



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS
NÍVEL MESTRADO**

JOSEVAN DA SILVA

**OBTENÇÃO DE LIPÍDIOS POR PROCESSO BIOTECNOLÓGICO
UTILIZANDO A MANIPUEIRA COMO SUBSTRATO**

João Pessoa

2016

JOSEVAN DA SILVA

**OBTENÇÃO DE LIPÍDIOS POR PROCESSO BIOTECNOLÓGICO
UTILIZANDO A MANIPUEIRA COMO SUBSTRATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito necessário para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva

João Pessoa

2016

S586o Silva, Josevan da.
Obtenção de lipídios por processo biotecnológico
utilizando a manipueira como substrato / Josevan da Silva.-
João Pessoa, 2016.
84f. : il.
Orientador: Flávio Luiz Honorato da Silva
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT
1. Tecnologia de alimentos. 2. Inóculo. 3. Resíduo.
4. Levedura *Rhodotorula mucilaginosa*. 5. Biomassa.

UFPB/BC

CDU: 664(043)

JOSEVAN DA SILVA

OBTENÇÃO DE LIPÍDIOS POR PROCESSO BIOTECNOLÓGICO
UTILIZANDO A MANIPUEIRA COMO SUBSTRATO

Dissertação aprovada em 23/03/2016

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva
DEQ/CT/UFPB
-Orientador-

Sharline F. de Melo Santos

Prof. Dr. Sharline Florentino de Melo Santos
DEQ/UFPB
-Examinador Interno-

Mônica Tejo Cavalcanti

Prof. Dr. Mônica Tejo Cavalcanti
UFCG - Examinador Externo-

Carlos André Veiga Burkert

Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert
FURG/RG - Examinador Externo-

À minha mãe Severina Francisca da
Conceição, ao meu pai José Alves da
Silva (“*in memorian*”) e minha avó
Otávia Maria Francisca da Conceição (“*in
memorian*”), dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por sempre guiar meus passos, me tranquilizar nos momentos de aflição, e me dar força para seguir em frente.

A minha mãe Severina Francisca da Conceição, por todo amor, carinho, compreensão e apoio, por sempre me incentivar e me aconselhar durante toda essa caminhada.

Ao meu pai José Alves da Silva (*“in memorian”*), e minha avó Otávia Maria da Conceição (*“in memorian”*), por terem me guiado e dado forças, mesmo sem estarem presentes fisicamente durante toda essa jornada.

Aos meus irmãos (Joseane, Josiene, Josinete, Josivane, Josilene, Josenildo, José Carlos e Ismar) pelas palavras de incentivo e por todo apoio.

Ao professor Flávio Luiz Honorato da Silva, pela orientação, paciência, companheirismo, amizade, compreensão, incentivo, transmissão de conhecimentos e todo apoio, fundamentais nessa caminhada.

À professora Sharline Florentino de Melo Santos, pela amizade, paciência, apoio, incentivo e transmissão de conhecimentos, durante esse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro que possibilitou a realização dessa pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) e à Universidade Federal da Paraíba (UFPB) pela infraestrutura.

Aos professores Vital de Queiroz, Ana Flávia, Marta Madruga e Marciane Magnani, pelo apoio e conhecimento adquirido.

Aos meus companheiros de laboratório e amigos Lorena Lucena, Débora Jamila e José Evangelista por toda colaboração, amizade, companheirismo, incentivo durante esses dois anos.

Aos funcionários Lindalva Nóbrega e Débora Jamila, pela colaboração, disposição e paciência.

Aos alunos de iniciação Científica do curso de Engenharia Química, Thiago Batista Simões e Anderson Domiciano pelo apoio durante a pesquisa.

À minha namorada, Denise Nascimento, por todo carinho e apoio.

Aos meus amigos: Joalisson Lima, Danilo Macedo, Isaías Lima, Gabriel Luis, Woshington Serrano, Ana Carolina, Adma Melo, Danise Medeiros e Soares Elias pelo incentivo e companheirismo.

Ao aluno do professor Carlos André da FURG, Bruno Ladeira, pelo apoio na extração e quantificação dos lipídios.

A todos do Laboratório de Bioprocessos da Universidade Federal da Paraíba, por toda força e amizade ao longo desses dois anos.

À indústria de farinha do município de Sobrado Folha Verde por ter cedido a manipueira utilizada na pesquisa.

À Fundação André Tosello (FAT) localizada em Campinas/SP que forneceu a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688, fundamental para este estudo.

A todos que participaram diretamente e indiretamente dessa pesquisa.

MUITO OBRIGADO!

“Agarre-se a seus sonhos, pois, se eles morrerem, a vida será como um pássaro de asa quebrada, incapaz de voar”.

Langston Hughes

SILVA, Josevan da, *Obtenção de lipídios por processo biotecnológico utilizando a manipueira como substrato*, João Pessoa: Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, 2016. 83 p. Dissertação (mestrado).

