



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
COORDENAÇÃO DO CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA
TRABALHO FINAL DE CURSO

WILLYAN ARAÚJO DA COSTA

**PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR *Rhodotorula mucilaginosa*
UTILIZANDO O BAGAÇO DO SISAL COMO FONTE DE CARBONO**

João pessoa – PB
2017.

WILLYAN ARAÚJO DA COSTA

**PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR *Rhodotorula mucilaginosa*
UTILIZANDO O BAGAÇO DO SISAL COMO FONTE DE CARBONO**

Trabalho final de curso apresentado à coordenação do curso de Engenharia Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sharline Florentino de Melo Santos.
Coorientador: Prof^o. Dr^o. Flávio Luiz Honorato da Silva.

João pessoa – PB
2017.

C837p Costa, Willyan Araújo da

Produção de carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando o bagaço do sisal como fonte de carbono./ Willyan Araújo da Costa. – João Pessoa, 2017.

47f. il.:

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sharline Florentino de Melo Santos
Coorientador: Prof^o. Dr^o. Flávio Luiz Honorato da Silva

Monografia (Curso de Graduação em Engenharia Química) Campus I - UFPB / Universidade Federal da Paraíba.

1. Bioprocessos 2. Fermentação 3. *Rhodotorula mucilaginosa* 4. Cinética de crescimento 5. Carotenoides 6. Bagaço do sisal.

WILLYAN ARAÚJO DA COSTA

**PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR *Rhodotorula mucilaginosa*
UTILIZANDO O BAGAÇO DO SISAL COMO FONTE DE CARBONO**

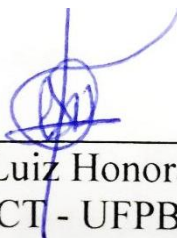
Trabalho de final de curso (TFC) apresentado à Coordenação do Curso de Engenharia Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Aprovado em 21 de Outubro de 2017.

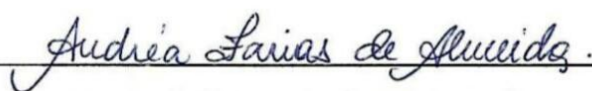
BANCA EXAMINADORA



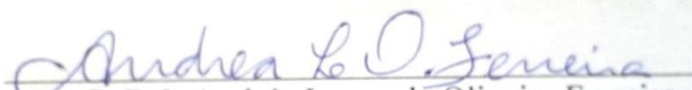
Prof^a. Dr^a. Sharline Florentino de Melo Santos
DEQ - CT - UFPB
Orientadora



Prof^o. Dr^o. Flávio Luiz Honorato da Silva
DEQ - CT - UFPB
Coorientador



Prof^a. Dr^a. Andréa Farias de Almeida
DB - CBIOTEC - UFPB
Examinadora



Prof^a. Dr^a. Andréa Lopes de Oliveira Ferreira
DEQ - CT - UFPB
Examinador

AGRADECIMENTOS

Sinto-me no dever de iniciar meus agradecimentos por aquele que é a fonte primária da minha força e vida, DEUS, sem o qual eu não viveria nem teria a capacidade de ir em frente por nada! Ao mestre Jesus por toda iluminação, discernimento, inspiração e orações ouvidas, também agradeço muito!

Agradeço ao meu papai, Robson Costa, por todo carinho, amor e dedicação. Reconheço todo esforço e empenho e sou consciente de que tudo foi feito para que meu bem-estar estivesse sempre acima de tudo. À minha mamãe, Ângela Batista, por sempre abdicar de tudo por mim e me encher de amor a ponto de não me permitir, por muitos anos, sentir o quão duro o mundo é. Obrigado, meus amores!

Meus irmãos, Wendel Costa e Jessicka Batista, amo muito vocês e do meu jeito eu tento expressar esse sentimento que é maior do que o meu ser. Obrigado por toda ajuda e por me fazerem sentir especial sempre! À Titia Marlene Costa (Tia linda e jovem!), por todo carinho e admiração depositados a mim, também sou grato, querida!

Aos meus avós paternos, vovó Hilda e Vovô Genival, e à minha avó materna, vovó Maria, muito obrigado!

Agradeço aos meus amigos de jornada acadêmicas: Rhayane, Ana Amélia, Débora e Maxsuel, que nos primórdios me foram de grande companhia! Na segunda etapa da minha vida universitária, agradeço a: Natane, Elayne, Bruna, Renata, Priscylla e Debrinha por serem minhas amigas e tornarem meus dias na universidade tão suaves!

Agradeço aos meus professores desde o primário até o ensino médio, vocês construíram muito do que sou hoje! No âmbito acadêmico agradeço a todos, mas em especial, aos seguintes mestres: Fabiola, Alfredo, Sharline, Vivian, Maria de Fátima e Flávio por servirem de inspiração e exemplo. Espero um dia chegar a ser 1/3 do que vocês são, admiro muito!

Aos colegas do LaBio, obrigado pelo companheirismo de sempre! Em especial, Josevan (O Chefe) por toda ajuda e orientação, Lorena pela sabedoria e amizade compartilhada e Andressa pela amizade.

Por fim, agradeço à vida! Ela é sábia e mestra no que faz. Se faço o que faço, é porque ela me fez assim e sou muito grato pois me amo no sentido amplo do que sou!

“Se não quiser me olhar, vira de costas!” - **Anitta (2014)**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho com todo meu amor aos meus pais e irmãos que, com carinho e paciência, são meus companheiros nessa viagem chamada vida... À minha maneira, eu amo vocês mais que tudo!

RESUMO

Os carotenoides são corantes naturais produzidos por diferentes organismos vivos tais como algas, plantas e uma vasta gama de seres unicelulares, via ação metabólica. A literatura tem mostrado que há uma aplicação bastante diversificada para tais bioativos em vários setores da indústria, como na pigmentação e enriquecimento de alimentos, suplementação de ração animal e composição de fármacos. A rota de obtenção por via microbiológica tem se mostrado uma alternativa bastante interessante uma vez que a condução de tal processo não necessita de uma grande área operacional e não está condicionada às intempéries ambientais. Além disso, a síntese biotecnológica promove uma conotação natural e biologicamente amigável, do ponto de vista do consumo humano, ao produto final. Tendo em vista a grande relevância que tais produtos de origem microbiológica vêm recebendo nas últimas décadas, o presente trabalho estudou a avaliação do uso do bagaço do sisal como substrato na produção biotecnológica de carotenoides. Os seguintes teores de umidade, lignina, hemicelulose, celulose e cinzas foram obtidos na caracterização do material por análise termogravimétrica: 11,15%, 12,75%, 20,16%, 17,92% e 6,72%, respectivamente. Na etapa de tratamento ácido, a condição que forneceu uma maior concentração de açúcares fermentescíveis, 28,97 g/L, foi realizada utilizando-se 5,5% de H₂SO₄ e 3h de reação em autoclave a uma proporção de 1:10 (m/v). A detoxificação do hidrolisado promoveu um percentual de remoção de ácido acético equivalente a 100%. A análise do crescimento da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* também foi realizada, obtendo-se os seguintes parâmetros cinéticos, para o cultivo em hidrolisado detoxificado e para o não tratado: produtividade em células (P_x): 0,0489 e 0,0201 g/L.h, velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{máx}$): 0,1983 e 0,1772 h⁻¹, tempo de geração (T_g): 3,50 e 3,91 h e fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$): 0,8859 e 0,5576 g/g.

Palavras-chaves: Bagaço do sisal, Carotenoides, Produção biotecnológica e Cinética de crescimento.

ABSTRACT

The carotenoids are natural pigments produced by different kinds of organisms like algae, plants and a large group of unicellular beings, by metabolic action. The literature has been shown that there is a large application for it in so much parts of the industry how the pigmentation and food nutritional enrichment, animal food supplementation and pharmaceuticals formulation. The microbiological synthesis rout has been shown that it be a great option because there is no need of a great area of cultivation and not correlation with the climate changes. Besides that, the microbiological synthesis give a natural and biological friendly connotation to the product. In view of the big relevance of it microbiological products in the last decade, this academic work studied the evaluation of the sisal pulp like subtract in the carotenoids biological production. The follow percentages of moisture, lignin, hemicellulose, cellulose and ashes, were obtained by thermogravimetric analysis: 11.15%, 12.75%, 20.16%, 17.92% and 6.72%, respectively. In the acid pretreatment stage, the condition who given the best reducer sugar concentration, 28.97 g/L, it was made using 5.5% of sulfuric acid and 3 h of reaction in autoclave using the 1:10 (m/v) proportion of biomass and acid. The licor detoxification given a removal percentage of acetic acid near of 100%. The growth analysis of the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* were realized too, in the treated licor and in no treated hydrolyzed, and were obtained the follows kinetics parameters: cells productivity (P_x): 0.0489 and 0.0201 g/L.h, specific growth velocity (μ_{max}): 0.1983 and 0.1772 h⁻¹, duplication time (T_g): 3.50 and 3.91 h and conversion factor of subtract into cells ($Y_{x/s}$): 0.8859 and 0.5576 g/g .

