificado como patógeno oportunista (Jarros et al. 2020; Li et al. 2022). De acordo com estudos, as infecções oportunistas causadas por *Rhodotorula.spp* consistem em meningite, fungemia, onicomicoses, infecções cutâneas, na corrente sanguínea e no sistema nervoso central (Mohd

Nor et al. 2015; Fernández-Ruiz et al. 2017; Ioannou, Vamvoukaki e Samonis et al. 2019; Cañete-Gibas e Wiederhold 2023). Os mecanismos de patogenicidade desse gênero ainda não estão explícitos, não sabendo se a relação de disseminação da levedura no hospedeiro está relacionada aos seus mecanismos de escape e virulência ou a imunossupressão do paciente (Jarros et al. 2020).

De acordo com o manual de Procedimentos para a manipulação de microrganismos patogênicos e/ou recombinantes da FIOCRUZ, a maior parte das espécies do gênero *Rhodotorula* são consideradas seguras, sendo a classe de risco 2 para a sua manipulação, o que demonstra que a levedura não representa uma ameaça para os profissionais do laboratório, comunidade, animais e meio ambiente.

Além da produção de pigmentos carotenoides, a *R.mucilaginosa* tem capacidade de armazenar lipídios que podem ser utilizados na produção de bioenergia ou como aditivos alimentares (Li et al. 2022), pode produzir EPS (exopolissacarídeos) com atividade imunomoduladora (Li et al. 2020), atuar na promoção do crescimento de plantas (Paul et al. 2020) e como agente biorremediador (Aibeche et al. 2022).

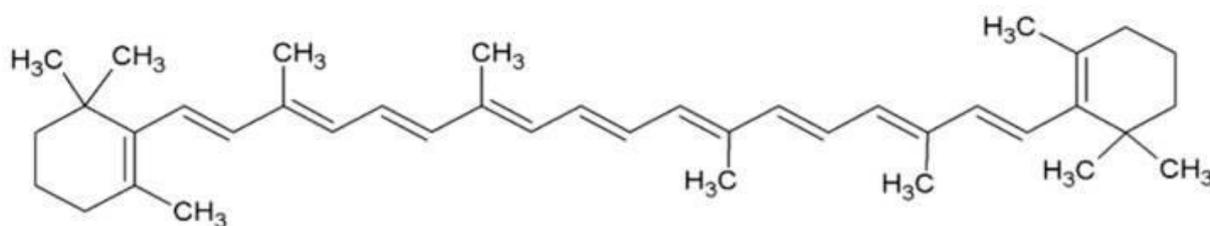
A *R. mucilaginosa*, assim como outras espécies do gênero *Rhodotorula* é capaz de produzir diferentes carotenoides, sendo os principais  $\beta$ -caroteno, toruleno e torularodina (Sharma and Ghoshal 2021), que são encontrados dentro de gotículas lipídicas intracelulares (Li et al. 2022).

A produção de carotenoides pela *R.mucilaginosa* apresenta diversas vantagens quando comparada a síntese por bactérias, microalgas e plantas, pois ela possui um rápido ciclo de crescimento por duplicação, possui potencial para o cultivo de forma escalonável em biorreatores, cresce em uma diversidade de substratos, sendo possível fazer o uso de resíduos agrícolas como fontes de carbono e nitrogênio (Dias Rodrigues et al. 2019; Gualberto et al. 2022; Paul et al. 2023).

Devido as suas características, os pigmentos da *R.mucilaginosa* possuem um papel relevante para a levedura em sua sobrevivência e adaptação ao meio ambiente, atuando como antioxidante em situações de alto estresse oxidativo e na proteção de radiação ultravioleta (Madhour et al. 2005), como demonstrado no estudo feito por Moliné et al. (2012), onde a cepa hiperpigmentada de *R.mucilaginosa* apresentou resistência celular a luz ultravioleta, tendo como consequência uma sobrevivência maior (até 250%).

### 1.3.1. $\beta$ -caroteno

O  $\beta$ -caroteno ( $C_{40}H_{56}$ ), possui nove ligações duplas conjugadas e pertence ao grupo dos carotenos (**figura 3**), tendo sua coloração indo do amarelo ao laranja (Gul et al. 2015). O  $\beta$ -caroteno é um dos carotenoides mais bem estudado e já utilizado no mercado por suas diversas funcionalidades e benefícios, ele é o principal precursor da vitamina A, sendo uma das principais fontes para dessa vitamina na dieta (Grune et al. 2010). Esse pigmento possui propriedades antioxidante, anticancerígenas, melhora imunidade (Mata-Gómez et al. 2014) e pode ser utilizado para prevenir a irradiação UV na pele humana (Stahl and Sies 2005; Reis-Mansur et al. 2019). Devido sua natureza lipossolúvel, o  $\beta$ -caroteno pode ser solubilizado em óleos comestíveis, assim como em óleos essenciais e utilizado como corante em cosméticos e alimentos, tendo grande valor agregado para a indústria alimentícia (Wang et al. 2021).



**Figura 3** - Estrutura do  $\beta$ -caroteno (Rapoport et al. 2021)

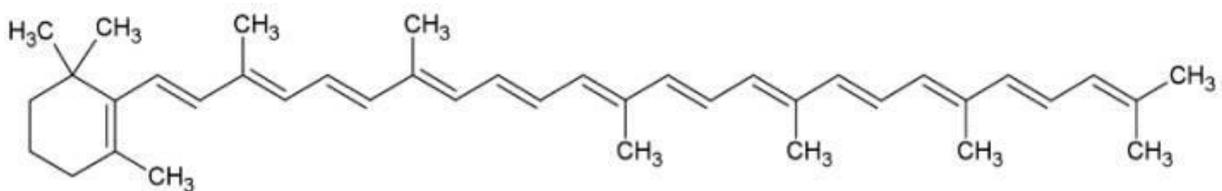
### 1.3.2. Toruleno e torularodina

O toruleno ( $C_{40}H_{54}$ ) possui doze ligações duplas conjugadas e pertence ao grupo dos carotenos (**figura 4**), sua cor pode ser laranja ou vermelho-alaranjado dependendo da concentração (Rapoport et al. 2021). A torularodina ( $C_{40}H_{52}O_2$ ) possui estrutura semelhante ao toruleno (**figura 5**), porém ela pertence ao grupo das xantofilas, pois apresenta um grupo carboxila ao final da cadeia de polieno, ela possui cor rosa escuro e caráter polar (Rapoport et al. 2021).

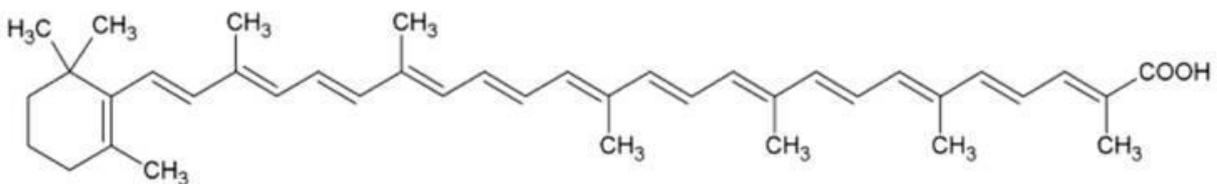
O toruleno e torularodina, devido a sua estrutura química, apresentam atividades antioxidantes mais altas quando comparada ao  $\beta$ -caroteno (Li et al. 2022), além de serem precursores da vitamina A, possuírem capacidade de melhorar o sistema imunológico e prevenir alguns tipos de câncer (Buzzini et al. 2005; Breierová et al. 2008). A torularodina apresenta uma atividade antioxidante relevante, atuando na defesa contra radicais peroxil e oxigênio

singleto (Sakaki et al. 2002), em adição a sua propriedade antimicrobiana, tornando-se uma possível substância para ser utilizada como antimicrobiano natural (Ungureanu and Ferdes 2012; Keceli et al. 2013).

Devido ao fato do toruleno e torularodina não estarem presentes em alimentos e conseqüentemente na dieta humana, não há estudos sobre sua ação na saúde humana (Maldonado et al. 2008). Todavia, levando em consideração as propriedades desses pigmentos, a possibilidade de sua aplicação em alimentos, rações e cosméticos se torna uma grande oportunidade (Zoz et al. 2014). O toruleno, assim como outros carotenos já utilizados no mercado como  $\beta$ -caroteno, pode ser uma nova opção de corante vermelho. A torularodina pode ser utilizada assim como a astaxantina do grupo das xantofilas, tendo a vantagem de sua solubilidade em formulações aquosas, devido sua característica mais polar (Zoz et al. 2014).



**Figura 4** - Estrutura do Toruleno (Rapoport et al. 2021)



**Figura 5** - Estrutura da Torularodina (Rapoport et al. 2021)

#### 1.4. Cosméticos

A preocupação com a estética está presente desde a antiguidade até os tempos contemporâneos, tendo grande relevância em nossa atual sociedade. Os cosméticos estão presentes tanto em procedimentos realizados por profissionais em clínicas de estética, assim como no dia-a-dia da higiene pessoal da população desde de o uso de sabonetes, xampus e condicionadores, loções corporais, desodorantes, maquiagem, tendo em vista melhorar a aparência e diminuir maus odores (Martins et al. 2014).

Além dos cosméticos estarem relacionados a questões estéticas, eles também têm grande importância na economia. O Brasil é um dos grandes mercados mundiais em produção e consumo de produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos. De acordo com o Panorama do Setor HPPC em 2022 da ABIHPEC (Associação Brasileira da indústria de Higiene pessoal, Perfumaria e Cosméticos), o impacto do mercado de cosméticos no Brasil representa cerca de 5,0% do mercado mundial com a movimentação de 26,8 bilhões de dólares somente em 2022, como pode ser visto na **figura 6**. Esses dados demonstram a importância da indústria da beleza para a economia nacional, apontando a significância de investimentos em pesquisa e desenvolvimento para a produção de cosméticos inovadores.



**Figura 6** - O impacto da indústria de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos na economia do Brasil. de acordo com o Panorama do Setor higiene pessoal, perfumaria e cosmético em 2022 da ABIHPEC (Associação Brasileira da indústria de Higiene pessoal, Perfumaria e Cosméticos).