RESUMO

Em virtude da alta e constante atividade industrial, diariamente são gerados milhares de toneladas de resíduos, muitos destes não são aproveitados, sendo descartados diretamente no meio ambiente sem nenhum tratamento prévio, podendo ocasionar sérios impactos ambientais. Em vista disso, essa pesquisa teve como objetivo avaliar os efeitos dos componentes do meio de cultivo e a variação da concentração de manipueira sobre a biomassa e lipídios produzidos, utilizando a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7668 e a manipueira. Foi verificada a influência dos componentes do meio e a concentração de manipueira sobre a produção de biomassa e lipídios. As células de *R. mucilaginosa* foram cultivadas em meio YMA e inoculadas em frascos Erlenmeyer com 20 % de manipueira suplementada com glicose, sulfato de magnésio, fosfato de potássio e extrato de levedura. No segundo cultivo, utilizou-se 50, 75 e 100% de manipueira, com a concentração fixa de 3 g.L⁻¹ de extrato de levedura. Os cultivos foram incubados em agitador rotativo tipo shaker, submetidos à temperatura de 30 °C, sob agitação constante de 200 rpm por 120 h. Durante intervalos de tempo pré-determinados, alíquotas foram retiradas do meio para a quantificação de biomassa e lipídios. A manipueira analisada apresentou 92,38% de umidade, 30,2 g.L⁻¹ de açúcares redutores, 51 g.L⁻¹ de açúcares totais, 1,17% de proteínas e 0,53% de cinzas, acidez titulável de 3,20 (meq NaOH.100 mL⁻¹), sólidos solúveis totais de 7,0 °Brix, e pH equivalente a 5,26. No cultivo com 20% de manipueira, a biomassa máxima foi de 7,49 g.L⁻¹, 96 h após o inóculo, nesse mesmo intervalo de tempo foram produzidos 2,25 g.L⁻¹ de lipídios, equivalente a 30% de lipídios em biomassa seca. Nos cultivos com variação da concentração de manipueira, foram produzidos 4,10, 6,95, 5,77 g.L⁻¹ de biomassa e 13,33, 7,71 e 8,47% de lipídios nos cultivos com 50, 75 e 100% de manipueira, respectivamente. O cultivo sintético produziu 9,39 g.L⁻¹ de biomassa e 41,92% de lipídios. O experimento com 100% de manipueira apresentou o melhor coeficiente de rendimento de conversão de açúcares redutores totais em biomassa (0,5188 g.g⁻¹) e o cultivo com 50%, o melhor rendimento na produção de lipídios (0,0049 g.g⁻¹). A manipueira mostrou-se como um potencial substrato para a produção de lipídios por *R. mucilaginosa*, podendo ser utilizada em processos fermentativos, agregando valor ao resíduo e minimizando possíveis impactos ambientais pelo descarte inadequado.

Palavras-chave: inóculo, resíduo, *Rhodotorula mucilaginosa*, biomassa.

SILVA, Josevan da, *Getting lipids by biotechnological process using cassava wastewater as a substrate*, João Pessoa: Graduate Program in Food Science and Technology, Federal University of Paraíba, 2016. 83 p. Dissertation (Master's Degree)

ABSTRACT

Due of the high and steady industrial activity, every day thousands of tons of waste are generated, many of these aren't used, and discarded directly into the environment, without any prior treatment, which may cause serious environmental impacts. Knowing that, this research aimed to evaluate the effects of the components of the culture medium on the biomass and lipids produced using cassava wastewater and the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7668. Was verified the influence of medium components and of the concentration of cassava on the production of biomass and lipids. *R. mucilaginosa* cells were cultured in YMA medium and inoculated in Erlenmeyer flasks with 20% cassava wastewater supplemented with glucose, magnesium sulfate, potassium phosphate and yeast extract. In the second culture, was used 50, 75 and 100% of cassava wastewater with fixed concentration 3 g.L⁻¹ yeast extract. The cultivation was carried in a rotary incubator subjected to a temperature of 30 °C, under constant agitation at 200 rpm for 120 hours. During predefined time intervals, aliquots were removed of the medium for biomass and lipids measurement. The cassava wastewater showed 92.38% of humidity, 30.2 g.L⁻¹ of reducing sugars, 51 g L⁻¹ of total sugars, 1.17% of protein and 0.53% of ash, titratable acidity 3.20 (NaOH.100 meq ml⁻¹), total soluble solids of 7,0 °Brix and pH equivalent to 5.26. In the cultivation using a medium containing 20 % de cassava wastewater, the maximum biomass was equivalent to 7.49 g.L⁻¹, 96 h after the inoculum, and the same time interval were produced 2,25 g.L⁻¹ de lipids, equivalent 30% of the lipids in dry biomass. Were produced 4,10, 6,95, 5,77 g.L⁻¹ of biomass and 13,33, 7,71 and 8,47% of lipids in the cultivations with 50, 75 and 100% of cassava wastewater, respectively. The culture with syntethic medium produced 9,39 g.L⁻¹ of biomass and 41,92 % of lipids. The experiment with 100% manipueira showed the best yield coefficient conversion of total reducing sugars in biomass (0.5188 gg⁻¹) and the culture with 50%, the best performance in the production of lipids (0.0049 gg⁻¹). Cassava wastewater was observed as a potential substrate for the production of lipids by *Rhodotorula mucilaginosa* and can be used in a fermentation processes, adding value to the waste and minimizing possible environmental impacts by improper discard.