Key Words: Sisal pulp, Carotenoids, Biotechnological production and Growth kinetics.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivos gerais	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. ASPECTOS TEÓRICOS	18
3.1 Carotenoides	18
3.2 Síntese microbiológica de carotenoides	19
3.3 Emprego de resíduos como fonte de carbono para bioprocessos	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Caracterização lignocelulósica por termogravimetria (TG)	23
4.2 Avaliação do tratamento ácido do bagaço do sisal	24
4.3 Detoxificação do licor hemicelulósico	24
4.4 Quantificação dos açúcares gerados pelo tratamento ácido	25
4.4.1 Quantificação do teor de açúcares fermentescíveis por espectrofotometria ..	25
4.4.2 Caracterização dos açúcares redutores contidos no hidrolisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	26
4.5 Microrganismo	26
4.6 Processo fermentativo	27
4.6.1 Produtividade em Células	28
4.6.2 Velocidade específica máxima de crescimento	28
4.6.3 Tempo de geração	28
4.6.4 Fator de conversão de substrato em células	29
4.7 Extração e quantificação dos carotenoides obtidos	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
5.1 Caracterização termogravimétrica do bagaço do sisal	31
5.2 Obtenção da melhor condição de tratamento ácido	32
5.3. Detoxificação do licor hidrolisado de bagaço de sisal	36
5.3 Avaliação do processo fermentativo	37
5.4 Resultado da quantificação dos carotenoides produzidos	40
6. CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sisal (Agave sisalana).....	16
Figura 2: Algumas moléculas de carotenos e xantofilas	18
Figura 3: Representação da estruturação lignocelulósica das biomassas.....	21
Figura 4: Bagaço do sisal utilizado na pesquisa.....	23
Figura 5: Balança termogravimétrica utilizada na análise	23
Figura 6: Autoclave utilizada nos ensaios.....	24
Figura 7: Repique de <i>R. mucilaginosa</i>	26
Figura 8: Análise termogravimétrica do bagaço do sisal	31
Figura 9: Diagrama de Pareto para variáveis concentração de ácido e tempo de hidrólise do bagaço de sisal	34
Figura 10: Superfície de resposta para concentração de ácido sulfúrico e tempo de hidrólise do bagaço de sisal	35
Figura 11: Hidrolisado da Agave pré e pós-adsorção em cada condição avaliada	37
Figura 12: Perfis de crescimento da levedura <i>R. mucilaginosa</i>	38
Figura 13: Perfis de consumo de açúcares redutores	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Condições de avaliação da hidrólise ácida	24
Tabela 2: Composição do meio Y. M. A.....	27
Tabela 3: Composição do meio de crescimento	27
Tabela 4: Resultados obtidos na avaliação da hidrólise ácida do bagaço do sisal	32
Tabela 5 Análise estatística dos efeitos	33
Tabela 6 Análise estatística do modelo matemático.....	33
Tabela 7: Caracterização do hidrolisado hemicelulósico	36
Tabela 8: Resultado da adsorção nas condições estudadas	37
Tabela 9: Parâmetros cinéticos.....	39

1. INTRODUÇÃO

Dentro do novo contexto da dinâmica socioeconômica que a indústria mundial vem tomando e os novos rumos seguidos pela ciência e tecnologia, torna-se evidente a necessidade de investimentos na produção de bioprodutos que venham a acrescentar de forma significativa à sociedade.

Os carotenoides são corantes naturais produzidos por diferentes organismos vivos tais como algas, plantas e uma vasta gama de seres unicelulares, via ação metabólica. A literatura tem mostrado que há uma aplicação bastante diversificada para tais bioativos em vários setores da indústria, como na pigmentação e enriquecimento de alimentos, suplementação de ração animal e composição de fármacos (VALDUGA *et al.*, 2009). De um modo geral, a ação desses compostos no metabolismo humano tem despertado o interesse de vários pesquisadores uma vez que estes já foram associados à prevenção de doenças cardiovasculares e algumas enfermidades degenerativas (NIIZU, 2003). Dados apontam que a indústria de alimento investe grandemente na suplementação destes compostos em seus produtos e o mercado mundial nesse setor movimentava cerca de \$935 bilhões por ano (MAROVA *et al.*, 2012).

Na natureza, essas moléculas são encontradas nos alimentos que apresentam cor amarela, laranja ou vermelha, como frutas, gema do ovo, truta e salmão. Além disso, alimentos ricos em tais constituintes são mencionados diretamente em publicações científicas por atuarem enfaticamente na inibição de doenças onde a ação de radicais livres é bastante ativa, como a arteriosclerose, degeneração muscular, esclerose múltipla e alguns tipos de câncer (MALDONADE *et al.*, 2008).

Do ponto de vista químico, os carotenoides são tetra isoprenoides lipofílicos e na natureza eles são encontrados em duas classes, sendo elas: os carotenos, tais como o β -caroteno, que são hidrocarbonetos lineares que podem apresentar configuração ciclizada em uma, ou ambas, extremidades moleculares. A outra classe é a dos derivados oxigenados dos próprios carotenos, como a luteína, neoxantina e zeaxantina. Tal categoria recebe a denominação de xantofilas (BOTTELLA-PAÍVA & RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN, 2006).

A rota de obtenção por via microbiológica tem se mostrado uma alternativa bastante interessante uma vez que a condução de tal processo não necessita de uma

grande área operacional e não está condicionada às intemperes ambientais. Além disso, a síntese biotecnológica promove uma conotação natural e biologicamente amigável, do ponto de vista do consumo humano, ao produto final (SILVA, 2009).

Apesar de muitos microrganismos produzirem carotenoides, nem todos são interessantes industrialmente devido à produção de coprodutos tóxicos pelo metabolismo dos mesmos e a necessidade de substratos bastante específicos e dispendiosos. Segundo Valduga *et al* (2009), neste contexto, pesquisas vêm mostrando que as leveduras são as mais adequadas para tal intento uma vez que as mesmas são passivas de serem cultivadas em vários substratos de baixo valor agregado, sendo as principais influências à manutenção do crescimento das mesmas: composição do substrato, pH, taxa de aeração, temperatura e luminosidade. Logo, a otimização de tais condições é a chave central por trás da ampliação da comercialização e competitividade dos pigmentos biotecnologicamente obtidos frente aos sintéticos (BANZATTO *et al.*, 2013).

Dentre os microrganismos capazes de produzir tais substâncias via ação metabólica, destacam-se os seguintes: *Rhodotorula*, *Phaffia rhodozyma*, *Sporobolomyces*, *Blakeslea trispora* e *Haematococcus pluvialis*, a proporção e tipo de carotenoides produzidos pelos mesmos pode variar de acordo com o gênero e condição de cultivo. Sendo que os mais investigados são a astaxantina, β -caroteno, cantaxantina, toruleno e licopeno (VALDUGA *et al.*, 2009).

O ponto principal por trás da diminuição dos custos atrelados à condução de bioprocessos, em geral e na síntese de carotenoides, está na busca por fontes alternativas de carbono uma vez que este é o fator que atua como principal responsável por promover energia e crescimento aos microrganismos. Logo, o uso de resíduos agroindustriais vem crescendo fortemente nos últimos anos.

À medida que o conceito de sustentabilidade vem sendo difundido no meio industrial, o emprego de resíduos como matéria prima para a produção biotecnológica de produtos fermentados vem se consolidando cada vez mais. Esses resíduos apresentam uma composição bem característica, são os chamados materiais lignocelulósicos, pois os mesmos possuem em sua composição bioquímica basicamente: celulose, lignina e hemicelulose em proporções que variam para cada tipo de material e época/local de cultivo (CANILHA,*et al.*, 2012). Um representante dessa classe de

resíduos é o bagaço do sisal (*Agave sisalana*). A utilização dessa matriz como matéria-prima para a manutenção de processos microbiológicos se mostra viável tendo como base a proporção dos polímeros orgânicos que o compõem a sua estruturação, uma vez que a mesma apresenta um menor teor de lignina frente outras biomassas, o que viabiliza o processo de liberação de açúcares fermentescíveis por mecanismo de hidrolise (MARTIN, *et al.*, 2009).

Figura 1: Sisal (*Agave sisalana*)



Fonte: Arquivo do autor

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar o crescimento da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* e a produção metabólica de carotenoides, através da extração e quantificação dos mesmos, utilizando como fonte de carbono o bagaço do sisal hidrolisado.

2.2 Objetivos específicos

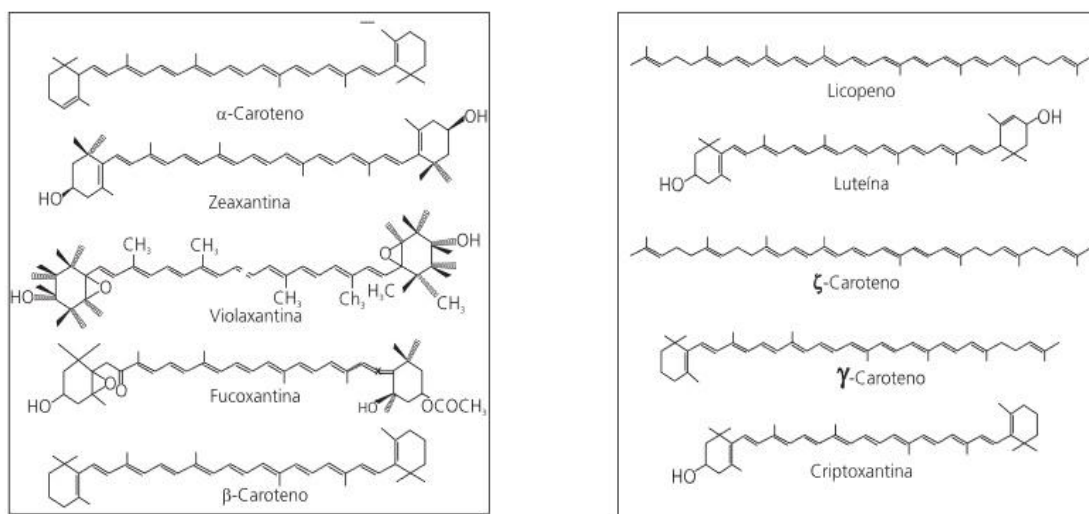
- a) Realizar a caracterização lignocelulósica do bagaço do sisal.
- b) Avaliar e obter a melhor condição de tratamento ácido da matriz lignocelulósica em questão.
- c) Obter os parâmetros da cinética de crescimento da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* tais como: velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$), tempo de geração (T_g), fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) e a produtividade em células (P_x), no substrato aqui estudado.
- d) Extrair e quantificar os carotenoides produzidos.
- e) Avaliar a aplicação do bagaço do sisal como substrato na produção de carotenoides e processos biotecnológicos em geral.