Esse panorama permite o mercado da beleza se manter em alta através de crises econômicas, pois a inovação é necessária para atender a demanda dos consumidores. Demanda cada vez maior por produtos sustentáveis e ecologicamente corretos, devido a conscientização do consumidor a respeito dos efeitos adversos à saúde e ao meio ambiente causados pelas substâncias sintéticas presentes em formulações cosméticas (Huang, Meng e Tan, 2022). Sendo assim, os pigmentos microbianos se tornam promissores nesse contexto, uma vez que cumprem o papel de colorir os cosméticos, são biodegradáveis, além de possuírem propriedades bioativas benéficas, tornando o produto final com potencial competitivo no mercado e preservando o meio ambiente (Gupta et al. 2019; Kiki 2023).

#### 1.4.1 Esmaltes

O esmalte é um dos cosméticos mais populares no universo da beleza, agradando a todas as idades, além de estar relacionado a questões de gênero e cultura. Economicamente, os esmaltes apresentam relevância no mercado de cosméticos do Brasil movimentando cerca de 2 bilhões de reais, estando atrás somente dos Estados Unidos (Martins, 2019)

Em sua função primordial, os esmaltes tem o objetivo de fornecer cor as unhas, entretanto de acordo com o Caderno de tendências da ABIHPEC de 2019-2020, os consumidores buscam cada vez mais aliar essa função a saúde e o bem-estar, tendo como foco a nutrição e fortalecimento das unhas. Ademais, questões como durabilidade e resistência do esmalte quando aplicado nas unhas, também são relevantes para um bom marketing do produto, sendo a proteção UV um fator diferencial para a prolongar a vida útil dos esmaltes nas unhas.

Levando em consideração esse panorama, frente a demanda por cosméticos que contenham matérias primas de origem biológica, sejam ecologicamente corretos e tragam benefícios a saúde, a aplicação de pigmentos microbianos para a coloração de esmaltes se apresenta como uma possibilidade.

## 2. JUSTIFICATIVA

Considerando o cenário atual de demanda por produtos cosméticos mais sustentáveis ao lado de pesquisas inovadoras desenvolvidas com este foco, com o intuito de auxiliar no marketing e competitividade de empresas produtoras de cosméticos, os insumos de origem microbiana apresentam-se como uma fonte de recursos para serem explorados e aplicados nesta indústria. Neste contexto, a inúmera diversidade de microrganismos produtores de pigmentos abre uma possibilidade de inovação e resposta para tal demanda.

A levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, possui pigmentos carotenoides com amplas aplicações biotecnológicas, tendo atividade antioxidante, antimicrobiana, anticâncer, ação fotoprotetora, além de possuir cor, possibilitando sua aplicação como corante na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética.

Sendo assim a levedura *R.mucilaginosa* foi selecionada da coleção de microrganismos do laboratório Bioinnovar para obtenção e aplicação de seus pigmentos na formulação de esmaltes de unha, visando disponibilizar uma alternativa aos pigmentos tradicionais utilizados na indústria, como uma opção sustentável e inovadora para o mercado de cosméticos.

### 3. OBJETIVO

Obtenção de carotenoides microbianos a partir de fermentação submersa da levedura *Rhododotorula mucilaginosa*, tendo em vista a produção, extração e avaliação dos pigmentos para proposta de um modelo de coloração de produtos cosméticos.

#### 3. 1. Objetivos específicos

- |Verificar a produção de carotenoides na curva de crescimento da *R.mucilaginosa*
- Quantificar e identificar os pigmentos produzidos pela *R.mucilaginosa*;
- Analisar a citotoxicidade dos pigmentos para realizar a sua aplicação de forma segura em formulações cosméticas;
- Verificar a aplicação do carotenoide da levedura na formulação de esmaltes de unha.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Obtenção dos microrganismos

O microrganismo selecionado para o presente estudo foi obtido da coleção de microrganismos do laboratório Bionovar, sendo previamente identificado como *Rhodotorula mucilaginosa* e confirmado por MALDI-TOF. Para a sua manutenção, a levedura foi crescida em placas de Petri contendo meio extrato de malte (3g/L extrato de malte, 3g/L de extrato de levedura, 5g/L peptona, 10g/L glicose), com temperatura de crescimento a 28°C e posteriormente armazenada a 4°C.

### 4.2 Identificação do microrganismo por MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization*)

A confirmação do microrganismo selecionado, foi realizada pela medição em MALDI Microflex LT (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), de acordo com o procedimento de extração fornecido pelo fabricante. Neste método, uma única colônia do cultivo em ágar extrato de malte por 48h, foi suspensa em 300 µl de água desionizada e 900 µl de etanol absoluto e centrifugada a 12.298 g durante 2 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi seco por ar. Foram adicionados ácido fórmico a 70% e 100% de acetonitrila (1:1 v/v) ao precipitado e o tubo foi submetido ao vortex. A amostra foi centrifugada a 12.298 g durante 2 min e 1 µl do sobrenadante foi aplicado em duplicata sobre um alvo de aço e seca ao ar à temperatura ambiente. Antes da identificação, cada ponto de aplicação foi sobreposto com 1 µl de solução de matriz de HCCA (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico, Bruker) saturada (10 mg/ml) com solvente orgânico (50% de acetonitrilo e 2,5% de ácido trifluoroacético) e completamente seca ao ar. Os espectros foram calibrados externamente usando ATCC Escherichia coli 25922 padrão, antes da identificação da placa. Os espectros brutos foram processados usando o software MALDI BIOTYPER Realtime Classification versão 3.1 (Bruker Daltonik MALDI Biotyper).

### 4.3. Cultivo

O pré-inóculo para o cultivo da levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, foi preparado a partir da retirada de uma alçada do cultivo em placa de Petri do microrganismo e inoculado em

Erlenmeyer, em um volume correspondente a 10% do total a ser fermentado. O crescimento ocorreu durante 48h para atingir no mínimo  $1 \times 10^7$  células totais/mL. Então, o volume presente no pré-inóculo foi adicionado em Erlenmeyer contendo em caldo extrato de malte com o volume total a ser fermentado por 96h, a 28°C, pH 6, agitação a 150 rpm no shaker.

#### 4.4. Curva de crescimento

A curva de crescimento da *R.mucilaginosa* foi realizada conforme metodologia adaptada de da Silva et al. (2020), sendo o seu objetivo correlacionar as fases do crescimento da levedura com a quantidade de carotenoides produzidos ao longo da curva. Para o pré-inóculo, uma placa de Petri contendo a *R.mucilaginosa* foi utilizada para retirar uma alçada e fazer o inóculo em um Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio extrato de malte, sendo incubado nas mesmas condições de fermentação por 48h.

Após o tempo estabelecido, o meio foi coletado e as células de levedura foram contadas em câmara de Neubauer para calcular o volume de inóculo correspondente a  $1 \times 10^7$  células totais/mL. Este volume foi inoculado em Erlenmeyer de 120 mL contendo 60 mL de meio extrato de malte que serão incubados em shaker a 28°C a 150 rpm em triplicata.

O monitoramento do crescimento celular foi realizado em intervalos de 24h, 48h, 72h, 96h e 120h pela avaliação de OD 600 nm e peso seco da biomassa, onde alíquotas de 1 mL da amostra foram coletados, diluídas em água destilada e lidas em espectrofotômetro (SpectraMax) e 50 mL foram centrifugados por 15 minutos a 12.298 g, lavados duas vezes com água destiladas estéril, liofilizados e pesados. Para a quantificação de carotenoides totais foi pesado 0.1 g para realizar a extração e quantificar de acordo com a metodologia proposta no item 4.5 e 4.6.

#### 4.5. Extração dos carotenoides

A extração dos carotenoides foi realizada de acordo com a metodologia adaptada de da Silva et al. (2020). Onde meio de cultivo foi centrifugado a 12.298 g por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e pellet liofilizado para a obtenção da biomassa seca. Após a liofilização, a biomassa foi macerada e 10 mL de DMSO foram adicionados a 1g de biomassa, o sistema foi agitado por 2 min e incubado a 60°C por 15 min em banho-maria. Em seguida, 10 mL de

acetona, 10 mL de éter de petróleo e 10 mL de NaCl 20% foram adicionados sequencialmente, o sistema foi agitado por 5 min e centrifugado a 12.298 g por 15 min. A camada superior de éter de petróleo que contém os carotenoides foi retirada e o solvente foi evaporado em banho-maria dentro da capela.

#### 4. 6. Identificação do pigmento e quantificação de carotenoides totais e majoritários

A identificação dos carotenoides, assim como a quantificação de carotenoides totais e majoritários produzidos pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência em HPLC - Agilent Technologies 1260 Infinity II, CA, EUA detector DAD em uma coluna Kromasil C-18 (25 cm × 4,6 mm, tamanho de partícula 5 µm) com um comprimento de onda de detecção de 200 - 640 nm, de acordo com metodologia adaptada de Li et al. (2021). O solvente A era composto por 0,1% ácido fórmico e o solvente B por 0,1% ácido fórmico e 30% isopropanol em acetonitrila com um fluxo de 1 mL/min.

O volume de injeção para a identificação, quantificação de carotenoides totais e majoritários foi de 20 µL, já para a quantificação de carotenoides totais na curva de crescimento foi de 50 µL. O gradiente utilizado foi: 0 min: 5% B; 5 min: 50% B; 20 min: 100% B; 45 min: 100% B; 50 min: 5% B; 55 min: 5% B. O β-caroteno adquirido da Sigma foi utilizado como padrão e para construção de curva para a quantificação dos carotenoides.

#### 4.7. Teste de citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado segundo Liu et al. (1997) com o objetivo de analisar a citotoxicidade dos pigmentos de acordo com as suas concentrações para sua aplicação segura em formulações cosméticas. O método utilizado foi o de redução de MTT (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio]. As células de linhagem HaCaT (queratinócitos epidérmico humano) e HFB (fibroblasto humano) foram mantidas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) com 10% de soro fetal bovino como suplementação. As linhagens celulares foram plaqueadas em placas de 96 poços estéril (Kasvi) em uma densidade de 10<sup>4</sup> células/200 µL por poço e incubadas por 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C para adesão das células.