Keywords: inoculum, waste, *Rhodotorula mucilaginosa*, biomass.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Manipueira armazenada em garrafa plástica	22
Figura 2 – Lipídios dissolvidos em clorofórmio	32
Figura 3 – Lipídios após evaporação do clorofórmio	32
Figura 4 – Levedura <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> reativada	46
Figura 5 – Levedura <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> em placa de Petri	46
Figura 6 – Cultivo em meio sintético após 120 h do inóculo	47
Figura 7 – Biomassa da levedura <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> centrifugada com o sobrenadante	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição físico-química de alguns cultivares de mandioca mansa (doce adaptado de Ceni et al. (2009)	21
Tabela 2 - Comparação entre a manipueira extraída de fecularias caseira e industrial	23
Tabela 3 - Produção de compostos de interesse utilizando a manipueira	25
Tabela 4 - Produção de lipídios utilizando a levedura <i>R. mucilaginosa</i>	29
Tabela 5 - Composição do meio YMA (<i>Yeast Malt Agar</i>)	46
Tabela 6 - Componentes do meio de cultivo sintético para crescimento da levedura <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (Frengova et al, 1994)	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVO	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	16
3.2	MANDIOCA	17
3.2.1	Cultivo da mandioca	18
3.2.2	Produtividade da mandioca	19
3.2.3	Composição físico-química da mandioca	20
3.3	MANIPUEIRA	21
3.3.1	Manipueira e o meio ambiente	23
3.3.2	Usos da manipueira	24
3.4	LEVEDURAS OLEAGINOSAS.....	26
3.4.1	Leveduras do gênero <i>Rhodotorula</i>	28
3.4.1.1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	29
3.5	LIPÍDIOS	29
3.5.1	Lipídios microbianos	30
3.5.2	Acúmulo de lipídios em micro-organismos	33
3.5.3	Fatores que exercem influência no acúmulo de lipídios por leveduras	34
3.6	ESTADO DA ARTE (PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE LIPÍDIOS)	37
4	METODOLOGIA	42
4.1	MANIPUEIRA	42
4.1.1	Tratamento da manipueira	42
4.1.2	Análises físico-químicas do substrato	42
4.1.2.1	Açúcares redutores e totais	42
4.1.2.2	Determinação de umidade	43
4.1.2.3	Determinação de cinzas	44
4.1.2.4	Determinação de proteínas	44
4.1.2.5	pH	45
4.1.2.6	Determinação de acidez total titulável	45

4.1.2.7	Determinação de sólidos solúveis totais (°Brix)	45
4.2	MICRO-ORGANISMO	45
4.3	CULTIVO EM MEIO SINTÉTICO	46
4.4	PREPARO DO INÓCULO	47
4.5	CONDIÇÕES DE CULTURA	48
4.6	MÉTODOS ANALÍTICOS	48
4.6.1	Biomassa	48
4.6.2	Lipídios	48
	REFERÊNCIAS	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
	ARTIGO 1- Produção biotecnológica de lipídios por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> utilizando manipueira	60
	ARTIGO 2 - AVALIAÇÃO DA MANIPUEIRA COMO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA E LIPÍDIOS PELA LEVEDURA <i>RHODOTORULA</i> <i>MUCILAGINOSA</i>	66
	APÊNDICE	81

1 INTRODUÇÃO

Em virtude da alta e constante atividade industrial distribuída pelo mundo, todos os dias são gerados milhares de toneladas de resíduos agroindustriais. Muitos destes resíduos não são aproveitados, sendo descartados diretamente no meio ambiente sem nenhum tratamento prévio. Devido à grande biodiversidade de seu território, o Brasil tem a sua disposição uma grande variedade desses resíduos, sendo que o processamento dos mesmos seria interessante do ponto de vista econômico, ambiental e social (RAMOS, 2000).

As indústrias transformadoras geram resíduos passíveis de aproveitamento, contudo em sua maioria, são descartados no meio ambiente, promovendo perda econômica e impactos ambientais por possuírem uma alta Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO). Investimentos que possibilitem uma melhor gestão de resíduos industriais podem contribuir de forma significativa para promover o desenvolvimento sustentável de um país. Uma alternativa relacionada ao aproveitamento de subprodutos, resíduos e efluentes é a produção (por processos biotecnológicos) de substâncias importantes (FEDERICI et al., 2009; MUSSATTO; TEIXEIRA, 2010). Por tais processos, podem ser obtidos agentes antioxidantes, agentes antimicrobianos, vitaminas, enzimas, lipídios, celulose, amido, proteínas e pigmentos, substâncias de grande interesse da indústria alimentícia (LAUFENBERG; KUNZ; NYSTROEM, 2003; WYMAN, 2003).

O bioprocessamento de resíduos agrícolas é de grande interesse econômico, ambiental e social. Entre estes, destaca-se a manipeira, que é um resíduo da indústria processadora de mandioca, produzida em grande quantidade no Brasil e apesar dos nutrientes que possui é um resíduo pouco aproveitado e muitas vezes descartado de forma incorreta no meio ambiente. Através do processamento da mandioca obtém-se farinha, fécula, e muitos outros produtos característicos de várias regiões do Brasil como a tapioca, a manipeba e o beiju (BORGHETTI, 2009).

Lipídios microbianos podem ser produzidos utilizando-se substratos pouco onerosos como glicerol bruto, soro de leite, gordura bruta e óleos originários de uma pirólise (ZHAO et al., 2008). Além disso, apresentam muitas vantagens quando comparados aos óleos obtidos de plantas como ciclo de vida mais curto, requer menos mão de obra, não é afetado pelo local, clima, estação, possibilidade de produção em sistemas fechados e ampliação de escala (THIRU, SANKH; RANGASWAMY, 2011; LIANG; JIANG, 2013).

A utilização da manipueira como meio de cultura em processo biotecnológico para a obtenção de lipídios, resulta em agregação de valor ao resíduo e consequentemente reduz o descarte inadequado no ambiente, favorecendo desenvolvimento sustentável nas indústrias geradoras deste substrato. Além disso, contribuiria com a redução do impacto ambiental ocasionado pelo seu descarte inadequado na natureza. O baixo custo deste substrato de fermentação também é um fator de destaque, sendo fundamental para assegurar a viabilidade econômica do processo, permitindo com que os lipídios de origem biológica possam competir no mercado com os seus análogos químicos.