3. ASPECTOS TEÓRICOS

3.1 Carotenoides

Segundo Ambrósio, Campos & Faro (2006), carotenoides são tetraterpenóides que possuem, em geral, 40 átomos de carbono e conferem, ao meio no qual estejam inseridos, a coloração amarela, laranja ou vermelha. Podem ser tanto encontrados nas plantas quanto nos seres unicelulares como algas e microrganismos. Tais compostos podem ser classificados como carotenos ou xantofilas. Os carotenos são moléculas orgânicas constituídas basicamente de carbono e hidrogênio e podem apresentar em sua estrutura molecular diferentes graus de insaturação. Já as xantofilas, são moléculas sintetizadas a partir dos carotenos por meio de uma reação de hidroxilação e epoxidação.

Figura 2: Algumas moléculas de carotenos e xantofilas



Fonte: Ambrósio, Campos & Faro (2006)

Os carotenoides compõem uma das classes mais importantes de compostos com atividade antioxidativa. Esse grupo é composto por mais de 600 moléculas, já catalogadas, sintetizadas por alguma atividade metabólica. A parte mais importante, do ponto de vista molecular, de tais constituintes é a sua sequência de duplas ligações. Tal fato é responsável por conferir sua principal característica, a coloração (IRAZUSTA *et al.*, 2013).

A ingestão de alimentos ricos nesses pigmentos naturais é vista como benéfica e válida por parte dos nutricionistas uma vez que há uma correlação direta entre tal consumo e o melhoramento do ganho de peso e manutenção da saúde de bebês e gestantes em condições de risco já que esses constituintes químicos são precursores da vitamina A no organismo humano (THORNE-LYMAN & FAWZI, 2012). Outros estudos ainda correlacionam o aumento da concentração de carotenoides no organismo humano com a diminuição dos riscos de desenvolvimento de câncer de mama (AUNE *et al.*, 2012).

Com relação aos seres unicelulares, tetraterpenóides atuam na proteção da membrana celular devido à sua ação antioxidante combatendo radicais livres que venham a danificar tal estrutura (MAROVA *et al.*, 2012).

3.2 Síntese microbiológica de carotenoides

É notório que nos últimos anos houve um aumento considerável na procura por produtos, em especial no setor alimentício e farmacológico, que tenham a conotação de “naturais” e/ou “verdes”. Neste sentido, os produtos gerados pela ação do metabolismo microbiano vêm sendo cada vez mais bem quistos por meio do mercado o que faz com que os investimentos na otimização de bioprocessos venha sendo o alvo central de inúmeras pesquisas no setor industrial.

Na indústria de alimentos, setor onde o emprego de bioprodutos em geral é muito grande, vem crescendo uma tendência mundial que visa regular, por meio de legislações cada vez mais severas, o uso indiscriminado de compostos sintéticos e isso tem promovido a substituição dos mesmos por homólogos de origem natural, como os carotenoides obtidos por via biotecnológica (MAROVA, *et al.*, 2012).

A produção desses componentes por fermentação vem se tornando o objeto principal de estudos e a literatura reporta que para torná-los comercialmente competitivos com os obtidos por via química é necessário o aprimoramento e desenvolvimento de processos que utilizem substratos residuais como fonte de nutrientes, tais como: melão, extrato de bagaços de frutas, soro residual de leite e glicerol (AKSU & EREN, 2005).

Dentre todos os gêneros sintetizadores de carotenoides, o *Rhodotorula* tem se mostrado um proeminente precursor de modo que é sempre mencionado quando o assunto é a produção de tais biomoléculas. Tal característica é correlata ao fato dessas

leveduras terem uma boa taxa de produção de células, acúmulo de biocompostos e fácil crescimento em fontes alternativas de substrato (BANZATTO, *et al.*, 2013).

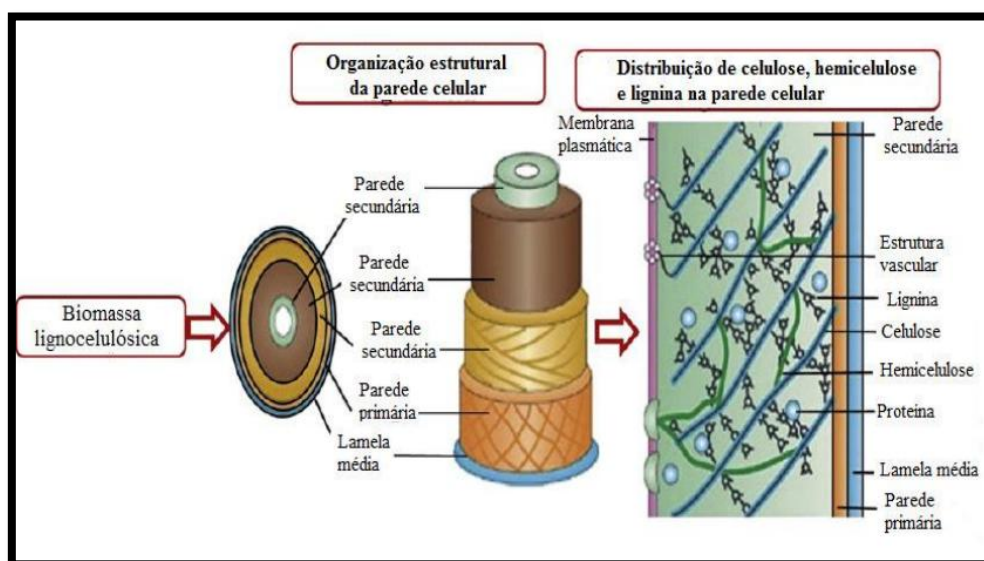
A *Rhodotorula mucilaginosa* é a principal representante da classe quando o assunto é produção de tetraterpenóides. O acúmulo de metabolitos de interesse comercial por parte das mesmas é variável de acordo com a origem e característica gênica da cepa. As espécies de *R. mucilaginosa* são bastante heterogêneas entre si, apresentam uma grande diversidade fenotípica e genética (LIBKIND, *et al.*, 2008).

Os principais parâmetros operacionais que influenciam na biossíntese de carotenoides por essa levedura são: concentração e tipo da fonte de carbono e nitrogênio, taxa de aeração, temperatura, estresse salino e oxidativo (LUKACS, *et al.*, 2006). O estresse oxidativo que mais influencia no acúmulo das moléculas de interesse é a incidência de luminosidade sobre o meio de cultivo já que o metabolismo microbiano responde ao mesmo sintetizando mais carotenoides no intuito de promover a fotoproteção da estrutura celular como um todo e isso é reportado em diversos estudos e pesquisas (MOLINÉ, *et al.*, 2010 e IRAZUSTA, *et al.*, 2013).

3.3 Emprego de resíduos como fonte de carbono para bioprocessos

Em uma concepção mais ampla, entende-se por material lignocelulósico toda biomassa que é composta por alguns polímeros estruturais orgânicos específicos, sendo eles: lignina, celulose e hemicelulose. Tais macromoléculas são constituídas por unidades monoméricas predominantemente representada pelo grupo dos carboidratos de seis carbonos, hexoses, a exemplo da glicose e pentoses, carboidratos de cinco carbonos, tendo como principal representante a xilose (CORMA *et al.*, 2007). O aspecto majoritário por trás do crescente interesse no emprego dessas matrizes na geração de outros produtos é o fato das mesmas serem tidas como uma fonte energética natural e renovável (YU *et al.*, 2008).

Um bom representante dessa classe de materiais é o sisal (*Agave sisalana*), que é de grande relevância econômica em regiões áridas como o Nordeste brasileiro, onde sua exploração é concentrada no interior dos Estados da Bahia (87%), Paraíba (7,4%) e Rio Grande do Norte (5,2%) (SILVA, *et al.*, 2008).

Figura 3: Representação da estruturação lignocelulósica das biomassas

Fonte: Medeiros (2015, apud Meon & Rao, 2012)

No mundo, a produção de sisal ultrapassa a marca de 400 mil toneladas anualmente e só no Brasil, em 2014, foram produzidas 95,4 mil toneladas, dados do Ministério da Agricultura do país. Tal atividade gera em torno de 391 mil toneladas de rejeitos não aproveitáveis. A indústria do sisal atualmente utiliza apenas 4% da sua folha para a produção de fibra e o resíduo, na maioria dos casos, é descartado de forma inadequada no meio ambiente o que vem causando danos aos solos e meio hídricos devido à alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO) requerida pelo mesmo para sua decomposição (MARAN & PRIYA, 2015).

A utilização do bagaço do sisal como matéria para a produção biotecnológica de compostos biologicamente ativos se mostra viável tendo como base a proporção dos polímeros orgânicos que a compõem, sendo as mesmas aproximadamente: 78% celulose, 10% hemicelulose, 9% de lignina e 2% de cinzas (MARTIN, et al., 2009). O menor teor de lignina frente a outros resíduos pode ser considerado vantajoso tendo em vista que o processo de hidrólise, meio pelo qual os açúcares fermentescíveis são liberados, se dará de forma mais facilitada necessitando assim de apenas um pré-tratamento para tal feito.