O pigmento extraído de *R. mucilaginosa* foi diluído em 2 mL de meio de cultivo celular estéril DMEM (Dulbecco modification of Minimum Essential Media) e 2 mL de DMSO,

passando em filtro de 46nm e adicionado às placas nas concentrações de 218,37 µg, 109,18 µg, 54,59 µg, 27,29 µg, 13,64 µg, 6,82 µg, 3,41 µg e 1,70 µg. As placas foram incubadas, em triplicata, por 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após o tempo determinado, foi adicionado 20µL da solução de MTT [3- (4,5- dimetil -2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio] (Sigma) em cada um dos poços e incubados por 4 horas a 37°C na estufa de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, as placas foram centrifugadas por 10 min, o sobrenadante foi descartado e 200µL de DMSO foram adicionados aos poços. Para interpretação dos resultados, as placas foram levadas ao SpectraMax para realização da leitura da absorbância nos comprimentos de onda de 490 e 570nm.

#### 4.8. Formulação de esmalte com os pigmentos de *R.mucilaginosa*

A metodologia utilizada para mistura do pigmento ao esmalte foi adaptada de Barbosa e Pereira (2020). O esmalte comercial de cor branca do lote 261 foi utilizado como base para incorporação dos pigmentos extraídos da levedura *R.mucilaginosa*, conforme o tópico 4.5. A proporção de óleo de banana com o pigmento foi de 1:1, tendo como base a quantidade de biomassa seca que foi utilizada para extração. O óleo de banana junto ao pigmento foram adicionados ao esmalte nas proporções propostas na **tabela 2**.

**Tabela 2.** Proporção para a mistura esmalte com o pigmento

Proporção esmalte/pigmento	Esmalte	Pigmento
1	25%	75%
2	50%	50%
3	75%	25%

As misturas foram feitas em temperatura ambiente com agitação manual para a incorporação do pigmento ao esmalte.

##### 4.8.1. Teste de clareza

A fim de verificar a presença de material particulado no esmalte, o teste de clareza adaptado de Barbosa e Pereira (2020) foi realizado, onde o esmalte com o pigmento incorporado de acordo com as proporções citados em 4.8 foi espalhado em uma superfície de vidro e observado visualmente.

#### 4.8.2. Teste de brilho

O teste de brilho foi feito de acordo com Barbosa e Pereira (2020) onde o esmalte controle, sem o pigmento, assim como o esmalte o qual o pigmento foi incorporado foram aplicados em unhas postiças e após o tempo de secagem, o brilho e textura foi comparado entre as duas amostras.

#### 4.8.3. Teste tempo de secagem

Com a finalidade de avaliar o tempo de secagem, uma camada fina do esmalte controle, sem o pigmento, assim como o esmalte o qual o pigmento foi incorporado foram aplicados em unhas postiças e o tempo de secagem até a formação de um filme seco ao toque foi cronometrado como proposto por Barbosa e Pereira (2020).

#### 4.8.4. Teste de resistência a água

Em uma lâmina de vidro foi aplicado uma camada do esmalte controle, sem o pigmento, e do esmalte com o pigmento para formar um filme contínuo sobre a lâmina, após a secagem, as lâminas foram pesadas e posteriormente mergulhadas em um béquer de vidro contendo água por 30 minutos. Após o tempo determinado, o excesso de água foi retirado e as lâminas foram pesadas novamente, metodologia realizada conforme Barbosa e Pereira (2020).

#### 4.8.5. Teste de aspecto

A avaliação do surgimento de bolhas ou descamação dos esmaltes quando em contato com a água foi realizado conforme Barbosa e Pereira (2020). O esmalte controle, sem o pigmento, e do esmalte com o pigmento foram aplicados em uma lâmina de vidro até formar um filme contínuo. Após a secagem as lâminas foram coladas em béquer de vidro de forma que a água contida no béquer cobrisse toda a superfície das lâminas, sendo elas deixadas de repouso por 18 horas. A observação de alterações e /ou desprendimento do filme dos esmaltes da lâmina foi feita visualmente após o tempo determinado.

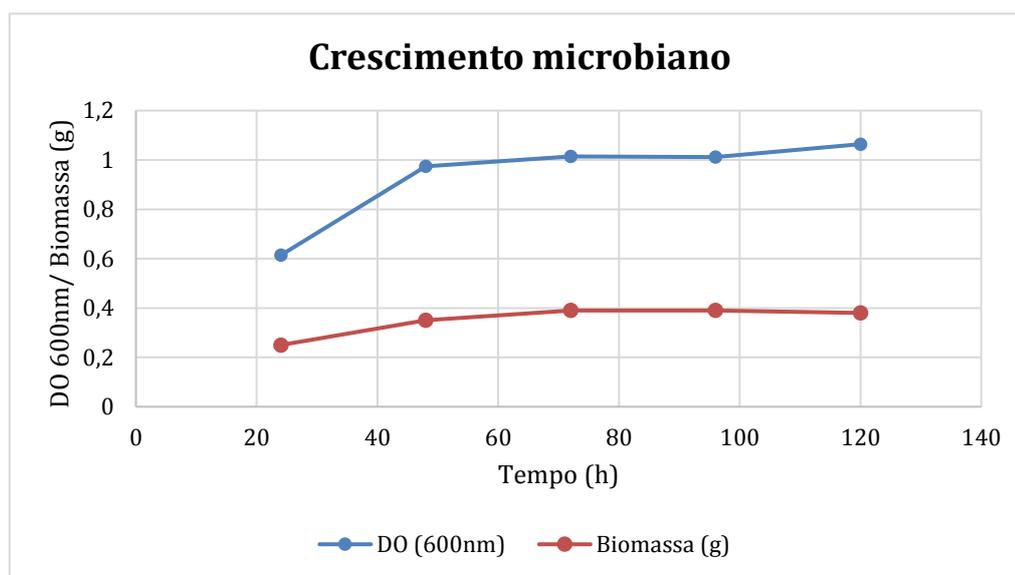
## 5. RESULTADOS

5.1 Identificação do microrganismo por MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization*)

A análise para identificação e confirmação do microrganismo feita em duplicata e os respectivos scores foram 2.069 e 1.809. De acordo o protocolo do fabricante, scores entre 0 e 1699 não há identificação confiável, entre 1700 e 1999 há identificação do gênero e entre 2000 e 3000 a identificação pode ser considerada segura. Sendo assim, o microrganismo obtido da coleção de microrganismos do laboratório Bioinovar foi confirmado em gênero como sendo *Rhodotorula*.spp e presuntivamente como sendo *Rhodotorula mucilaginosa*.

### 5.2 Curva de crescimento

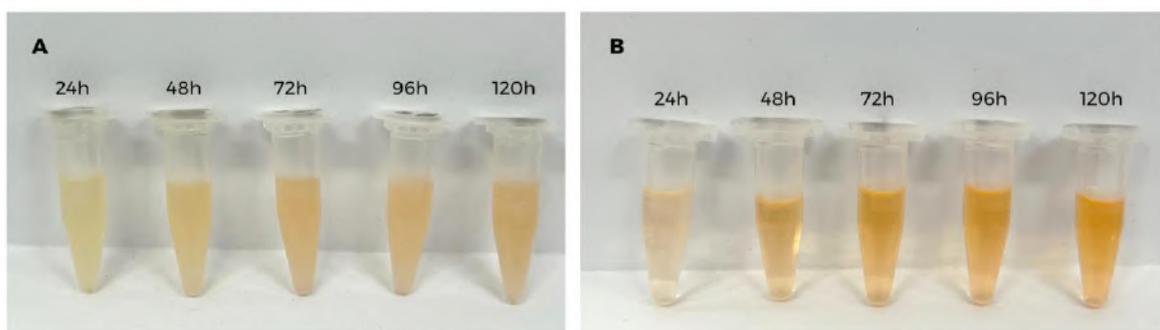
A curva de crescimento da levedura foi feita de modo a comparar a relação entre as fases do crescimento da levedura e a quantidade de carotenoides totais ao longo de 24h, 48h, 72h, 96h e 120h, onde foi possível observar que em 96h e 120h na fase estacionária, foi onde obteve-se a maior quantidade de carotenoides, como é possível observar na **figura 7** e na **tabela 3**:



**Figura 7.** Curva de crescimento da levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, correlacionando DO 600nm, biomassa (g) e tempo de cultivo em horas

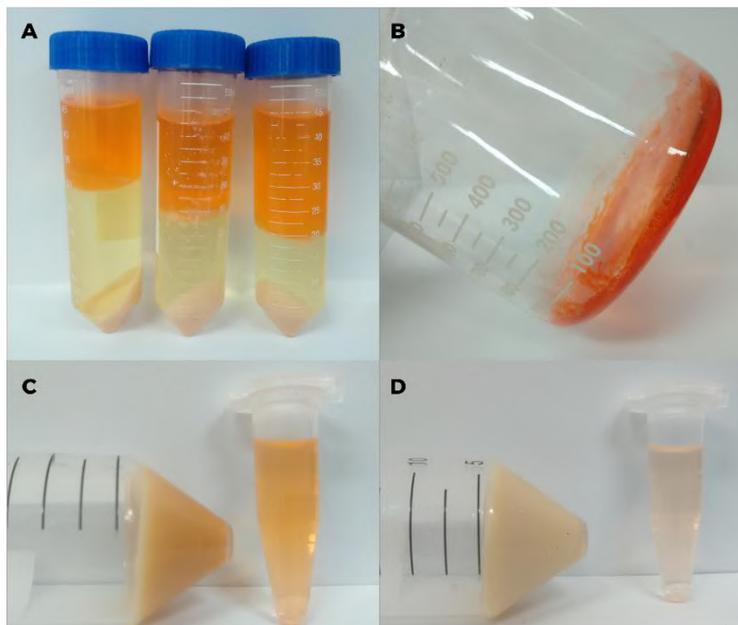
**Tabela 3.** Tempo de crescimento versus biomassa seca (g) e carotenoides totais ( $\mu\text{g/g}$ )

Tempo (horas)	Biomassa seca (g)	Carotenoides totais ( $\mu\text{g/g}$ )
24	0,25	96,67
48	0,35	187,31
72	0,39	324,58
96	0,39	372,42
120	0,38	382,55

**Figura 8.** A. Turbidez do meio de cultivo. B. Extratos dos carotenoides em éter de petróleo após a extração com 0,1g de biomassa, ao longo do tempo estabelecido

### 5.3 Extração dos carotenoides

A metodologia adotada demonstrou ser eficaz na extração dos carotenoides, resultando em duas fases de solventes distintas após a centrifugação. A primeira fase alaranjada como é possível ver na **figura 9A**, contendo os carotenoides juntamente com o éter de petróleo, pôde ser separada individualmente por meio do uso da pipeta. Após a separação da fase com os carotenoides, o solvente restante foi evaporado em banho-maria na capela, resultando no pigmento de consistência pastosa e oleosa no fundo do recipiente (**figura 9B**). Em outro momento, o processo de extração foi realizado duas vezes, devido a presença de cor no *pellet*, porém como é possível observar na **figura 9C** (primeira extração) em comparação a **figura 9D** (segunda extração), não é vantajoso repetir a metodologia devido a cor obtida.