A produção de substâncias com potencialidade para uso na indústria química, farmacêutica, ou de alimentos, por processo biotecnológico, mostra-se como uma interessante alternativa, pois pouco se sabe a respeito dos aspectos nutricionais e funcionais destes compostos e a obtenção e caracterização destes possibilitará um provável uso em alimentos.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter lipídios, por processo biotecnológico, utilizando a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688 e a manipueira como substrato.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a composição físico-química do substrato (manipueira);
- Avaliar o efeito da substituição parcial da glicose em meio sintético pela manipueira (20% v/v) na produção de biomassa pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688;
- Avaliar o efeito da concentração de manipueira (50, 75 e 100% v/v) na produção de biomassa e lipídios por *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688, comparando com o meio sintético.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Avanços consideráveis no agronegócio acarretaram em um aumento da utilização de insumos e, conseqüentemente, em uma elevação da geração de resíduos nas atividades agropecuárias e agroindustriais. De acordo com Santos et al. (2013), o aumento da exploração dos recursos naturais em virtude da evolução da industrialização resulta em um grande acúmulo de resíduos no meio ambiente. Estes resíduos podem ser orgânicos ou inorgânicos, compostos por estruturas de alta ou baixa massa molecular, onde na maioria das vezes, são complexos e apresentam composição bastante diversificada.

Vários setores do mercado mundial têm se mobilizado decorrente da crescente preocupação com o meio ambiente. Diversas entidades governamentais e indústrias transformadoras estão se preparando para a adoção de uma política ambiental capaz de reduzir os impactos ambientais. Resoluções, tais como a RDC 306/04, resolução da ANVISA e a Resolução 388/05 do CONAMA que objetivam a classificação, o tratamento, a manipulação e o descarte dos resíduos, estão sendo submetidas a constantes revisões (PELIZER et. al., 2007).

Segundo Laufenberg (2003), resíduos originários de processos agroindustriais podem conter inúmeras substâncias de alto valor, podendo ser transformados em produtos comerciais ou servir como matérias-primas para processos secundários. Grande parte destes resíduos é adequada para separação e reciclagem. Timofiecsyk e Pawlowsky (2000) relatam que além de poder criar problemas para o meio ambiente, os resíduos desperdiçados representam perda de matéria-prima e energia e exigem gasto adicional para um posterior descarte, sendo que alguns deles não eliminam os resíduos gerados, apenas os transferem para outro meio diferente do habitual.

Investimentos na gestão de resíduos industriais podem contribuir para promover a sustentabilidade de um país. O aproveitamento de subprodutos, resíduos e efluentes para a produção, por processos biotecnológicos, de substâncias importantes configura-se como uma excelente alternativa, possibilitando a produção de agentes antioxidantes, agentes antimicrobianos, vitaminas, enzimas, lipídios, celulose, amido, proteínas e pigmentos (FEDERICI et al., 2009; MUSSATTO; TEIXEIRA, 2010; LAUFENBERG; KUNZ; NYSTROEM, 2003; WYMAN, 2003).

O principal problema relacionado com a utilização de substratos alternativos como meio de cultura é encontrar um substrato com um balanço correto de nutrientes que permita o crescimento celular e a acumulação de produto (MAKKAR; CAMEOTRA, 1999). A manipueira é um resíduo rico em carboidratos e sais minerais que é gerado em grandes quantidades durante a produção de farinha de mandioca, sendo considerado um substrato muito atrativo para processos biotecnológicos (NITSCHKE; PASTORE, 2006).

A produção de fécula de mandioca para fabricação de farinha ou de outros produtos resulta na geração de cerca de 10 a 15% da massa da raiz em resíduos sólidos. De acordo com o IBGE 2015, no ano de 2014 foram recebidas aproximadamente 2,3 milhões de toneladas de mandioca para produção de fécula, 19,7% a mais do que no ano de 2013. Os resíduos gerados durante o processamento são utilizados principalmente como ração animal após secagem, o que resulta em baixa agregação de valor (SRIROTH et al., 2000).

Entretanto, Lima (2001) ressalta que os resíduos líquidos da mandioca devem receber maior atenção devido a apresentarem em sua composição diversas substâncias tóxicas que podem ser prejudiciais ao meio ambiente. Já a casca e a massa são ricas em fibras e contém ainda parte do amido proveniente do processo de extração, podendo ser aproveitadas de formas diferentes das convencionais, cujo uso se dá principalmente para alimentação animal e adubação (CARDOSO, 2003).

3.2 MANDIOCA

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta que pertence à ordem *Malpighiales*, família *Euphorbiaceae*. Entre as 98 espécies conhecidas da família *Euphorbiaceae* é a única destinada para fins alimentícios. É bastante utilizada para a nutrição humana e animal servindo de matéria-prima para a fabricação de vários produtos, dentre eles os mais importantes são a farinha, a fécula e o polvilho de mandioca (AVANCINI et al., 2007).

A mandioca pode ser dividida em dois grupos: a mandioca brava e a mandioca mansa (doce). Apesar de não haver diferença morfológica específica para distinguir a mandioca brava, comumente utilizada para fabricação de farinha, e a mandioca doce, ou mansa, alguns marcadores de DNA podem estabelecer uma distinção entre estes dois grupos (MUHLEN; MARTINS; ANDO, 2000).

Com o passar dos anos, as crenças populares têm transmitido, geração após geração, as diferenças entre estes grupos de mandioca: a mandioca “brava” ficou conhecida como o tipo

que apresenta altas concentrações de glicosídeos cianogênicos, impedindo sua utilização na alimentação humana e animal, sem tratamento adequado, e a mandioca “doce” ou “mansa”, cujo consumo com pouco processamento é mais seguro. Atualmente as mandiocas mansas são conhecidas como as variedades de mesa (PEREZ, 2007).