A hidrólise dos materiais lignocelulósicos pode ser realizada de duas formas clássicas: hidrólise ácida ou hidrólise enzimática. O processo de hidrólise ácida, embora seja o maior promotor de açúcares redutores passíveis de serem fermentados, apresenta

algumas limitações, sendo a formação de inibidores ao metabolismo microbiano a principal problemática de tal etapa. Tais inibidores são formados devido às condições que estão associadas a tal processo, como: temperatura elevada e ambiente reacional ácido, sendo os principais inibidores gerados durante o processamento hidrolítico: o furfural, formado a partir da degradação da xilose e arabinose, e o 5-hidroximetilfurfural, oriundo principalmente da degeneração da glicose (ROCHA, 2010).

Segundo Carvalho (2005, apud PARAJÓ *et al.*, 1998), a ação desses compostos durante a inibição do metabolismo dos microrganismos fermentadores possui uma ligação direta com a sua concentração no meio e os parâmetros cinéticos do processo fermentativo. O mesmo autor ainda aponta em seus estudos que novas técnicas de remoção desses compostos inibitórios estão sendo desenvolvidas e aplicadas com o objetivo de potencializar o rendimento do processo de fermentação, o que vem atingindo resultados significativos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Caracterização lignocelulósica por termogravimetria (TG)

O Bagaço do sisal foi obtido de uma fazenda produtora localizada no município de Nova Floresta-PB, Brasil. Sua caracterização lignocelulósica foi realizada por termogravimetria. A caracterização termogravimétrica é uma técnica analítica na qual a composição de um material é analisada por meio da medição da variação de massa de uma alíquota do mesmo frente a uma programação controlada de temperatura. Neste trabalho, a análise foi realizada de acordo com procedimento padrão utilizado pelo Laboratório de Carvão Ativo (Centro de Tecnologia/UFPB). Utilizando uma rampa de aquecimento de 10 °C/min, partindo da temperatura ambiente até 1000 °C. A análise foi realizada em atmosfera de nitrogênio a uma vazão de 25 mL/min e massa inicial da amostra de 10,4880 mg.

Figura 4: Bagaço do sisal utilizado na pesquisa



Fonte: Arquivo do autor

Figura 5: Balança termogravimétrica utilizada na análise



Fonte: Arquivo do autor

4.2 Avaliação do tratamento ácido do bagaço do sisal

Com o objetivo de determinar a melhor condição de hidrólise ácida do material lignocelulósico em questão, um planejamento fatorial 2^2 com 4 pontos centrais foi realizado. Os dois fatores analisados e seus respectivos níveis foram:

Tabela 1 Condições de avaliação da hidrólise ácida

Fator	Menor nível (-)	Nível intermediário (0)	Maior nível (+)
[H ₂ SO ₄] (%)	1,5	3,5	5,5
Tempo (h)	1	2	3

Fonte: Autor

Tais condições foram estipuladas tomando como base os estudos realizados por Lima *et al.* (2013) que estudaram a hidrólise ácida da fibra do sisal. O processo foi conduzido em autoclave e a proporção biomassa/solução ácida foi de 1:10 e temperatura de 120 °C.

Figura 6: Autoclave utilizada nos ensaios



Fonte: Arquivo do autor

4.3 Detoxificação do licor hemicelulósico

Para a remoção dos inibidores gerados durante o tratamento ácido da biomassa e consequente clarificação do licor, foi empregado um processo de adsorção o qual consiste em ser uma operação onde ocorre transferência de massa de um soluto em fase fluida para o interior de um sólido poroso utilizando como força motriz um gradiente de

concentração existente entre as duas fases (CREMASCO, 2016). O adsorvente utilizado foi o carvão ativo comercial.

Neste processo, o hidrolisado foi submetido a um ajuste de pH pela adição de hidróxido de cálcio (CaOH) até a obtenção de um valor próximo ao da neutralidade, pH = 7,0, e em seguida o mesmo foi diminuído até um valor de pH = 5,5 pela adição de ácido láctico (C₃H₆O₃). Após esse processo de ajuste de pH, o licor foi mantido em câmara fria por 24h, adiante realizou-se uma filtração por um sistema a vácuo utilizando-se papel de filtro como meio filtrante para proporcionar a separação do precipitado formado. O filtrado teve seu pH ajusta para 1,8 utilizando-se ácido sulfúrico (H₂SO₄) e a adsorção foi então realizada sob agitação de 200 rpm, a 30°C por 60 min utilizando como adsorvente o carvão ativo comercial. Tais condições foram determinadas considerando-se o proposto por Villareal (2004) em seus experimentos.

4.4 Quantificação dos açúcares gerados pelo tratamento ácido

4.4.1 Quantificação do teor de açúcares fermentescíveis por espectrofotometria

A eficiência do processo de hidrolise ácida foi verificada pelo método de quantificação de açúcares redutores por reação dos mesmos com o ácido 3,5-Dinitrosalissílico (DNS) proposto por Vasconcelos (2013). Para tal análise, uma diluição dos licores obtidos foi feita na proporção de 1:25 (v/v) objetivando a manutenção dos limites de precisão do método. 0,5 mL da diluição foram adicionados a um tubo de ensaio contendo 0,5 mL de DNS, o ensaio foi realizado em duplicata. O conjunto foi então aquecido a 100 °C por 5 minutos e logo em seguida resfriado em água fria. Aos tubos foram adicionados 4 mL de água destilada e a leitura da absorbância das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. O valor lido foi então convertido em concentração com o auxílio de uma curva de calibração previamente construída.

Para a análise do consumo de substrato ao longo do cultivo, o procedimento citado anteriormente foi repetido, porém as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos antes da análise para que as células fossem separadas do meio de cultivo, a quantificação foi também realizada em duplicata.

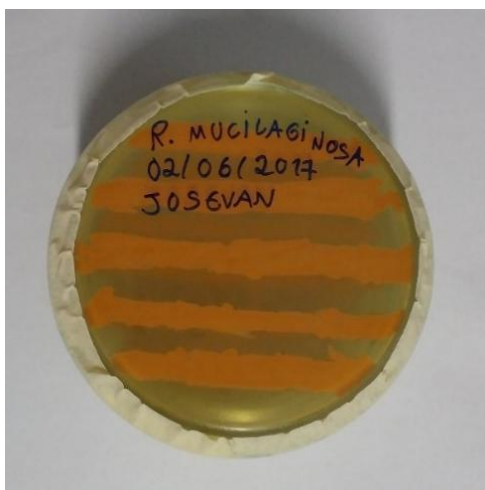
4.4.2 Caracterização dos açúcares redutores contidos no hidrolisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Para a caracterização dos açúcares fermentescíveis (glicose, xilose, arabinose), bem como dos possíveis inibidores (furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético), contidos no hidrolisado hemicelulósico produzido pelo tratamento ácido, foi realizada uma análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). O Cromatógrafo utilizado era equipado com um sistema isocrático de solvente, válvula Rheodyne com alça de 20 μ L e acoplado à uma coluna Agilent Hi-Plex H (7,7 x 30 mm, 8 μ) a uma temperatura de 60 °C. A fase móvel utilizada foi H₂SO₄ 0,009 mol/L a uma taxa de escoamento de 0,6 mL/min. O tempo de duração da corrida foi de 1h.

4.5 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 3892, fornecida pela Fundação André Tosello, Coleção de culturas tropicais de São Paulo, na forma liofilizada. Para o crescimento e manutenção das mesmas, realizou-se a incubação em placas de Petri contendo o meio Y.M.A (Yeast Malt Agar).

Figura 7: Repique de *R. mucilaginosa*



Fonte: Arquivo do autor

Tabela 2: Composição do meio Y. M. A

Constituinte	Concentração (g/L)
Glicose	10,0
Extrato de levedura	3,0
Extrato de malte	3,0
Bacto peptona	5,0
Agar	20,0

Fonte: Autor

4.6 Processo fermentativo

O pré-inóculo foi feito adicionando-se 5 mL de água destilada a uma placa de Petri contendo as células de *R. mucilaginosa* e em seguida a mesma foi raspada com uma alça de platina. Os 5 mL foram então recolhidos com auxílio de um pipetador, dotado de uma ponteira esterilizada, e transferidos para um frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL do meio de crescimento proposto por Frengova *et al.* (1994). O crescimento celular foi então conduzido em um shaker orbital por 24 h sob agitação de 200 rpm e temperatura de 30 °C.

Tabela 3: Composição do meio de crescimento

Constituinte	Concentração (g/L)
Glicose	40,0
KH₂PO₄	8,0
MgSO₄.7H₂O	0,5
Extrato de levedura	3,0

Fonte: Frengova *et al.* (1994)

Após as 24 h de crescimento, alíquotas de 50 mL foram retiradas do meio e transferidas para tubos Falcon de mesma capacidade. Os recipientes foram centrifugados e o sobrenadante foi descartado. O precipitado celular foi então suspenso em 5 mL de água destilada estéril e utilizado na inoculação do hidrolisado hemicelulósico, obtido na condição de ponto central, após o mesmo ter sido esterilizado a 120 °C em autoclave por cerca de 15 minutos e seu pH ajustado para 5,0 pela adição de hidróxido de sódio (NaOH). Para o bioprocesso, realizado em triplicata, utilizou-se frasco do tipo Erlenmeyer de 300 mL contendo 100 mL do licor. A concentração de

celular, ao longo do cultivo, foi quantificada por espectrofotometria a um comprimento de onda de 600 nm e o valor obtido foi convertido em concentração através de uma curva de calibração montada ao final do cultivo. Todo acompanhamento cinético foi realizado seguindo o proposto por Schimidell *et al.* (2001) para a determinação dos parâmetros de crescimento.