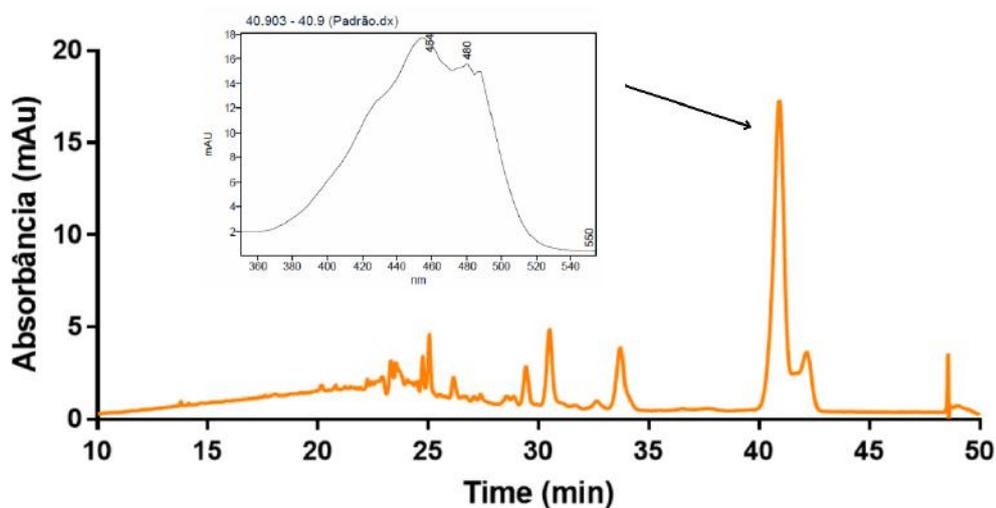
**Figura 9.** **A.** Divisão das fases dos solventes após a finalização de todas as etapas da extração. **B.** Pigmento concentrado após a evaporação do solvente éter de petróleo **C.** 1X extração, **D.** 2X extração, mostrando em C e D a cor da biomassa versus e a cor do extrato de carotenoides.

#### 5.4 Identificação do pigmento e quantificação de carotenoides totais e majoritários

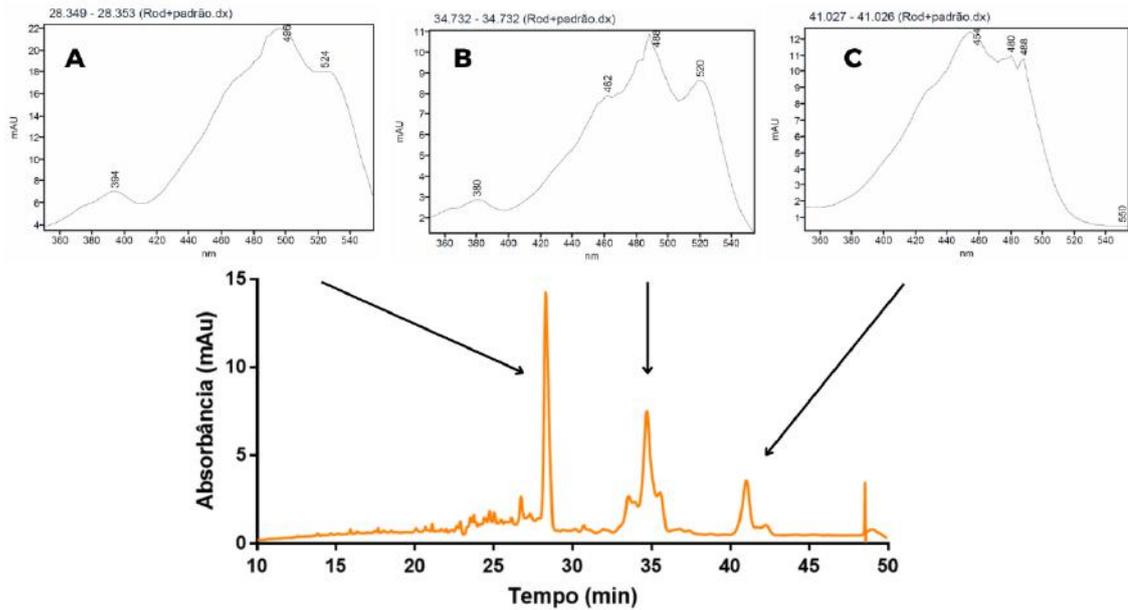
Na análise por cromatografia líquida de alta eficiência realizada HPLC-DAD, foi possível constatar a presença de três carotenoides majoritários com base nos espectros de ultravioleta em 450 nm e nos dados disponíveis na literatura, sugere-se que esses flavonoides sejam o  $\beta$ -caroteno, toruleno e torularodina conforme mostrado na **tabela 4**. A **figura 10** contém o cromatograma do padrão de  $\beta$ -caroteno (Sigma) utilizado e a **figura 11**, o cromatograma dos pigmentos da levedura. A presença de  $\beta$ -caroteno foi confirmada, por meio da co-injeção do padrão de  $\beta$ -caroteno (Sigma) com a amostra, conforme o cromatograma presente na **figura 12**. Para toruleno e torularodina não há padrões comerciais disponíveis, sendo eles presumidamente identificados com base em dados dispostos na literatura por (Maldonado et al. 2008).

**Tabela 4.** Tempo de retenção, seus respectivos picos de absorção e comparação com de Maldonade et.al 2008.

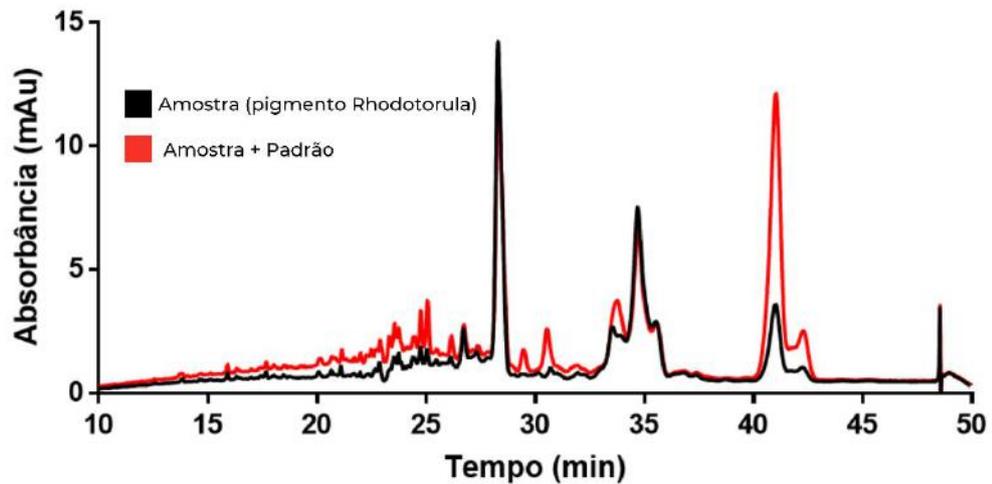
Carotenoide	Torularodina	Toruleno	$\beta$ -caroteno
Tempo de retenção (min)	28.332	34.715	41.027
Máximo de absorção (amostra)	471 – 496 – 524	462 – 488 – 520	454 – 484 – 550
Máximo de absorção Maldonade et al. 2008	465 – 492 – 523	460 – 484 – 518	454 – 480 – 550 (padrão utilizado)



**Figura 10.** Cromatograma por HPLC-DAD da amostra de  $\beta$ -caroteno em 450 nm. Em destaque, espectro do  $\beta$ -caroteno.



**Figura 11.** Cromatograma por HPLC-DAD da amostra dos pigmentos de *Rhodotorula mucilaginosa* em 450 nm. Em destaque, espectro de torularrodina (A), toruleno (B) e  $\beta$ -caroteno (C).



**Figura 12.** Cromatograma por HPLC-DAD da co-injeção dos pigmentos de *Rhodotorula mucilaginosa* com  $\beta$ -caroteno padrão (Sigma) em 450 nm.

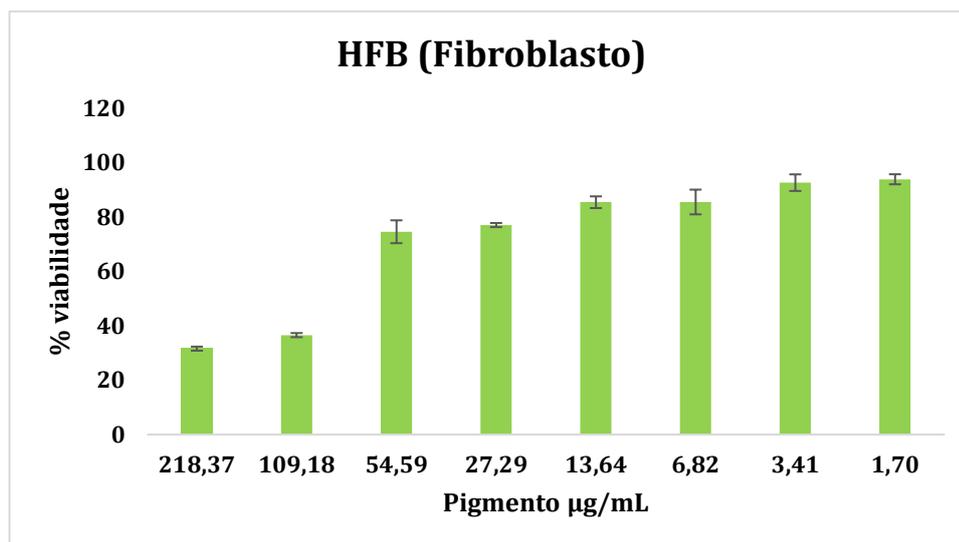
O resultado da quantificação de carotenoides totais e majoritários por cromatografia líquida de alta eficiência produzidos pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* em 96h de cultivo, extraído a partir de 1g de biomassa seca, está presente na **tabela 5**.