A mandioca é um arbusto originário da América do Sul, porém posteriormente se distribuiu pelas regiões tropicais e subtropicais do continente africano e asiático, e tem sido o foco da pesquisa em algumas áreas-chaves em virtude da fácil acessibilidade e do seu potencial na economia em geral (BLAGBROUGH et al., 2010).

O nome é de origem Tupi (*mani-óca, a casa de Mani*), é uma raiz nativa do continente sul-americano, foi bastante explorada pelas sociedades pré-colombianas que já a cultivavam e processavam quando os europeus chegaram à América do Sul (SEBRAE, 2008).

O hábito de consumir mandioca no Brasil prevalece desde a época do descobrimento. A mandioca é cultivada em praticamente todos os Estados sendo destaque para a alimentação humana e animal, além de servir como matéria-prima para diversos produtos industriais (CARDOSO, 2003).

A fécula de mandioca, depois de adequada extração e lavagem, pode ser seca e armazenada para um futuro processamento, ou ser usada como pasta na produção de gêneros alimentícios tais como amidos modificados ou vários edulcorantes por meio de hidrólise ácida e enzimática, como o xarope de frutose produzido enzimaticamente (SHETTY et al., 2014).

3.2.1 Cultivo da mandioca

A mandioca é cultivada em todas as regiões do Brasil, sendo que no Norte e no Nordeste é amplamente utilizada, consumida principalmente na forma *in-natura*. Nessas regiões também é forte o predomínio do processamento, principalmente para a produção de farinha e fécula. No Sul e Sudeste a maior parte da raiz é utilizada para a indústria (FELIPE; RIZATO; WANDALSEN, 2009).

Uma vantagem da mandioca com relação a outros cultivos é a capacidade de proporcionar grandes rendimentos. Matérias-primas como milho, trigo e cana-de-açúcar não são cultivadas e não crescem com a mesma abundância. O seu cultivo também é responsável pelo crescimento econômico e estabilidade social dos pequenos produtores (SHETTY et al., 2014).

Além disso, comparada a outras culturas, o cultivo da mandioca apresenta algumas vantagens como boa rentabilidade e realização da colheita no momento em que o produtor achar mais conveniente, assim o alto potencial no setor de negócios e na produção de tal raiz

proporciona uma agregação de valor aos derivados da mandioca, podendo estes ser utilizados em várias indústrias, inclusive a alimentícia (BORGHETTI, 2009).

A mandioca é cultivada em mais de cem países, sendo a África o continente de maior produção, e lá o tubérculo destina-se à subsistência. Na Ásia destaca-se a indústria de derivados, com a produção principalmente de fécula e recentemente a fabricação de etanol (FAO, 2008). Os países da África são responsáveis por mais de 50% da produção mundial de mandioca, entretanto o processamento industrial do amido de mandioca para fabricação de adoçantes ainda não tem sido bem desenvolvido (SHETTY et al., 2014).

Cunha (2007) relata que o beneficiamento da mandioca vem se destacando no setor agroindustrial no Brasil. A agroindústria da mandioca gera uma receita bruta de 2,5 bilhões de dólares e um milhão de empregos diretos. Dentre os produtos obtidos, 33,9% destina-se à alimentação humana; 50,2% são usados para alimentação animal; 5,7% a outros usos; 0,2% são exportados; e os 10% restantes correspondem às perdas.

3.2.2 Produtividade da mandioca

A produtividade média mundial da mandioca se aproximou das 13 toneladas métricas (MT) por hectare, com uma produção total superior a 260 milhões de toneladas em 2012 (FAO, 2013).

Com relação ao ano de 2012, a área de mandioca plantada no Brasil cresceu 18,1% em relação ao ano anterior, porém foram produzidas 24.313.883 toneladas em 2012, havendo uma redução de 4,0% em relação a 2011. O rendimento médio também caiu 8,0%, ficando em 13.356 kg por hectare. Essa redução explica-se pela forte seca enfrentada pela Região Nordeste, que concentra as principais unidades produtoras. As maiores perdas da produção foram no Piauí (37,5%), Paraíba (27,9%), Bahia (23,0%), Rio Grande do Norte (22,4%), Maranhão (14,1%), Pernambuco (13,1%) e Sergipe (6,9%). Já na Região Sudeste, em 2012 a produção de mandioca foi de 2.795.493 toneladas, 14,2% maior que em 2011, reflexo do aumento da área plantada em 7,0% (IBGE, 2012).

Comparando-se o mês de junho e julho do ano de 2015, a área de mandioca plantada (hectares) teve uma queda de 0,1%. No mesmo período a produção (em toneladas) aumentou 0,2%, atingindo 24.154.377 toneladas, fazendo com que o rendimento médio (Kg.ha^{-1}) da produção entre esses dois meses tivesse um aumento de 0,3% (IBGE, 2015).

Dados do IBGE (2015) evidenciam ainda que houve um aumento de 3,1% na área plantada (ha) no ano de 2015 com relação ao ano de 2014. A produtividade média (Kg.ha^{-1})

também cresceu chegando próximo a 15 toneladas por hectare, resultante do aumento de 4,4% da produção entre os dois anos.

No ano de 2014, a área plantada de mandioca no Brasil foi equivalente a 1.570.580 hectares, alcançando uma produção de 23.142.091 toneladas (IBGE 2015). Considerando-se que aproximadamente 70% dessa produção foi processada para produção de fécula e que 1 tonelada de mandioca processada gera em média 300 L de manipueira, só no ano de 2014 foram produzidos cerca de 4.859.839.110 L do resíduo líquido da mandioca.