4.6.1 Produtividade em Células

Estes parâmetros cinéticos indicam a velocidade média de crescimento microbiano (P_x). Através do mesmo, a taxa de evolução do crescimento microbiano é observada. Dado pela equação (1), onde (x_0) indica o valor da variável no ponto de partida do processo.

$$P_x = \frac{(X-x_0)}{t} \quad (1)$$

4.6.2 Velocidade específica máxima de crescimento

A velocidade específica de crescimento tem seu valor máximo (μ_{max}) na fase exponencial da curva de crescimento, onde a ação do metabolismo do microrganismo se dá de forma mais acentuada e efetiva. A velocidade corresponde à inclinação da reta obtida pelo gráfico do $\ln(X)$ versus t (tempo de cultivo), na fase mencionada. A reta é dada pela seguinte relação linear:

$$\ln X = \mu(t - t_i) + \ln X_i \quad (2)$$

4.6.3 Tempo de geração

Corresponde ao tempo necessário para que o microrganismo dobre sua concentração no meio de cultura em relação ao seu valor inicial. Dado pela seguinte equação:

$$T_g = \frac{\ln(2)}{\mu_{max}} \quad (3)$$

4.6.4 Fator de conversão de substrato em células

É a relação estabelecida entre a quantidade de células produzida com o teor de substrato consumido. De modo que se verifica a influência de um parâmetro sob o outro.

$$Y_{X/S} = \frac{(X-X_0)}{(S_0-S)} \quad (4)$$

4.7 Extração e quantificação dos carotenoides obtidos

A extração dos carotenoides totais obtidos nos bioprocessos, licor adsorvido (AD) e não adsorvido (NAD), foi realizada de acordo com uma adaptação dos estudos propostos por Rodriguez-Amaya & Kimura (2004) onde realizou-se uma coleta de 5 mL do meio fermentado após 120 h, em seguida a mesma foi transferida para um tubo Falcon de 15 mL. O sistema foi então centrifugado e às células foram adicionados 2 mL de dimetilsufóxido a 60 °C mais o acréscimo de 0,5 g de pérolas de vidro. O conjunto foi agitado em vortex por 2 min. Após esta etapa, realizou-se a incubação do sistema a 60 °C por 15 minutos. Logo após esse período foram adicionados 2 mL de éter de petróleo e mais uma agitação de 2 min foi realizada. Ao fim, foram adicionados 2 mL de solução de NaCl 20% (m/v) e mais uma agitação em vortex foi realizada por 1 min. O conjunto foi então centrifugado a uma rotação de 3600 rpm por 15 min. Uma alíquota de 3 mL do sobrenadante contendo os corantes foi recolhida e submetida à leitura em espectrofotômetro (450 nm). A absorbância foi então convertida em concentração por meio da relação de Beer-Lambert que correlaciona a mesma junto com a absorvidade molar das espécies químicas com uma dada concentração de acordo com a seguinte equação:

$$[Carotenoides_{totais}] = \frac{A \times V \times 10^4}{a \times m} \quad (5)$$

Onde:

[Carotenoides_{totais}]: concentração de carotenoides totais em µg/g de célula;

A: absorbância a 450 nm;

v: volume de extrato da amostra;

a: absorvidade molar da espécie química (carotenoides em geral, 2592);

m: massa de amostra.

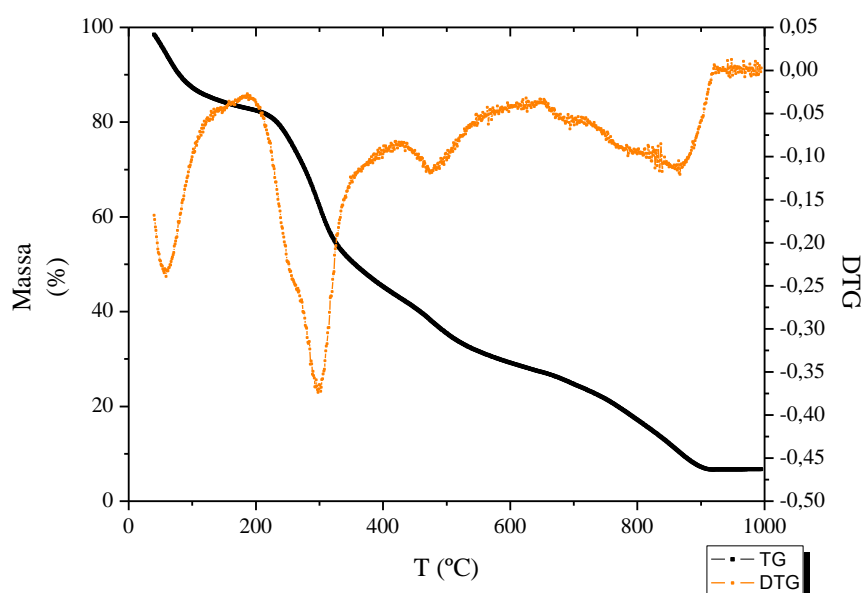
A conversão para $\mu\text{g/L}$ foi realizada usando a relação estequiométrica com a concentração de células obtidas em 120 h, para representar o resultado em mg/L multiplicou-se o mesmo pelo fator de 10^{-3} .

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização termogravimétrica do bagaço do sisal

A interpretação da curva termogravimétrica (TG) e sua respectiva derivada (DTG), representadas na Figura 8, se deu por meio dos estudos realizados por Corradini *et al.* (2009) que ao analisar a estabilidade térmica dos constituintes do algodão constatou que a degradação da lignina, hemicelulose e celulose do material se dava respectivamente nas seguintes faixas térmicas: 200-500 °C, 240-310 °C e 310-360 °C.

Figura 8: Análise termogravimétrica do bagaço do sisal



Fonte: Arquivo do autor

A resposta da análise termogravimétrica mostrou que o material apresenta em sua constituição os seguintes teores de umidade, lignina, hemicelulose, celulose e cinzas, respectivamente: 11,15%, 12,75%, 20,16%, 17,92% e 6,72%. Tais resultados quando comparados com os valores obtidos por Lima *et al.* (2013) que obtiveram os seguintes teores para os mesmos constituintes ao trabalhar com o bagaço do sisal: 3,8%, 22,6%, 20,6%, 27,6% e 5,7%, apresentam algumas discrepâncias, o que pode ser justificado pela diferença na procedência da matéria-prima, uma vez que tais constituintes variam com a época e condição de cultivo (CANILHA *et al.*, 2012). Além disso, tal caracterização mostra o grande potencial do uso do bagaço do sisal como substrato em bioprocessos uma vez que seu teor de lignina, polímero estrutural que dificulta os

tratamentos que promovem a liberação de açúcares fermentescíveis, estar em menor percentagem do que em outras matrizes bastante utilizadas, como o bagaço do caju (23,7%) e o bagaço da cana-de-açúcar (19,01-32,4%) (LIMA *et al.*, 2015 & CANILHA *et al.*, 2012).

5.2 Obtenção da melhor condição de tratamento ácido

Seguindo o planejamento elaborado para determinar a melhor condição de hidrólise do material, os seguintes tratamentos foram realizados, a uma temperatura de reação equivalente a 120 °C, obtendo seus respectivos teores de açúcares redutores, como mostrado na tabela a seguir:

Tabela 4: Resultados obtidos na avaliação da hidrólise ácida do bagaço do sisal

Tratamento	[Açúcares redutores] (g/L)
(1,5%, 1h)	9,76 ± 0,33
(5,5%, 1h)	18,40 ± 0,03
(1,5%, 3h)	15,37 ± 0,04
(5,5%, 3h)	28,97 ± 0,03
(3,5%, 2h)	17,65 ± 0,23
(3,5%, 2h)	13,41 ± 0,42
(3,5%, 2h)	15,36 ± 0,45
(3,5%, 2h)	15,48 ± 0,22

Fonte: Autor

A análise estatística dos resultados foi feita utilizando o software Statistica[®], a um nível de confiança de 95%, com o objetivo de verificar e atestar a influência das variáveis independentes, concentração de ácido sulfúrico e tempo de reação, sob a variável dependente, concentração de açúcares redutores. O resultado da avaliação estatística do experimento está disposto nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 Análise estatística dos efeitos

Fator	Efeito	Teste p ($\alpha=0,05$)	Limite inferior (-95 %)	Limite superior (+95 %)
Média	16,79875	0,000039	14,44105	19,15645
[H₂SO₄]	11,12000	0,009809	4,45142	17,78858
Tempo	8,09000	0,028089	1,42142	14,75858
Interação	2,48000	0,360157	-4,18258	9,14858

Fonte: Autor

Com relação às variáveis independentes, sua interação e seus respectivos efeitos, é possível afirmar que a concentração de ácido sulfúrico e o tempo de reação são de fatos significativos, do ponto de vista estatístico, sobre a geração de açúcares fermentescíveis por hidrólise ácida uma vez que o critério do Test P, $P < 0,05$, foi satisfatoriamente atendido para tais. O efeito da interação de ambas variáveis não é estatisticamente significativo pois seu intervalo de confiança para 95% inclui o valor 0 de acordo com seus limites superior e inferior.