**Tabela 5.** Quantificação dos carotenoides totais e majoritários de *Rhodotorula mucilaginosa*.

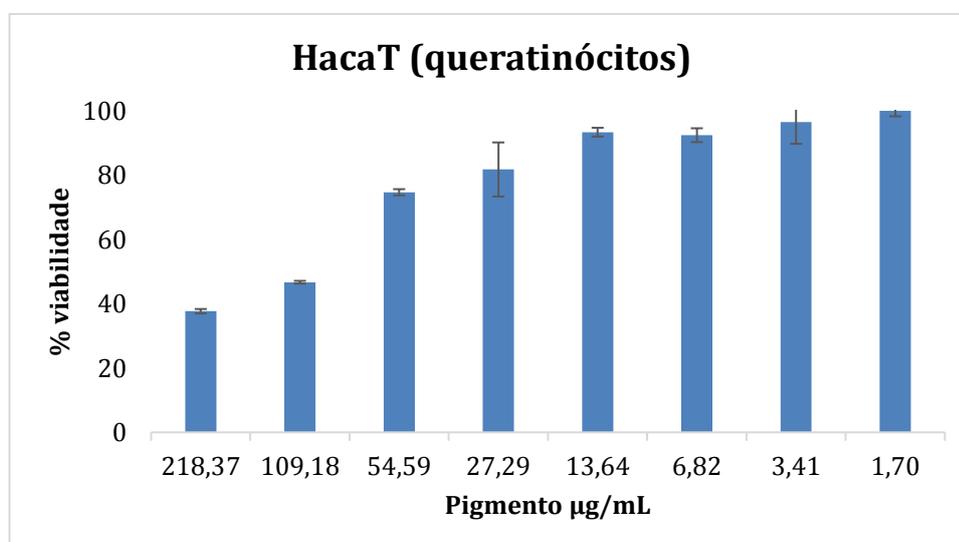
Carotenoides	Torularodina	Toruleno	$\beta$ -caroteno	Carotenoides totais
Tempo de retenção (min)	25.4145	34.7915	41.184	-
Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	320,2321	212,4061	66,7372	878,4808
Porcentagem	36,4%	24,1%	7,6%	100%

### 5.5 Teste de citotoxicidade

Os resultados da viabilidade celular das células testadas no ensaio de citotoxicidade para os pigmentos extraídos da levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, encontram-se na **figura 13** para as HFB (fibroblasto humano) e **figura 14** para as células HaCaT (queratinócitos epidérmico humano). As células HaCaT e HFB apresentam viabilidade celular considerável de 74% na presença de 54,59  $\mu\text{g/mL}$  de pigmento.



**Figura 13.** Viabilidade celular das células HFB frente as diferentes concentrações do pigmento



**Figura 14.** Viabilidade celular das células HacaT frente as diferentes concentrações do pigmento (µg/mL)

### 5.6 Coloração do esmalte

Em todas as proporções propostas, o pigmento foi bem incorporado no esmalte, ou seja, em todas ocorreu a alteração de cor do esmalte, como é possível observar na **figura 15**. A **tabela 6** traz as quantidades de esmalte: pigmento em mililitros e a concentração final de pigmento em µg/mL presentes na formulação de 5 mL.



**Figura 15.** Aplicação do pigmento ao esmalte nas diferentes proporções estabelecidas para 5 mL de esmalte

**Tabela 6.** Proporção do esmalte: pigmento para a formulação de 5 mL

Proporção	Esmalte (mL)	Pigmento + óleo de banana (mL)	Contração final do pigmento presente no esmalte ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	1,5	3,5	614,9
2	2,5	2,5	439,2
3	3,5	1,5	263,5

### 5.6.1 Teste de clareza

Em todas as proporções não houve formações de grumos, ou seja, o pigmento foi integrado bem incorporado (**figura 16**). Entretanto, à medida que diminuía a proporção de esmalte e aumentava a de pigmento solubilizado em óleo de banana, observa-se pequenas gotículas de óleo.



**Figura 16.** Proporções esmalte: pigmento testadas quanto a sua clareza em lâmina de vidro.

#### 5.6.2 Teste de brilho

Por meio da análise de brilho, foi possível observar que quanto menor a proporção de pigmento, mais o brilho era predominante, como é perceptível notar pela **figura 17**. A **figura 18**, traz uma perspectiva lateral e ampliada para melhor observação e comparação de brilho.



**Figura 17.** Proporções esmalte: pigmento aplicadas às unhas postiças para observação de brilho.



**Figura 18.** Proporções esmalte: pigmento aplicadas às unhas postiças para observação de brilho, observado de maneira lateral.

### 5.6.3 Teste de tempo de secagem

Em relação ao tempo de secagem, pode-se observar que quanto maior a quantidade de pigmento, mais rápido o esmalte seca, como é possível observar na **tabela 7**.

**Tabela 7.** Tempo de secagem das 3 proporções esmalte: pigmento e do controle

Proporção esmalte/pigmento	Tempo
1	00:04:05
2	00:07:38
3	00:08:47
Controle	00:10:07

#### 5.6.4 Teste de resistência a água

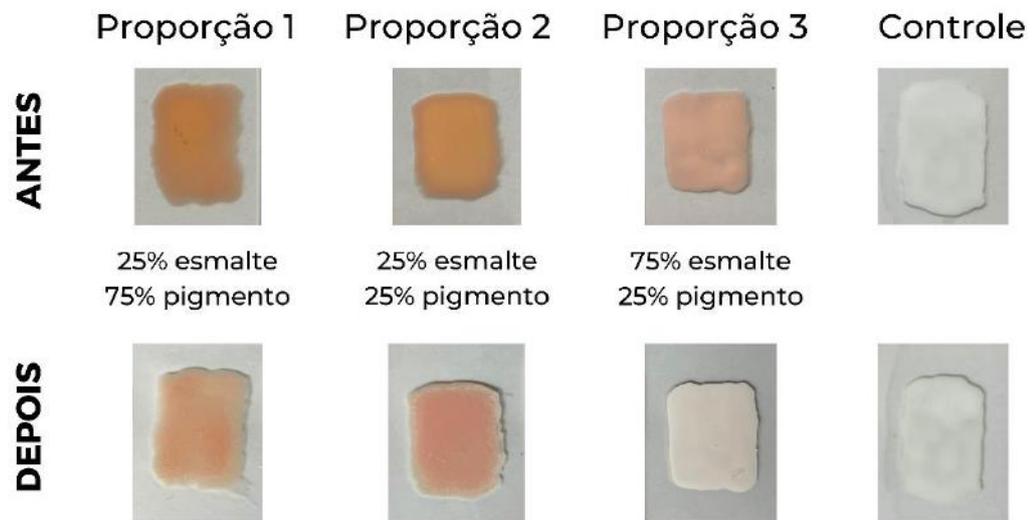
As lâminas não tiveram alteração de peso após ficarem 30 minutos submersas na água, demonstrando que os esmaltes possuem resistência à água, como pode ser visto na **tabela 8**.

**Tabela 8.** Peso das lâminas antes e depois de 30 minutos submersas na água das 3 proporções esmalte: pigmento e o controle

Proporção esmalte/pigmento	Peso antes (g)	Peso depois (g)
1	4,82	4,82
2	4,79	4,79
3	4,84	4,84
Controle	4,95	4,95

#### 5.6.5 Teste de aspecto

Após o tempo proposto na metodologia (18 horas) as lâminas foram retiradas da água para análise, observou-se que não houve desprendimento do esmalte da lâmina e o ponto mais notório de alteração foi a clareamento de suas cores (**figura 19**), sendo a proporção 3 a qual teve a sua cor mais alterada.



**Figura 19.** Aspecto e coloração das lâminas antes e depois de 18 horas submersas na água das 3 proporções esmalte: pigmento e o controle

## 6. DISCUSSÃO

Com a seleção e identificação da levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, o estudo passa a focar na extração, identificação, quantificação e viabilidade dos pigmentos da levedura, a fim de realizar a sua aplicação na coloração dos esmaltes com segurança.

Visto que o pigmento da *R.mucilaginosa*, encontra-se de maneira intracelular, é necessário fazer o rompimento da célula, com o fim de extrair o pigmento (Lopes et al. 2017). Em geral, as metodologias que utilizam solventes orgânicos são amplamente empregadas na extração de carotenoides microbianos, como apresentado nas revisões de Liu et al. (2021) e Papapostolou et al. (2023). A predominância dos solventes orgânicos nas metodologias de extração, ocorre devido a sua capacidade de romper células e ao seu alto potencial de solubilizar os carotenoides (Mussagy et al. 2019). Nesse contexto, destaca-se o uso do solvente DMSO, que é amplamente reconhecido pela sua rapidez e confiabilidade na extração de pigmentos de outras leveduras (Squina and Mercadante 2003). Tal afirmativa, pode ser confirmada no estudo conduzido por Lopes et al. (2017), no qual testa diferentes métodos de ruptura celular, tendo a extração com DMSO um rendimento superior em *Rhotorula mucilaginosa*, de 297,6 µg/g, enquanto os métodos mecânicos atingiram no máximo 202,4 µg/g utilizando um banho ultrassônico com 4 ciclos ultrassônicos de 40 kHz. Além disso, a mistura de solventes, como a utilizada no presente trabalho, proporciona uma atividade sinérgica para o rompimento celular e extração, sendo possível obter melhor rendimento e recuperação dos pigmentos como demonstrado por Park et al. (2007).

No presente estudo foi utilizado uma mistura de solventes, sendo eles DMSO, acetona e éter de petróleo para a extração dos carotenoides de *Rhototrula mucilaginosa*, a fim de posteriormente avaliar os pigmentos de forma quantitativa e qualitativa.

Por meio da metodologia de extração adotada pelo presente estudo, foram obtidos 878,4 µg/g de carotenoides por biomassa e 6852,14 µg/L de carotenoides volumétricos em 96 horas de cultivo. Essa produção é classificada como alta, de acordo com a categorização proposta por Mata-Gómez et al. (2014), que atribuiu as quantidades de carotenoides produzidas pelo gênero *Rhodotorula* sp. como baixas (menos de 100 µg/g), médias (101 a 505 µg/g) e altas (mais de 500 µg/g). Ao comparar com outros estudos presentes na literatura, é possível observar de fato um rendimento significativo de carotenoides produzidos pela levedura, como descrito por Dias Rodrigues et al (2019) que obteve um rendimento de 1200 µg/L de carotenoides volumétricos, enquanto em outro estudo realizado por Cipolatti et al. (2019), alcançou-se a

marca de 1068,5 µg/L. Vale ressaltar que tanto os solventes de extração quanto o meio de cultivo utilizados nesses estudos foram os mesmos empregados no presente trabalho.