3.2.3 Composição físico-química da mandioca

Shetty et al. (2014) relatam que a mandioca pode conter de 24 a 30% de amido, baixos teores de proteína e lipídios. Dependendo do cultivar e das condições de cultivo, pode também quantidades letais de glicosídeos cianogênicos, que podem ser reduzidos através da cocção.

As raízes de mandioca são geralmente deficientes em micronutrientes importantes como a pró vitamina A, o ferro e o zinco, entretanto, são ótimas fontes de minerais e apresentam boas quantidades de amido e açúcares, sendo consideradas excelentes fontes de carboidratos (BOUIS, 2003, 2007; MAYER et al., 2008). A Tabela 1 contém a composição físico-química de alguns cultivares de mandioca mansa (doce).

Tabela 7 - Composição físico-química de alguns cultivares de mandioca mansa (doce adaptado de Ceni et al. (2009).

Componentes	Cultivares				
	BRS gema de ovo	BRS rosada	Casca roxa	BRS dourada	Saracura
Umidade (g.100g ⁻¹)	66	64	70	70	68
Sólidos totais (g.100g ⁻¹) *	33	36	30	30	32
Cinzas (g.100g ⁻¹)	0,97	0,92	0,76	1,06	0,87
Lipídios (g.100g ⁻¹)	1,3	0,33	0,51	3,5	2,4
Fibra bruta (g.100g ⁻¹)	6,5	2,2	9,2	3,7	3,5
Proteína (g.100g ⁻¹)	1,8	1,8	1,3	1,3	1,2
Amido (g.100g ⁻¹)	39	24	25	29	39
CNA(g.100g ⁻¹)	2,0	2,1	2,3	2,7	1,5
**					
*100 – Umidade		** Carboidratos não amido			

Mesmo sendo de diferentes variedades, a composição química dos diferentes cultivares de mandioca da Tabela 1 são bastante similares, destaque para o baixo teor de lipídios e elevados teores de amido e cinzas.

3.3 MANIPUEIRA

Grande parte da produção nacional de mandioca é consumida na forma *in natura*, entretanto uma parcela é utilizada principalmente para a fabricação de farinha e fécula de mandioca. Durante a fabricação da farinha e da fécula, são gerados alguns resíduos poluentes. Dentre estes resíduos, a manipueira é um dos que mais preocupa com relação ao meio ambiente. Quando depositada sem tratamento, em leitos de rios ou lençóis freáticos, pode causar sérios impactos ambientais (FELIPE; RIZATO; WANDALSEN, 2009).

Através do processamento da mandioca obtém-se farinha, fécula, e muitos outros produtos característicos de várias regiões do Brasil, como a tapioca, a manipeba e o biju. Para se produzir a farinha, a raiz de mandioca é triturada e espremida, originando uma massa esbranquiçada com alta umidade, que é seca e torrada, já para a fabricação de fécula adiciona-se um grande volume de água à massa, resultando em um volume extra equivalente a 60% da matéria-prima em resíduos líquidos, conhecido popularmente como manipueira (BORGHETTI, 2009).

A manipueira é um líquido amarelo-claro que contém açúcares, gomas, proteínas, linamarina, derivados cianogênicos, sais e outras substâncias. É um resíduo rico em carboidratos produzido em grandes quantidades durante a produção de farinha de mandioca, um alimento muito comum na culinária brasileira, principalmente no Nordeste (NITSCHKE; PASTORE, 2003).

O Brasil é um dos maiores produtores de mandioca do mundo e no processo de fabricação do amido, sendo que uma tonelada de mandioca gera aproximadamente 300 a 600 L de manipueira, dependendo da quantidade de água adicionada durante o processo de moagem (PETERS; NGAI; AN, 2000; BORGHETTI, 2009). Na Figura 1 temos a ilustração da manipueira armazenada em garrafa plástica.

Figura 1-Manipueira armazenada em garrafa plástica



Fonte: Autor

Segundo Fioretto (2001), a composição química da manipueira varia bastante e depende de vários fatores, como da espécie de mandioca e das condições climáticas onde foi cultivada. Dessa forma, as informações a respeito da composição da manipueira são bastante

contrastantes. De forma geral a manipueira é composta de quantidades variadas de macro e micronutrientes e também de glicosídeos cianogênicos. A Tabela 2 contém a comparação físico- química entre a manipueira extraída de fecularias caseira e industrial.

Tabela 8 - Comparação entre a manipueira extraída de fecularias caseira e industrial

Elemento	Unidade	Caseira				Industrial		
		A	B	C	D	Fecularia 1	Fecularia 2	Fecularia 3
Nitrogênio	mg.L ⁻¹	880	880	880	880	860	850	ND
Fósforo	mg.L ⁻¹	380	180	170	90	290	450	ND
Potássio	mg.L ⁻¹	3900	6120	5250	470	340	380	400
Cálcio	mg.L ⁻¹	2030	4220	4300	4320	950	250	3100
Magnésio	mg.L ⁻¹	570	1570	1470	1420	480	200	700
Manganês	mg.L ⁻¹	2,0	6,0	4,0	2,5	1,0	ND	2,5
Ferro	mg.L ⁻¹	93	50	83	25	20	24	2,5
Cianeto livre	mg.L ⁻¹	40	26	40	26	40	40	26
pH	-	6,24	6,18	6,30	6,36	6,0	6,6	6,10
DQO	mg.L ⁻¹	1,776	1,982	1,986	1,986	1,638	1,6	1,705

Adaptado de NASU, (2008).