Tabela 6 Análise estatística do modelo matemático

Fator	Coefficiente	Desvio padrão	Limite inferior (-95 %)	Limite superior (+95 %)
Média	16,7912	($\pm 0,857152$)	14,44105	16,15645
[H₂SO₄]	5,56000	($\pm 1,212196$)	2,22571	8,89429
Tempo	4,04500	($\pm 1,212196$)	0,71071	7,37929
Interação	4,57429	($\pm 1,212196$)	-2,71071	4,57429

Fonte: Autor

De acordo com a Tabela 6, a elaboração do modelo matemático que representa o processo de tratamento ácido não leva em consideração o coeficiente da interação entre os dois fatores pois seu intervalo de confiança para 95% compreende o valor 0. O modelo estatístico obtido está representado abaixo pela equação (6).

$$[AR] = 16,7912 + 5,56000 \times C + 4,04500 \times t \quad (6)$$

Onde:

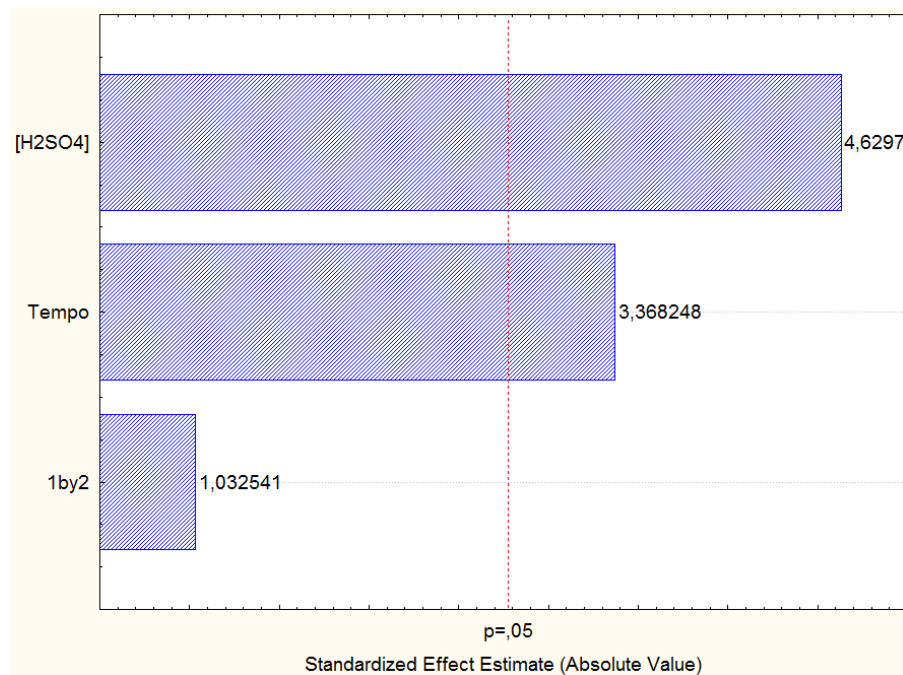
[AR]: Concentração de açúcares redutores (g/L);

C: Concentração de ácido sulfúrico (%);

t: Tempo de reação (h).

Todas as análises e observações estatísticas foram tomadas tendo como base o proposto por Rodrigues & Iemma (2005). Uma representação visual do quão significativa é uma variável independente sobre uma resposta é obtida pelo gráfico de Pareto, que está representado na Figura 9. Em tal representação gráfica, toda variável que ultrapassar a linha do coeficiente de significância é considerada estatisticamente significativa.

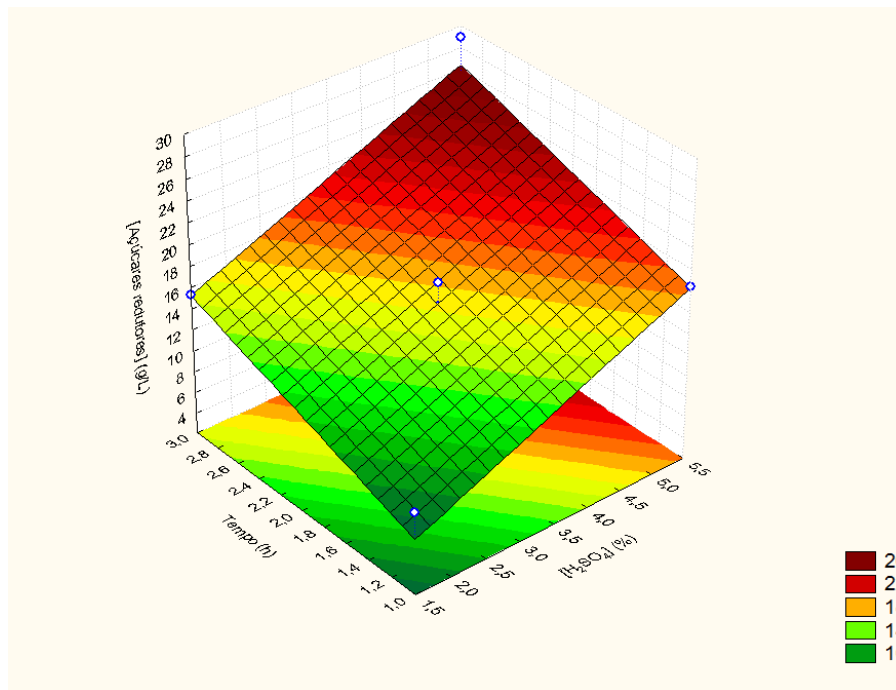
Figura 9: Diagrama de Pareto para variáveis concentração de ácido e tempo de hidrólise do bagaço de sisal



Fonte: Software Statistica®

Outra representação gráfica do estudo estatístico pode ser feita ao gerar-se a superfície de resposta. Neste caso, o modelo matemático obtido teve um valor de R^2 de 0,8655. Isso mostra que o mesmo possui uma boa faixa de explicação entre os valores obtidos na prática e os obtidos pela sua representação matemática.

Figura 10: Superfície de resposta para concentração de ácido sulfúrico e tempo de hidrólise do bagaço de sisal



Fonte: Software Statistica®

A maior concentração de açúcares redutores obtida nas condições estudadas foi de 28,97 g/L. Esse resultado é superior ao obtido por Roberto e Mussatto (2004), 22,7 g/L, para um hidrolisado produzido sob as mesmas condições termodinâmicas em um reator de aço inox utilizando palha de arroz como matriz lignocelulósica. Já Cassales (2010) encontrou, em sua melhor condição hidrolítica, um teor de açúcares redutores equivalente a 12,3 g/L utilizando como material a ser hidrolisado a casca de soja. Tais comparações asseguram a viabilidade do melhor tratamento aqui estudado bem como a boa aplicação do bagaço do agave como precursor de açúcares redutores uma vez que a concentração dos mesmos influencia diretamente no crescimento celular e na biossíntese de carotenoides, segundo Schneider *et al.* (2013).

A caracterização do licor por cromatografia líquida mostrou os seguintes resultados quanto à produção de alguns açúcares específicos e de grande interesse do ponto de vista dos bioprocessos:

Tabela 7: Caracterização do hidrolisado hemicelulósico

Tratamento	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)
(3,5%, 2h)	0,6	9,7	0,9
(5,5%, 1h)	1,6	11,5	4
(1,5%, 3h)	0,2	8,5	1,1
(5,5%, 3h)	2,9	15,5	0
(1,5%, 1h)	0	8,1	0,9

Fonte: Autor

Os resultados aqui obtidos, quando comparados com os encontrados por Lima *et al.* (2013) que estudou o comportamento da fibra da Agave frente a um tratamento ácido, se mostraram inferiores do ponto de vista da concentração de glicose uma vez que na melhor condição dos referidos autores a concentração de tal monômero chegou ao valor de 9,3 g/L, isso se deve ao fato da matriz dos mesmos possuir um maior percentual de celulose que o bagaço de sisal aqui estudado. Já quanto à geração de xilose e arabinose, os tratamentos realizados no presente trabalho se mostraram eficientes, uma vez que na melhor condição dos autores a concentração de xilose chegou à marca de 12,4 g/L e para a arabinose os mesmos encontraram um valor de 4,5 g/L.

Para a realização do bioprocesso foi selecionada a condição de ponto central uma vez que os produtos alvo da pesquisa tem como destino principal a indústria de alimentos, onde processos associados à altas concentrações de ácido não são bem aceitos devido aos riscos à saúde humana e problemas de corrosão de dutos pelos quais esse fluido venha a escoar. Outro fator importante foi a utilização de um menor tempo de reação, o que traz menos custos com gastos energéticos.

5.3. Detoxificação do licor hidrolisado de bagaço de sisal

O hidrolisado apresentou uma concentração de 6,07 g/L de ácido acético. Segundo Rodrigues *et al.* (2011), meios de cultivos com concentração superior a 3 g/L deste ácido orgânico são inadequadas para o crescimento de leveduras uma vez que ocorre repressão metabólica. Tendo em vista tal problemática, realizou-se uma operação de detoxificação do licor por meio de um processo de adsorção variando-se a concentração

de carvão ativo, em 1%, 3% e 5% (m/v), no intuito de verificar a melhor condição operacional.

A etapa de alteração do pH teve por objetivo auxiliar na precipitação de alguns compostos indesejáveis ao processo fermentativo, como: taninos, terpenos, acetatos, compostos fenólicos e íons de metais pesados (CARVALHO, 2005, apud LEE e MacCASKEY, 1989).