Para a análise qualitativa dos pigmentos, a cromatografia líquida de alta eficiência foi empregada, uma vez que o HPLC é um método analítico preciso e muito útil para quantificar e identificar carotenoides microbianos, conforme Squina and Mercadante (2003), Mussagy et al. (2019) e Papapostolou et al. (2023).

Os carotenoides identificados foram torularrodina, toruleno e β-caroteno, de fato, esses pigmentos já eram esperados de serem encontrados na *Rhodotorula mucilaginosa* como já relatado no trabalho de Villoutreix (1960), Maldonade et al. (2008) e Moliné et al. (2012). A porcentagem desses pigmentos identificados majoritariamente representa 68,1% dos carotenoides totais para a *R. mucilaginosa* do presente estudo, esse dado coincide com Ghilardi et al. (2020) onde o autor também encontra os três carotenoides identificados na proporção de cerca de 70% do conteúdo total de carotenoides. O valor de 31,9% relativo a outra parte dos carotenoides totais, representam outros carotenoides produzidos pela levedura, assim como formas isoméricas desse tipo de pigmento. De acordo com Amorim-Carrilho et al. (2014) os cromatogramas de carotenoides são geralmente muito complexos, devido à grande variedade de isômeros, isso ocorre em decorrência das ligações duplas presentes nos carotenoides, que os torna suscetíveis a isomerização, principalmente devido a luz, calor, ácido e oxigênio. Além disso, produção de pigmentos variam de acordo com a cepa da *Rhodotorula* e das diferentes condições de cultivo (Squina and Mercadante 2003), na levedura do presente trabalho o pigmento mais produzido é a torularrodina, seguido por toruleno e β-caroteno.

No presente estudo, ainda, foi realizada uma curva de crescimento para estabelecer a correlação entre o tempo de crescimento, a biomassa e a produção de carotenoides da levedura *Rhodotorula mucilaginosa*. Os resultados indicaram que os maiores valores de carotenoides foram observados em 96 e 120 horas, onde a levedura encontrava-se na fase estacionária. Apesar da produtividade de carotenoides ser maior em 72 horas de crescimento, o tempo de 96 horas foi escolhido para realizar a fermentação submersa nesse trabalho, uma vez que entre esses dois intervalos de tempo, há a manutenção da biomassa seca, porém a maior produção de carotenoides ocorre entre 96 horas e 120 horas.

Ao comparar os valores obtidos com estudos presentes na literatura que tinham como objetivo analisar o tempo de incubação e a produção de carotenoides, pode-se observar que há uma variação no tempo de produção máxima de carotenoides como descrito por Sadat-Naghavi et al. (2013) onde obteve a maior concentração de carotenoides em 48 horas em meio MMS

(meio semissintético [g/l]: glicose 10,  $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$  2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,1, extrato de levedura 1) a 30° C e por Elsanhoty et al. (2017) onde ocorreu em 72h a 28°C em meio extrato de malte. Apesar das condições de crescimento de Elsanhoty et al. (2017) se assemelharem ao do presente estudo, em relação ao meio de cultivo e a temperatura de crescimento, há ainda outros fatores que podem influenciar nas diferenças ao analisar o efeito do tempo incubação na produção de carotenoides, como a cepa utilizada e método de extração adotado. O autor utilizou etanol em seu trabalho, diferente da mistura de solvente usada neste trabalho. Conforme observado por Sharma and Ghoshal (2020), a produção de carotenoides aumenta na fase log e se mantém quase constante na fase estacionária, com mudanças insignificantes nos valores de biomassa e carotenoides. Essa pesquisa corrobora com as conclusões do presente estudo.

Os pigmentos de *R.mucilaginosa* também foram analisados enquanto sua toxicidade, para garantir a sua aplicação segura na formulação do esmalte. Andrade et al. (2016) propôs uma escala de intensidade para avaliar a o efeito citotóxico em células testadas com  $\beta$ -caroteno: ausência de atividade (1 a 20% inibição), pouca atividade (inibição do crescimento celular variando entre 20 a 50%), atividade moderada (inibição do crescimento celular viando entre 50 a 70%) e alta atividade (inibição do crescimento celular viando entre 70 a 100%). Tendo a escala proposta como referência, os fibroblastos e queratinócitos apresentam boa viabilidade celular, ou seja, pouca inibição do crescimento celular, quando expostos a 54,59  $\mu\text{g/mL}$ . As células testadas estão naturalmente presentes na pele e podem entrar em contato com o pigmento caso haja uma lesão presente na região das pregas ungueais laterais e no eponíquio, os quais estão localizados ao redor do corpo da unha que receberá o esmalte com pigmento (de Berker 2013).

Atualmente, os estudos publicados na literatura possuem o foco em avaliar atividade anticâncer dos pigmentos produzidos pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa*. O autor Li et al. (2022) aborda em sua revisão sobre a *Rhodotorula mucilaginosa* as aplicações potenciais dos carotenoides produzidos por ela. Devido a isso, não há muitas pesquisas testando a viabilidade celular de células saudáveis na presença do pigmento. Entretanto, é importante ressaltar que existem pigmentos microbianos permitidos e amplamente utilizados na indústria alimentícia. Um exemplo é o  $\beta$ -caroteno produzido pela espécie *Blakeslea trispora* e a astaxantina produzida pelo *Haematococcus pluvialis* (Nigam and Luke 2016). Além disso, a revisão de Paul et al. (2023) destaca a comercialização e aplicação de carotenoides de levedura e outros microrganismos. Esses pigmentos são notoriamente seguros para uso em alimentos, o que fortalece ainda mais seu potencial de aplicação na área de cosméticos.

Por fim a aplicação dos pigmentos da levedura *R.mucilaginosa* em esmaltes foi bem-sucedida, a proporção na qual obteve-se o melhor resultado tendo a preservação das características padrões do esmalte foi a 3 (75% esmalte e 25% pigmento), no qual o brilho após a aplicação nas unhas postiças ainda estava presente e a viscosidade se assemelhava a do esmalte sem o pigmento. Apesar de a formulação com 25% do pigmento apresentar uma perda de cor mais significativa visualmente em comparação com as outras formulações no teste de aspecto, é importante ressaltar que esse é um cenário em que as unhas com esmalte não estarão expostas habitualmente. Em relação ao pigmento e à sua citotoxicidade, embora a formulação com o esmalte contendo 25% do pigmento, tenha uma quantidade superior a 54,59 µg/mL onde há pouca inibição do crescimento celular, o esmalte ainda assim não apresenta riscos. Isso se deve ao fato de que teste de citotoxicidade não representa o cenário real ao qual as células estarão expostas ao pigmento, uma vez que em placa, elas se encontram em uma monocamada, além disso a unha ao ser pintada, ela não estará exposta à concentração total de pigmentos presentes no esmalte. É válido ressaltar que o esmalte entrará em contato com a placa ungueal (corpo da unha), rica em queratina, a qual forma uma barreira rígida que confere dureza às unhas (de Berker 2013).

A aplicação dos pigmentos de levedura *Rhodotorula mucilaginosa* em esmaltes é inovadora na área de cosméticos, uma vez que há uma escassez de trabalhos científicos que associem a aplicação de pigmentos carotenoides de origem microbianos em esmaltes para unhas. Abrindo assim, o caminho para o grande potencial dos pigmentos da levedura, tornarem-se uma opção viável e atrativa para a indústria de esmaltes. Com a devida otimização dos processos de produção e formulação, os pigmentos possuem um potencial revolucionário no mercado de esmaltes, proporcionando uma opção inovadora, mais sustentável e segura para os consumidores. Além disso, abrem caminho para o desenvolvimento de novos meios de produção e tecnologias na indústria de cosméticos, impulsionando seu crescimento e promovendo o avanço da economia. Essa perspectiva é ainda mais significativa considerando o papel relevante ocupado pelo Brasil no mercado global de produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos. Assim, esses pigmentos não apenas agregam valor ao produto final, mas também atendem às crescentes demandas do mercado por ingredientes ecologicamente corretos, impulsionando uma mudança positiva tanto na indústria quanto na economia.

## 7. CONCLUSÃO

- A levedura *Rhodotorula mucilaginosa* do presente estudo apresenta a maior produção de carotenoides entre 96 e 120 horas de fermentação na fase estacionária de seu crescimento.

- A levedura demonstra uma elevada produção de carotenoides em comparação a estudos anteriores que utilizaram um meio de cultivo e metodologia de extração semelhantes, com valores de 878,48 µg/g de carotenoides por biomassa e 6,85 mg/L de carotenoides volumétricos durante o período de fermentação de maior produção do pigmento.

- Os carotenoides produzidos pela levedura apresentam uma baixa toxicidade em fibroblastos e queratinócitos humanos, sendo seguros para serem utilizados em esmaltes de unha.

- Ao solubilizar os carotenoides da *R.mucilaginosa* em óleo de banana, é possível aplicá-los em esmaltes de unha com uma concentração de 25% de pigmentos para 75% de esmalte, mantendo as características típicas de um esmalte, como brilho, resistência à água e tempo de secagem.

- Estudos experimentais podem ser conduzidos com o objetivo de otimizar, aumentar e escalonar a produção de carotenoides, uma vez que a levedura investigada neste estudo demonstra potencial para aplicações industriais.

- São necessárias investigações complementares para avaliar a estabilidade dos pigmentos carotenoides da levedura quando incorporados ao esmalte.