A alta Demanda Química de Oxigênio (DBO) é uma das principais causas dos problemas ntais causados pela manipueira quando descartada sem nenhum tratamento prévio. Por outro lado, a rica composição mineral, sendo excelente fonte de potássio e cálcio, torna o resíduo potencial para cultivo de micro-organismos e produção de substâncias importantes.

3.3.1 Manipueira e o meio ambiente

Um dos principais problemas relacionados ao despejo de manipueira diretamente no ambiente é a grande quantidade de matéria orgânica e a presença do ácido cianídrico que é tóxico para peixes e plantas. Entretanto o pré-tratamento desse resíduo possibilita a utilização do mesmo para o cultivo de micro-organismos aquáticos com elevado valor proteico. Dessa forma, o cultivo de microalgas em resíduos agroindustriais como a manipueira aparece como uma provável solução para reduzir os custos com meios de cultura (BORGHETTI, 2009).

Para atender a legislação ambiental, a manipueira deve ser tratada antes de ser liberada. Muitas técnicas de tratamento têm sido propostas para remover compostos poluentes orgânicos e inorgânicos, mas estes processos necessitam de alto custo operacional além de uma grande área reservada para o tratamento. Uma das saídas para reduzir estes custos é utilizar o resíduo para a geração de energia ou como substrato para a produção de compostos de utilidade industrial (ANGENENT et al., 2004; RABAEY; VERSTRATE, 2005).

As demandas química e bioquímica de oxigênio da manipueira são altas, assim como a quantidade de sólidos totais e de substâncias orgânicas que são extraídas das raízes da mandioca. Estudos já demonstraram a viabilidade para produção de biogás através da manipueira; já a produção de biohidrogênio, por exemplo, ainda é considerada limitada devido a poucas informações obtidas, o que se sabe é que o amido presente pode ser convertido em maltose e glicose por hidrólise ácida ou enzimática, seguida pela conversão biológica em ácidos orgânicos e em seguida em biohidrogênio (REUNGSANG et al., 2006; KAPDAN KARGY, 2006).

Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas para o aproveitamento do resíduo líquido da mandioca e uma delas consiste em converter compostos orgânicos presentes na manipueira em metano, representando uma alternativa promissora, já que por meio desta consegue-se gerar energia e degradar compostos poluentes de forma simultânea (COLIN et al., 2007; ZHANG et al., 2010).

De acordo com Borghetti (2009), o tratamento e/ou aproveitamento da manipueira tem sido discutido em vários estudos envolvendo oxidação aeróbica e anaeróbica, visando sempre o reaproveitamento de todos os seus componentes para uso principalmente na agricultura como herbicidas, nematicidas ou inseticidas.

3.3.2 Usos da manipueira

A manipueira foi utilizada por Damasceno et al. (2003) para a produção de compostos voláteis semelhantes aqueles encontrados em muitas frutas, utilizando *Geotrichum fragrans* como micro-organismo. O substrato utilizado era composto de dextrina (2,6%), maltose (1,4%), sacarose (32,1%), glicose (38,3%) e frutose (25,6%). A produção de biomassa de *G. fragrans* cultivado por 12 h foi de 12,8 g.L⁻¹ e os compostos voláteis identificados após 72 h de cultivo foram os seguintes: 1-butanol, 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico), 2-metil-1-butanol, 1-3 butanodiol e feniletanol; acetato de etila, propionato de 2-etil-metil-propanóico e 2-metil. Os resultados mostraram que o efeito da suplementação do substrato com glicose (50

g.L⁻¹), frutose (50 g.L⁻¹) e extrato de levedura (200 mL.L⁻¹) não afetou os perfis qualitativos e quantitativos dos compostos voláteis produzidos.

Nitschke e Pastore (2006) investigaram a produção e as propriedades de um biossurfactante sintetizado por *Bacillus subtilis* utilizando a manipueira como substrato. O micro-organismo produziu 3,0 g.L⁻¹ de surfactante, ocasionando na redução da tensão superficial do meio em 26,6 mPa após 48 h de cultivo. O agente tensoativo obtido foi capaz de formar emulsões estáveis com vários hidrocarbonetos e suas propriedades permitiram elevar a temperatura de substâncias de alta salinidade (20% de NaCl) até 100 °C, a uma grande variedade de valores de pH.

A influência da variação da concentração da manipueira, expressos como Demanda Química de Oxigênio (DQO), na produção de hidrogênio, foi verificada por CAPPELLETTI et al. (2011). Cinco concentrações de manipueira correspondentes a 5,0 g.L⁻¹, 7,5 g.L⁻¹, 10,7 g.L⁻¹, 15,0 g.L⁻¹ e 30 g.L⁻¹ foram testadas utilizando-se o *Clostridium acetobutylicum*. Os resultados obtidos mostraram que as concentrações mais elevadas (15,0 g.L⁻¹ e 30 g.L⁻¹) do substrato resultaram em baixos rendimentos de hidrogênio.

O metano presente na manipueira pode ser utilizado como recurso energético nas fecularias. Dessa forma, podem-se reduzir os custos de produção da fécula de mandioca devido à economia de lenha ou energia elétrica utilizadas para o aquecimento das caldeiras (FELIPE; RIZATO; WANDALSEN, 2009). A Tabela 3 contém alguns usos da manipueira para produção de diversos compostos de interesse.

Tabela 9 - Produção de compostos de interesse utilizando a manipueira

Micro-organismo	Composto produzido	Referência
<i>Bacillus subtilis</i>	Biossurfactante	NITSCHKE; PASTORE (2006)
<i>Geotrichum fragrans</i>	Compostos voláteis	Damasceno et al. (2003)
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Hidrogênio	CAPPELLETTI et al. (2011)
-	Metano	FELIPE; RIZATO; WANDALSEN (2009).