Os resultados obtidos estão mostrados na tabela abaixo:

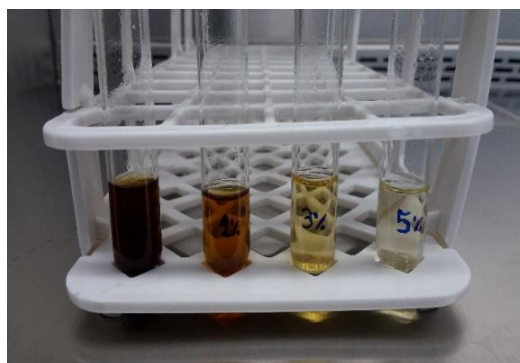
Tabela 8: Resultado da adsorção nas condições estudadas

% de adsorvente	1%	3%	5%
[Ácido acético] _{final} (g/L)	5,01	0,07	0
% de remoção	17,46%	98,85%	100%

Fonte: Autor

Desse modo selecionou-se a condição de adsorção com 3% (m/m) de carvão ativo como sendo a melhor dentre as estudadas devido ao ótimo percentual de remoção e menor uso de adsorvente uma vez que o uso de altas concentrações do adsorvente promove uma maior remoção dos açúcares fermentescíveis.

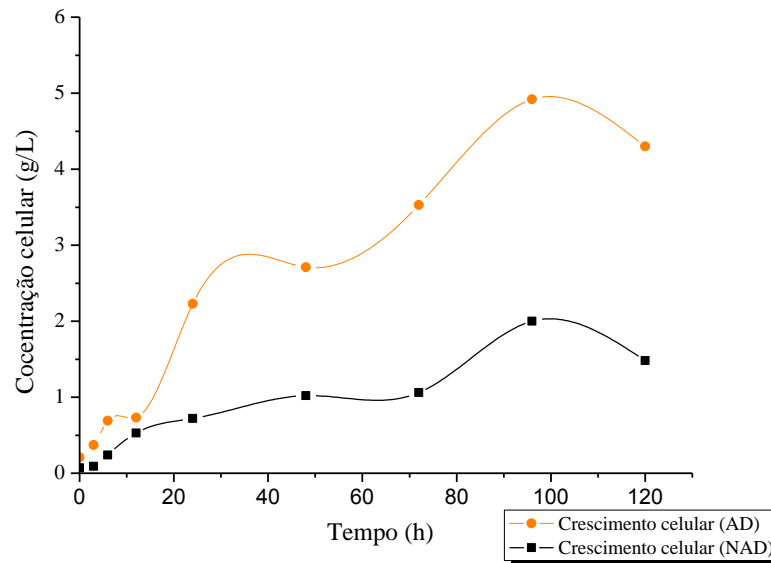
Figura 11: Hidrolisado do Agave pré e pós-adsorção em cada condição avaliada



Fonte: Arquivo do Autor

5.3 Avaliação do processo fermentativo

Os perfis de crescimento celular e consumo de substrato para o cultivo onde o tratamento de remoção de inibidores por adsorção foi realizado (AD) e para o sem remoção alguma (NAD) são mostrados graficamente abaixo:

Figura 12: Perfis de crescimento da levedura *R. mucilaginosa*

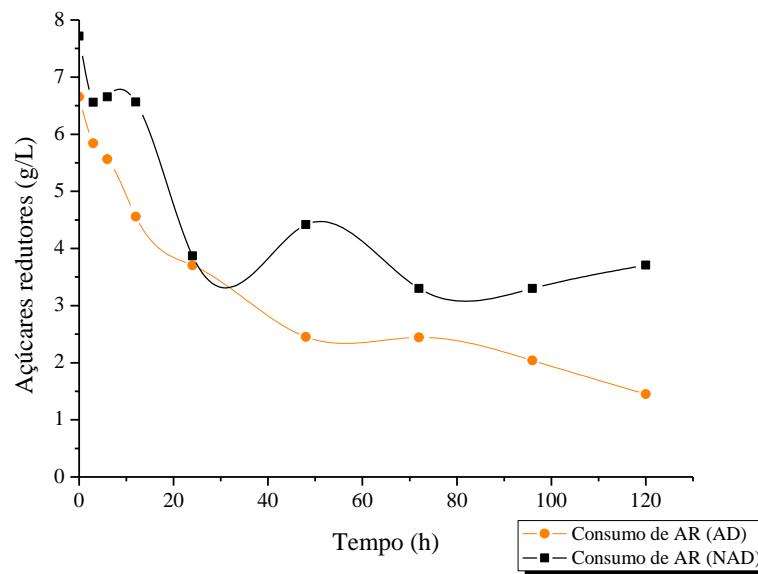
Fonte: Arquivo do Autor

Os perfis mostrados na figura 12 foram obtidos para um cultivo de 120 horas em meio submerso sob agitação. Nas condições já mencionadas, a produção máxima de células, 4,92 g/L, se deu em 96 h de cultivo para o meio que recebeu o processo de detoxificação e 2 g/L, no mesmo tempo de processo, para o licor sem nenhum tratamento prévio. Esse resultado é inferior do obtido por Silva (2016) utilizando a mesma cepa da levedura *R. mucilaginosa* em um cultivo utilizando a manipueira como meio de crescimento, suplementado com glicose, extrato de levedura e sulfato de magnésio, 7,49 g/L em 96 h. O autor ainda analisou o crescimento da mesma cepa em meio sintético, composição mostrada na Tabela 03, obtendo uma produção máxima equivalente a 14,05 g/L em 96 h.

A utilização do bagaço do sisal como substrato trouxe um resultado próximo ao encontrado por Schneider *et al.* (2013), que tiveram uma produção de 5,22 g/L de células da levedura *R. glutinis* utilizando água residual de efluente cervejeiro como substrato. Já Reyna-Martinez *et al.* (2015) encontraram uma produção máxima de 6,27 g/L, utilizando um meio sintético à base de glicose, extrato de levedura e peptona. Cazetta *et al.* (2005), utilizando melão e vinhaça como substratos, obtiveram uma maior concentração de células em 48 h, equivalente a 7,05 g/L. Tais comparações mostram que o resultado aqui obtido foi bastante promissor.

Tal análise comparativa evidência que a suplementação do meio pode potencializar ainda mais a aplicação de hidrolisado de sisal como fonte de carbono uma vez que os resultados aqui encontrados, mesmo sem suplementação algumas, se encontram próximo do reportado para outros meios ricos em fontes de carbono de fácil assimilação pelos microrganismos. Os perfis de consumo de açúcares redutores (AR) estão representados na Figura 13, a seguir:

Figura 13: Perfis de consumo de açúcares redutores



Fonte: Arquivo do Autor

Uma certa diminuição no teor de açúcares redutores iniciais, em relação ao obtido no planejamento experimental, ocorreu devido ao processo de adsorção que não remove apenas os inibidores, mas também outros solutos contidos na fase fluida (licor).

Tabela 9: Parâmetros cinéticos

Cultivo AD			
Px (g/L.h)	Tg (h)	Yx/s (g/g)	μ_{max} (h ⁻¹)
0,0489	3,4954	0,8859	0,1983
Cultivo NAD			
Px (g/L.h)	Tg (h)	Yx/s (g/g)	μ_{max} (h ⁻¹)
0,0201	3,9117	0,5576	0,1772

Fonte: Autor

A velocidade específica máxima obtida por Silva (2016) foi de $0,0242 \text{ h}^{-1}$, em meio composto por manipueira, e $0,0661 \text{ h}^{-1}$, em meio sintético, o que evidência a ocorrência de uma maior taxa de crescimento utilizando o resíduo aqui estudo em ambas as condições analisadas. Os mesmos resultados foram próximos ao do estudo de Aksu e Eren (2005) no qual a levedura *R. mucilaginosa* atingiu a marca de $0,22 \text{ h}^{-1}$ quando cultivada no meio sintético e em pH 5,0.

A produtividade em células (P_x) por *R. mucilaginosa* foi inferior à do estudo de Maldonado; Rodriguez-Amaya; Scaparini (2012), onde a produtividade alcançou o valor máximo de $0,1292 \text{ g/L.h}$ em 72 h de cultivo. O que evidência a necessidade de se estudar uma melhor condição de suplementação da carga nutricional como adjunto ao hidrolisado hemicelulósico.

O fator de conversão de substrato em células foi superior, em ambos os casos, ao obtido por Silva (2016) em sua melhor condição de cultivo para a mesma cepa, $0,5188 \text{ g/g}$.

5.4 Resultado da quantificação dos carotenoides produzidos

Após o fim das 120 h de cultivo, realizou-se a extração e quantificação dos carotenoides produzidos intracelularmente, obtendo uma concentração de $0,6829 \pm 0,0213 \text{ mg/L}$, para o cultivo sem ação inibitória, e $0,3449 \pm 0,0621 \text{ mg/L}$ para o cultivo em licor não tratado. Schneider *et al.* (2013) encontraram um valor máximo de $0,6 \text{ mg/L}$ em seu trabalho quando utilizou apenas meio residual para o crescimento e ainda verificaram que há uma influência positiva da concentração de carbono no meio sob a síntese desses bioativos uma vez que na maior concentração de suplementação estudada pelo mesmo, tal teor chegou ao valor de $1,2 \text{ mg/L}$. Já Squina & Mercadante (2003) ao estudarem a produção de carotenoides por cinco linhagens diferentes do gênero *Rhodotorula* encontraram um teor de $0,2517 \text{ mg/L}$ para o gênero *glutinis*, $0,1235 \text{ mg/L}$ para o *rubra*, $0,1058 \text{ mg/L}$ para a *R. lactosa*, $0,1132 \text{ mg/L}$ para a *R. araucariae* e $0,1037 \text{ mg/L}$ para o cultivo com a *R. minuta*. Todos os cultivos dos autores foram realizados em meio Y. M. acrescido de 10 g/L de glicose.