- Este estudo foi promissor a possibilidade de aplicação de pigmentos microbianos em esmalte de unha de forma segura, atendendo a atual demanda crescente de produtos ecologicamente corretos e produtos cosméticos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIHPEC (2018). Associação Brasileira da indústria de Higiene pessoal, Perfumaria e Cosméticos: caderno de tendências 2019-2020. Disponível em: < <https://abihpec.org.br/publicacao/caderno-de-tendencias-2019-2020/> >. Acesso em: 22/12/2022
- ABIHPEC (2022). Associação Brasileira da indústria de Higiene pessoal, Perfumaria e Cosméticos: paronoma do setor atualizado 2023. Disponível em: < <https://abihpec.org.br/publicacao/panorama-do-setor/> >. Acesso em: 20/06/2023
- Aibeche C, Selami N, Zitouni-Haouar FE-H, Oeunzar K, Addou A, Kaid-Harche M, Djabeur A (2022) Bioremediation potential and lead removal capacity of heavy metal-tolerant yeasts isolated from Dayet Oum Ghellaz Lake water (northwest of Algeria). *Int Microbiol* 25, 61–73.
- Aman Mohammadi M, Ahangari H, Mousazadeh S, Hosseini SM, Dufossé L (2022) Microbial pigments as an alternative to synthetic dyes and food additives: a brief review of recent studies. *Bioprocess Biosyst Eng* 45, 1–12.
- Amorim-Carrilho KT, Cepeda A, Fente C, Regal P (2014) Review of methods for analysis of carotenoids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 56, 49–73.
- Andrade R, Lima R, Rubio Ribeaux D, Araújo H, Franco L, Pessoa A, Campos Takaki G (2016) Production of  $\beta$ -Carotene by a Newly Isolated *Rhodotorula Glutinis* UCP1555 Strain and Cytotoxic Effect Evaluation. *Journal of Chemistry and Chemical Engineering* 10, 212-220.
- Ashokkumar V, Flora G, Sevanan M, Sripriya R, Chen WH, Park J-H, Rajesh banu J, Kumar G (2023) Technological advances in the production of carotenoids and their applications– A critical review. *Bioresource Technology* 367, 128215.
- Barbosa MJR, Pereira TA (2020) DESENVOLVIMENTO DE ESMALTES COM PIGMENTOS NATURAIS. Dissertação (Trabalho de conclusão de curso) - Curso de Farmácia, Universidade de Uberaba, Minas Gerais, 41p.
- Bhosale M, Waghmode M, Patil N (2022) A Survey on Microbial Pigments: Production and Applications. *Gorteria* 35, 10
- Breierová E, Gregor T, Marová I, Čertík M, Kogan G (2008) Enhanced Antioxidant Formula Based on a Selenium-Supplemented Carotenoid-Producing Yeast Biomass. *Chemistry & Biodiversity* 5, 440–446.
- Buzzini P, Martini A, Gaetani M, Turchetti B, Pagnoni UM, 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, 687–692.
- Cañete-Gibas C, Wiederhold NP (2023) Mycology of Onychomycosis. *Clinical Microbiology Newsletter* 45, 11–17.
- Chen C-Y, Jesisca, Hsieh C, Lee D-J, Chang C-H, Chang J-S (2016) Production, extraction and stabilization of lutein from microalga *Chlorella sorokiniana* MB-1. *Bioresource Technology* 200, 500–505.
- Chew BP, Park JS, Wong MW, Wong TS (1999) A comparison of the anticancer activities of dietary beta-carotene, canthaxanthin and astaxanthin in mice in vivo. *Anticancer Res* 19, 1849–1853
- Cipolatti EP, Remedi RD, Sá C dos S, Rodrigues AB, Gonçalves Ramos JM, Veiga Burkert CA, Furlong EB, 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.
- Cooney JJ, Marks HW, Smith AM (1966) Isolation and Identification of Canthaxanthin from *Micrococcus roseus*. *Journal of Bacteriology* 92, 342–345.
- da Silva J, Honorato da Silva FL, Santos Ribeiro JE, Nóbrega de Melo DJ, Santos FA, 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.

- de Berker D (2013) Nail anatomy. *Clinics in Dermatology* 31, 509–515.
- de Menezes GCA, Amorim SS, Gonçalves VN, Godinho VM, Simões JC, Rosa CA, Rosa LH (2019) Diversity, Distribution, and Ecology of Fungi in the Seasonal Snow of Antarctica. *Microorganisms* 7, 445.
- Deorukhkar AA, Chander R, Ghosh SB, Sainis KB (2007) Identification of a red-pigmented bacterium producing a potent anti-tumor N-alkylated prodigiosin as *Serratia marcescens*. *Research in Microbiology* 158, 399–404.
- Dias Rodrigues TV, Amore TD, Teixeira EC, de Medeiros Burkert JF (2019) Carotenoid Production by *Rhodotorula mucilaginosa* in Batch and Fed-Batch Fermentation Using Agroindustrial Byproducts. *Food Technol Biotechnol* 57, 388–398.
- Dufossé L, Galaup P, Yaron A, Arad SM, Blanc P, Chidambara Murthy KN, Ravishankar GA (2005) Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Science & Technology* 16, 389–406.
- Durán M, Ponezi AN, Faljoni-Alario A, Teixeira MFS, Justo GZ, Durán N (2012) Potential applications of violacein: a microbial pigment. *Med Chem Res* 21, 1524–1532.
- Elsanhoty R, Al-Turki AI, M.M. A-R (2017) Production of carotenoids from *rhodotorula mucilaginosa* and their applications as colorant agent in sweet candy. 15, 21–26
- Fernández-Ruiz M, Guinea J, Puig-Asensio M, Zaragoza Ó, Almirante B, Cuenca-Estrella M, Aguado JM, CANDIPOP Project, GEIH-GEMICOMED (SEIMC) and REIPI (2017) Fungemia due to rare opportunistic yeasts: data from a population-based surveillance in Spain. *Medical Mycology* 55, 125–136.
- FIOCRUZ (2005) Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Procedimentos para manipulação de microrganismos patogênicos e/ou recombinantes na FIOCRUZ. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/documento/manual-de-biosseguranca-da-fiocruz>> Acesso em: 07/12/2022
- Fortune Business Insights (2020) Carotenoids Market Size share & COVID-19 Impact Analysis, By Type (Astaxanthin, Beta-carotene, Lutein, Zeaxanthin, Lycopene, Canthaxanthin, and others), Source (Synthetic and Natural), Application (Animal, Feed, Food & Beverages, Dietary Supplements, personal Care & Cosmetics, and Pharmaceuticals), and Regional Forecast, 2020 – 2027. Disponível em: <<https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/carotenoids-market-100180>> . Acesso em: 07/12/2022
- Ghilardi C, Sanmartin Negrete P, Carelli AA, Borroni V (2020) Evaluation of olive mill waste as substrate for carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Bioresources and Bioprocessing* 7, 52.
- Giovannucci E, Rimm EB, Liu Y, Stampfer MJ, Willett WC (2002) A Prospective Study of Tomato Products, Lycopene, and Prostate Cancer Risk. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 94, 391–398.
- Grune T, Lietz G, Palou A, Ross AC, Stahl W, Tang G, Thurnham D, Yin S, Biesalski HK (2010)  $\beta$ -Carotene Is an Important Vitamin A Source for Humans. *The Journal of Nutrition* 140, 2268S–2285S.
- Gualberto NC, Nogueira JP, Silva A de S da, Barbosa PF, Santana Matos CM, Rajan M, Santos Leite Neta MT, Narain N (2022) Optimization of the biotechnological process using *Rhodotorula mucilaginosa* and acerola (*Malpighia emarginata* L.) seeds for the production of bioactive compounds. *LWT* 160, 113190.
- Gul K, Tak A, Singh AK, Singh P, Yousuf B, Wani AA (2015) Chemistry, encapsulation, and health benefits of  $\beta$ -carotene - A review. *Cogent Food & Agriculture* 1, 1018696.
- Gupta PL, Rajput M, Oza T, Trivedi U, Sanghvi G (2019) Eminence of Microbial Products in Cosmetic Industry. *Nat Prod Bioprospect* 9, 267–278.
- Hof H (2019) *Rhodotorula* spp. in the gut – foe or friend? *GMS Infect Dis* 7, Doc02.
- Hsu L-C, Hsu Y-W, Liang Y-H, Kuo Y-H, Pan T-M (2011) Anti-tumor and Anti-inflammatory Properties of Ankaflavin and Monaphilone A from *Monascus purpureus* NTU 568. *J Agric Food Chem* 59, 1124–1130.
- Huang Y, Meng R, Tan J (2022) *The Impact of Health Consciousness on Organic Lipstick Market*. Atlantis Press, pp 157–164
- Igreja WS, Maia F de A, Lopes AS, Chisté RC (2021) Biotechnological Production of Carotenoids Using Low Cost-Substrates Is Influenced by Cultivation Parameters: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 8819.