6. CONCLUSÕES

A caracterização lignocelulósica do bagaço do sisal constatou que de fato o mesmo possui uma boa aplicabilidade como fonte precursora de açúcares fermentescíveis uma vez que seu teor e lignina é bem menor do que o encontrado em outras matrizes. Tal afirmação ficou evidente na resposta favorável que foi obtida no tratamento ácido uma vez que a concentração ótima de açúcares redutores superou o reportado em outros estudos similares. De acordo com os parâmetros cinéticos obtidos, o crescimento da levedura *R. mucilaginosa* foi satisfatório e embora o crescimento celular não tenha superado a média relatada na literatura, o acúmulo de carotenoides atingiu um resultado bastante promissor. Tais considerações evidenciam que o hidrolisado do bagaço do sisal é uma excelente alternativa para a produção de produtos bioativos.

REFERÊNCIAS

- AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S & FARO, Z. P. Carotenoids as nalternative against hypovitaminosis A. *Revista Nutrição*, v. 19, p. 233-243, 2006.
- AKSU, Z.; EREN, A. T.. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochem.* 40, 2985-2991. 2005.
- AKSU, Z.; EREN, A. T.. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochem Engin Journ.* 35, 107-113. 2007.
- AUNE, D. *et al.* Dietary compared with blood concentrations of carotenoids and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis of studies. *The American Journal of Clinical Nutrition.* Vol. 96, p. 356-373, 2012.
- BANZATTO, D.; FREITA, L. A. de; MUTTON, M. J. R. Carotenoid production by *Rhodotorula rubra* cultivated in sugarcane juice, molasses ad syrup. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.33, p. 14-28, 2013
- BOTELLA-PAÍVA. P.; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. *Physiologia Plantarum*, Vol. 126, p. 369-381, 2006.
- CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. de S.; ANTUNES, F. A. F.; FREITAS, W. L. da C.; FELIPE, M. de G. A. & DA SILVA, S. S. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about composition, Pretreatment methods, Detoxification of hydrolysates, Enzymatic Saccharification and Ethanol fermentation. *Journal of Biomedicine and biotechnology*, p. 1-15, 2012.
- CARVALHO, G. B. M. de. Utilização de carvão ativo, resinas e terra diatomácea para o tratamento do hidrolisado do eucalipto na produção biotecnológica do xilitol. São Paulo:FAENQUIL, 2005. 110 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação

em Biotecnologia Industrial, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 2005.

CASSALES, A. R. Otimização da hidrólise da casca de soja (*Glycine max*) e a avaliação da capacidade de produção de xilitol e etanol por microrganismos sobre este hidrolisado. Porto Alegre:UFRGS, 2010. 138 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2010.

CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. G. Aproveitamento do melão e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa protéica e lipídica por leveduras e bactéria. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Vol. 26, n. 2, p. 105–112. 2005.

CORMA, A.; IBORRA, S.; Velty, A. Chemical Routs fot the trasformation of biomas into chemicals. Chemical Reviews. Vol. 107, Nº. 6, p. 2411-2502, 2007.

Corradini E, Teixeira EM, Paladin PD, Agnelli JA, Silva ORRF, Mattoso LHC. J Therm Anal Cal 97:415. 2009.

CREMASCO, M. A. Fundamentos de Transferência de Massa. Blucher, 3ª edição, 460 p. São Paulo, 2016.

DA SILVA, O. R. R. F. et al. Cultivo do sisal no nordeste brasileiro. EMBRAPA. Campina Grande, p. 1-23, 2008.

FARIAS, M. V. de. Produção de enzimas hidrolíticas por leveduras isoladas de solo de áreas preservadas em Roraima, Brasil. BOAVISTA (2008). 116 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Recursos Naturais. Universidade Federal do Amazonas, 2008.

FRENGOVA, G.; SIMOVA, E.; PAVLOVA, K.; BESHKOVA, B. & GRIGOROVA, D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. Biotechnology and Bioengineering, v. 44, p. 888-894, 1994

IRAZUSRA, V.; NIETO-PEÑALVER, C.G.; CABRAL, M.E.; FIGUEROSA, L.C.
Relationship among carotenoid production, copper bioremediation and oxidative stress
in *Rhodotorula mucilaginosa* RCL-11. *Proc Biochem*. Vol. 48, p. 803-809, 2013.

LIBKIND, D.; GADANHO, M. & SAMPAIO, J. P. Studie on the heterogeneity of the
carotenogenic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* from Patagonia, Argentina. *Journal of
Basic Microbiology*. Vol. 48, p. 93-98, 2008.

LIMA, C. S. S.; CONCEIÇÃO, M. M.; SILVA, F. L. H.; LIMA, E. E.; CONRADO, L.
S. & LEÃO, D. A. S. Characterization of acid hydrolysis of sisal. *Applied Energy*, v.
102, p. 254-259, 2013.

LIMA, E.; SILVA, F. L. H.; CONRADO, L. S.; SILVA, A. S. & NETO, J. M. da S.
Produção de Etanol de segunda geração proveniente do bagaço do pedúnculo do caju.
Revista Caatinga, Mossoró, v. 28, n. 2, p. 26-35, abr-jun 2015.

LUKACS, G.; LINKA, B.; NYILASI, I. *Phaffia rhodozyma* and *Xanthophyllomyces*
dendrohas: Astaxanthin-production yeasts of biotechnological importance. *Acta
Alimental*. Vol. 5, p. 99-107, 2006.

MALDONADE, I. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SCAMPARINI, A. R. P.
Carotenoids of yeast isolated from brazilian ecosystem. *Food chemistry*, Vol. 107, p.
145-150, 2008.

MALDONADE, I. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SCAMPARINI, A. R. P.
Statistical optimisation of cell growth and carotenoid production by *Rhodotorula
mucilaginosa*. *Brazil Journ of Microbiol*. 43, 109-115. 2012.

MARAN, J. P.; PRIYA, B. Ultrasound-assisted extraction of pectin from sisal waste.
Carbohydrate Polymers. v. 115, p. 732–738, 2015.

MAROVA, I.; CARNECKA, M.; HELIENOVA, A.; DVAROKOVA, T. & HARONIKOVA, A. Use of several waste substrate for carotenoid-rich yeast biomass production. *Journal of Environmental Management*. Vol. 95, p. 338-342, 2012.

MARTIN, A. R.; MARTINS, M.A.; MATTOS, L. H. C. & SILVA, O. R. R. F. Caracterização química e estrutural de fibra de sisal da variedade *Agave sisalana*. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.19 n.1 p.40-46, São Paulo, 2009.

MEDEIROS, L. L. De. Ampliação de escala experimental da produção biotecnológica de xilitol a partir do hidrolisado do bagaço do pedúnculo do caju. João Pessoa:UFPB, 2015. 101 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

MOLINÉ, M. *et al.* Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: the role of torularhodin. *Photochem Photobiol Science*. Vol. 9, p. 1145-1151, 2010.

NIIZU, P. Y. Fontes de carotenoides importantes para a saúde humana. CAMPINAS: UNICAMP, 2003. 87 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de engenharia de alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

REYNA-MARTÍNEZ, R.; GOMEZ-FLORES, U. J.; FERNANDEZ-DELGADILLO, S. & BALDERAS-RENTERIA, L. Lipid Production by Pure and Mixed Cultures of *Chlorella pyrenoidosa* and *Rhodotorula mucilaginosa* Isolated in Nuevo Leon, Mexico. *Appl Biochem Biotechnol*. 175, 354-359. 2015.

ROBERTO, I. C.; MUSSATTO, S. I. Avaliação de diferentes tipos de carvão ativo na destoxificação de hidrolisado de palha de arroz para produção de xilitol. *Food Science and Technology*, v. 24, n. 1, Campinas, 2004.

ROCHA, M. V. P. Produção de Bioetanol a partir de pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.) por fermentação submersa. NATAL: UFRN, 2010. 213 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos, Campinas, SP, Casa do Pão Editora, 2005.

RODRIGUES, M. L. V.; KENEALY, W. R.; JEFFRIES, T. W. Xylitol production from DEO hydrolysate of corn stove by *Pichia stipites* YS-30. *Ind Microbiol Biotechnol.*, v. 38, p. 1649-1655, 2011.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. & KIMURA, M. HarvestPlus Handbook for Carotenoids Analysis. HarvestPlus, P. 40, 2004.

SCHMIDELL, W., LIMA, U.A., BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial*, São Paulo, Blucher, 2, 93-114, 2001.

SCHIMIDER, T. *et al.* Lipid and Carotenid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents. *Energy*, v. 61, p. 34-43, 2013.

SQUINA, F. M. & MERCADANTE, A. Z. Análise, por CLAE, de carotenoides de cinco linhagens de *Rhodotorula*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 39, n. 3, 2003.

SILVA, D. A. Maximização da produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma* utilizando água de parboilização de arroz. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Rio Grande, Natal, 2009.

SILVA, J. Da. Obtenção de lipídeos por Processo Biotecnológico utilizando a manipueira como substrato. João Pessoa:UFPB, 2016. 85 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

THORNE-LYMAN, A. L.; FAWZI, W. W. Vitamin A and Carotenoids During Pregnancy and Maternal, Neonatal and Infant Health outcomes: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Pediatric and Perinatal Epidemiology*. Vol. 26, p. 36-54, 2012.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. L.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M. & JUNIOR, A. F. Produção de carotenoides: Microrganismos como fonte de pigmentos naturais. Química Nova, Vol. 32, Nº. 9, p. 2429-2436, 2009.

VASCONCELOS, N. M. de. Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3, 5-dinitrosalicílico: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2013.

YU, Y.; LOU, X.; WU, H. Some recente advances in hydrolysis of biomass in hot-compressed water and its comparisions with other hydrolysis methods. Energy and fuels. Vol. 22, Nº. 1, p. 46-60, 2008.