- Ioannou P, Vamvoukaki R, Samonis G (2019) Rhodotorula species infections in humans: A systematic review. *Mycoses* 62, 90–100.
- Jarros IC, Veiga FF, Corrêa JL, Barros ILE, Gadelha MC, Voidaleski MF, Perialisi N, Pedroso RB, Vicente VA, Negri M, Svidzinski TIE (2020) Microbiological and virulence aspects of *Rhodotorula mucilaginosa*. *EXCLI J* 19, 687–704
- Keceli TM, Erginkaya Z, Turkkan E, Kaya U (2013) Antioxidant and antibacterial effects of carotenoids extracted from *Rhodotorula glutinis* strains. *Asian Journal of Chemistry* 25, 42–46
- Kiki MJ (2023) Biopigments of Microbial Origin and Their Application in the Cosmetic Industry. *Cosmetics* 10, 47.
- Kot AM, Błażej S, Gientka I, Kieliszek M, Bryś J (2018) Torulene and torularhodin: “new” fungal carotenoids for industry? *Microbial Cell Factories* 17, 49.
- Li H, Huang L, Zhang Y, Yan Y (2020) Production, Characterization and Immunomodulatory Activity of an Extracellular Polysaccharide from *Rhodotorula mucilaginosa* YL-1 Isolated from Sea Salt Field. *Marine Drugs* 18, 595.
- Li S, Tang X, Lu Y, Xu J, Chen J, Chen H (2021) An improved method for the separation of carotenoids and carotenoid isomers by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 44, 539–548.
- Li Z, Li C, Cheng P, Yu G (2022) *Rhodotorula mucilaginosa*—alternative sources of natural carotenoids, lipids, and enzymes for industrial use. *Heliyon* 8, e11505.
- Liu C, Hu B, Cheng Y, Guo Y, Yao W, Qian H (2021) Carotenoids from fungi and microalgae: A review on their recent production, extraction, and developments. *Bioresource Technology* 337, 125398.
- Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D (1997) Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *Journal of Neurochemistry* 69, 581–593.
- Lopes FC, Ligabue-Braun R (2021) Agro-Industrial Residues: Eco-Friendly and Inexpensive Substrates for Microbial Pigments Production. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 5
- Lopes NA, Remedi RD, dos Santos Sá C, Burkert CAV, de Medeiros Burkert JF (2017) Different cell disruption methods for obtaining carotenoids by *Sporidiobolus pararoseus* and *Rhodotorula mucilaginosa*. *Food Sci Biotechnol* 26, 759–766.
- Lorquin J, Molouba F, Dreyfus BL (1997) Identification of the carotenoid pigment canthaxanthin from photosynthetic bradyrhizobium strains. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1151–1154.
- Lyu X, Lyu Y, Yu H, Chen W, Ye L, Yang R (2022) Biotechnological advances for improving natural pigment production: a state-of-the-art review. *Bioresources and Bioprocessing* 9.1, 1-38.
- Madhour A, Anke H, Mucci A, Davoli P, Weber RWS (2005) Biosynthesis of the xanthophyll plectanixanthin as a stress response in the red yeast *Dioszegia* (Tremellales, Heterobasidiomycetes, Fungi). *Phytochemistry* 66, 2617–2626.
- Maldonado IR, Rodriguez-Amaya DB, Scamparini ARP (2008) Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. *Food Chemistry* 107, 145–150.
- Mannazzu I, Landolfo S, da Silva TL, Buzzini P (2015) Red yeasts and carotenoid production: outlining a future for non-conventional yeasts of biotechnological interest. *World J Microbiol Biotechnol* 31, 1665–1673.
- Mapelli-Brahm P, Barba FJ, Remize F, Garcia C, Fessard A, Mousavi Khaneghah A, Sant’Ana AS, Lorenzo JM, Montesano D, Meléndez-Martínez AJ (2020) The impact of fermentation processes on the production, retention and bioavailability of carotenoids: An overview. *Trends in Food Science & Technology* 99, 389–401.
- Martins A, Vieira H, Gaspar H, Santos S (2014) Marketed Marine Natural Products in the Pharmaceutical and Cosmeceutical Industries: Tips for Success. *Marine Drugs* 12, 1066–1101.
- Martins, Renata (2019) Marca pioneira em miniesmalte no Brasil, 5cinco completa cinquenta anos. *Brazil Beauty News*, 15 jul. 2019. Disponível em: < <https://www.brazilbeautynews.com/marca-pioneira-em-miniesmaltes-no-brasil-5cinco,3206#> > Acesso em: 22/12/2022
- Mata-Gómez LC, Montañez JC, Méndez-Zavala A, Aguilar CN (2014) Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories* 13, 1 -11.

- Mazotto AM, Couri S, Damaso MCT, Vermelho AB (2013) Degradation of feather waste by *Aspergillus niger* keratinases: Comparison of submerged and solid-state fermentation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 85, 189–195.
- Meléndez-Martínez AJ, Mandić AI, Bantis F, Böhm V, Borge GIA, Brnčić M, Bysted A, Cano MP, Dias MG, Elgersma A, Fikselová M, García-Alonso J, Giuffrida D, Gonçalves VSS, Hornero-Méndez D, Kljak K, Lavelli V, Manganaris GA, Mapelli-Brahm P, Marounek M, Olmedilla-Alonso B, Periago-Castón MJ, Pinteá A, Sheehan JJ, Tumbas Šaponjac V, Valšíková-Frey M, Meulebroek LV, O'Brien N (2022) A comprehensive review on carotenoids in foods and feeds: status quo, applications, patents, and research needs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 62, 1999–2049.
- Mohd Nor F, Tan LH, Na SL, Ng KP (2015) Meningitis Caused by *Rhodotorula mucilaginosa* in HIV-Infected Patient: A Case Report and Review of the Literature. *Mycopathologia* 180, 95–98.
- Moliné M, Libkind D, van Broock M (2012) Production of Torularhodin, Torulene, and  $\beta$ -Carotene by *Rhodotorula* Yeasts. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) 898, 275–83.
- Mussagy CU, Khan S, Kot AM (2022) Current developments on the application of microbial carotenoids as an alternative to synthetic pigments. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 62, 6932–6946.
- Mussagy CU, Winterburn J, Santos-Ebinuma VC, Pereira JFB (2019) Production and extraction of carotenoids produced by microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 103, 1095–1114.
- Nawaz A, Chaudhary R, Shah Z, Dufossé L, Fouillaud M, Mukhtar H, ul Haq I (2021) An Overview on Industrial and Medical Applications of Bio-Pigments Synthesized by Marine Bacteria. *Microorganisms* 9, 11.
- Nigam PS, Luke JS (2016) Food additives: production of microbial pigments and their antioxidant properties. *Current Opinion in Food Science* 7, 93–100.
- Paillière-Jiménez ME, Stincone P, Brandelli A (2020) Natural Pigments of Microbial Origin. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 4, 590439
- Papapostolou H, Kachrimanidou V, Alexandri M, Plessas S, Papadaki A, Kopsahelis N (2023) Natural Carotenoids: Recent Advances on Separation from Microbial Biomass and Methods of Analysis. *Antioxidants* 12, 1030.
- Park PK, Kim EY, Chu KH (2007) Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments. *Separation and Purification Technology* 53, 148–152.
- Paul D, Kumari PK, Siddiqui N (2023) Yeast Carotenoids, Cost-Effective Fermentation Strategies for Health Care Applications. *Fermentation* 9, 147.
- Paul K, Saha C, Nag M, Mandal D, Naiya H, Sen D, Mitra S, Kumar M, Bose D, Mukherjee G, Naskar N, Lahiri S, Das Ghosh U, Tripathi S, Sarkar MP, Banerjee M, Kleinert A, Valentine AJ, Tripathy S, Sinharoy S, Seal A (2020) A Tripartite Interaction among the Basidiomycete *Rhodotorula mucilaginosa*, N<sub>2</sub>-Fixing Endobacteria, and Rice Improves Plant Nitrogen Nutrition. *The Plant Cell* 32, 486–507.
- Ram S, Mitra M, Shah F, Tirkey SR, Mishra S (2020) Bacteria as an alternate biofactory for carotenoid production: A review of its applications, opportunities and challenges. *Journal of Functional Foods* 67, 103867.
- Ramesh C, Vinithkumar NV, Kirubakaran R, Venil CK, Dufossé L (2019) Multifaceted Applications of Microbial Pigments: Current Knowledge, Challenges and Future Directions for Public Health Implications. *Microorganisms* 7, 186.
- Ramírez J, Nuñez ML, Valdivia R (2000) Increased astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant grown on date juice from *Yucca fillifera*. *J Ind Microbiol Biotech* 24, 187–190.
- Rapoport A, Guzhova I, Bernetti L, Buzzini P, Kieliszek M, Kot AM (2021) Carotenoids and Some Other Pigments from Fungi and Yeasts. *Metabolites* 11, 92.
- Reis-Mansur MCPP, Cardoso-Rurr JS, Silva JVMA, de Souza GR, Cardoso V da S, Mansoldo FRP, Pinheiro Y, Schultz J, Lopez Balottin LB, da Silva AJR, Lage C, dos Santos EP, Rosado AS, Vermelho AB (2019) Carotenoids from UV-resistant Antarctic Microbacterium sp. LEMMJ01. *Sci Rep* 9, 9554.
- Reyes FGR, Valim MFCFA, Vercesi AE (1996) Effect of organic synthetic food colours on mitochondrial respiration. *Food Additives & Contaminants* 13, 5–11.

- Sadat Naghavi F, Hanachi P, Soudi MR, Saboora A, Ghorbani A (2013) Evaluation of the Relationship between the Incubation Time and Carotenoid Production in *Rhodotorula slooffiae* and *R. mucilaginosa* Isolated from Leather Tanning Wastewater. *Iran J Basic Med Sci* 16, 1114–1118
- Saini RK, Keum Y-S (2019) Microbial platforms to produce commercially vital carotenoids at industrial scale: an updated review of critical issues. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 46, 657–674.
- 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, 338–340.
- Sandmann G (2001) Carotenoid Biosynthesis and Biotechnological Application. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 385, 4–12.
- Sen T, Barrow CJ, Deshmukh SK (2019) Microbial Pigments in the Food Industry—Challenges and the Way Forward. *Frontiers in Nutrition* 6
- Sharma R, Ghoshal G (2021) Characterization and cytotoxic activity of pigment extracted from *Rhodotorula mucilaginosa* to assess its potential as bio-functional additive in confectionary products. *J Food Sci Technol* 58, 2688–2698.
- Solehin SN, Kamarudin KR, Badrulhisham NS, Rehan Aisyah M (2020) Production of Natural Food Colourants Using Food Grade Microbial Pigments: A New Focus in Industrial Microbiology. *Journal of Sustainable Natural Resources* 1, 1–14
- Squina FM, Mercadante AZ (2003) Análise, por CLAE, de carotenóides de cinco linhagens de *Rhodotorula*. *Rev Bras Cienc Farm* 39, 309-318.
- Stahl W, Sies H (2005) Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1740, 101–107.
- Tuli HS, Chaudhary P, Beniwal V, Sharma AK (2015) Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. *J Food Sci Technol* 52, 4669–4678.
- Ungureanu C, Ferdes M (2012) Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Torularhodin. *Advanced Science Letters* 18, 50–53.
- Venil CK, Dufossé L, Renuka Devi P (2020) Bacterial Pigments: Sustainable Compounds With Market Potential for Pharma and Food Industry. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 4, 100.
- Villoutreix J (1960) Les caroténoïdes de *Rhodotorula mucilaginosa* étude de leur biosynthèse a l'aide de l'analyse de mutants et de l'emploi d'un inhibiteur de la caroténogénèse. *Biochimica et Biophysica Acta* 40, 442–457.
- Wang L, Liu Z, Jiang H, Mao X (2021) Biotechnology advances in  $\beta$ -carotene production by microorganisms. *Trends in Food Science & Technology* 111, 322–332.
- Yabuzaki J (2017) Carotenoids Database: structures, chemical fingerprints and distribution among organisms. Database 2017, bax004.
- Yokoyama A, Miki W (1995) Composition and presumed biosynthetic pathway of carotenoids in the astaxanthin-producing bacterium *Agrobacterium aurantiacum*. *FEMS Microbiology Letters* 128, 139–144.
- Zerin I, Farzana N, Muhammad Sayem A, Anang DM, Haider J (2019) Potentials of Natural Dyes for Textile applications. In: Hashmi S (ed). Elsevier