3.4 LEVEDURAS OLEAGINOSAS

São denominados oleaginosos os micro-organismos capazes de acumular lipídios em níveis superiores a 20% de sua biomassa. Entre as mais de 1600 espécies de leveduras conhecidas, menos que 40 são consideradas oleaginosas (SITEPU et al., 2013). Leveduras oleaginosas são capazes de produzir lipídios com perfis de ácidos graxos similares aos de óleos vegetais, com ácidos graxos saturados e monoinsaturados, principalmente contendo de 16 a 18 átomos de carbono na cadeia (PAPANIKOLAU; AGGELIS, 2011).

Modificações genéticas para melhorar a produtividade ou para a obtenção de um perfil de ácidos graxos desejado é mais fácil para lipídios originários de micro-organismos (especialmente leveduras e bactérias) do que de insetos e plantas (soja, palma). Diferentemente dos óleos obtidos a partir de plantas oleaginosas, onde a produtividade é representada em quilogramas por hectare por ano ($\text{Kg} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{ano}^{-1}$), a produção de óleo microbiano é geralmente representada em gramas por litro por dia ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$), ou em quilograma por metro cúbico por dia ($\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{dia}^{-1}$) (SAWANGKEAW; NGAMPRASERTSITH, 2013).

Leveduras, bactérias, microalgas e fungos filamentosos são capazes de converter uma fonte de carbono, quando em excesso, em triacilgliceróis no interior de suas células. Dentre estes micro-organismos, leveduras unicelulares, desprovidas de endotoxinas e que possibilitem o cultivo em grande escala são mais interessantes para a biotecnologia (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011).

Na biotecnologia as leveduras são muito utilizadas porque são geneticamente tratáveis, fáceis de cultivar, têm um longo histórico de uso seguro e poucas espécies são conhecidas por ser patogênicas para seres humanos, plantas e animais. São também úteis para a produção renovável e sustentável de óleos biodegradáveis com potencial para uso em gêneros alimentícios, combustíveis e produtos químicos (SITEPU et al., 2014).

Entre os micro-organismos oleaginosos, leveduras levam vantagem sobre fungos, bactérias e algas devido a sua relativa elevada taxa de crescimento e a habilidade para acumular lipídios em suas células rapidamente. Além disso, podem ser cultivadas em uma grande variedade de meios de baixo custo, como resíduos provenientes da agricultura e da indústria (XUE et al., 2006; MALISORN; SUNTORNSUK, 2007; ANGERBAUER et al., 2008).

Algumas pesquisas têm sido desenvolvidas utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo genético para melhoria na compreensão do metabolismo lipídico.

Apesar desta não ser uma levedura oleaginosa, as enzimas envolvidas no processo de síntese e de degradação de triacilgliceróis são muito similares entre as espécies, principalmente em leveduras (CZABANY; ATHENSTAEDT; DAUM, 2007).

As leveduras são amplamente utilizadas na biotecnologia porque são seres que apresentam uma genética tratável, são fáceis de cultivar, além de apresentar um bom histórico com relação à segurança de cultivo já que poucas espécies são patogênicas (SAWANGKEAW; NGAMPRASERTSITH, 2013).

Geralmente almeja-se o uso de linhagens que apresentam uma melhor cinética de desenvolvimento, com uma maior velocidade de crescimento, necessitando de menores tempos de cultivo, que não produzam substâncias indesejáveis e que tenham a capacidade de metabolizar substratos de custo reduzido. O uso da biomassa ou de algum metabólito da fermentação para fins alimentícios requer a adoção de micro-organismos seguros, certificados como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) (POLI et al., 2013).

Leveduras são bastante úteis para a produção renovável e sustentável de óleos biodegradáveis com potencial para serem utilizados em combustíveis, produtos químicos e gêneros alimentícios. Muitas descobertas foram feitas no início da década sobre a produção de óleo a partir de leveduras que impulsionaram novos estudos incluindo a descoberta de espécies que produzem grandes quantidades de lipídios, assim como condições que permitem tal produção através da conversão de resíduos de produtos em óleos microbianos em pequenas e grandes escalas (SAWANGKEAW; NGAMPRASERTSITH, 2013).

Para atender o elevado crescimento da produção de biodiesel, em função da alta demanda diferentes fontes de óleos, principalmente os não comestíveis, necessitam ser estudados. Recentemente a atenção tem sido voltada para a exploração de óleos provenientes de micro-organismos, sendo que estes podem se tornar uma das melhores fontes para a produção de biodiesel no futuro (LI; DU; LIU, 2008).

Apenas algumas leveduras e fungos, junto com um menor número de algas, são capazes de sintetizar e acumular lipídios. Bactérias, em geral, não produzem triacilgliceróis, mas em vez disso sintetizam poli-b-hidroxi-butiratos como polímeros de armazenamento.

As leveduras oleaginosas mais conhecidas incluem os gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Yarrowia*. Estas leveduras são capazes de acumular em média 40% de lipídios com relação à sua biomassa, entretanto em condições de limitação de nutrientes este acúmulo pode atingir 70%. O conteúdo e o perfil lipídico produzido diferem de espécie para espécie. *Cryptococcus curvatus* e *Cryptococcus albidus* acumulam 58% e 65% de lipídios, respectivamente. A composição lipídica também difere já que *Cryptococcus*

curvatus acumula grandes quantidades de ácido palmítico, já o principal ácido graxo acumulado por *Cryptococcus albidus* é o ácido oleico (BEOPOULOS et al., 2009).

Por muitas décadas a maioria das pesquisas relacionadas ao estudo de leveduras oleaginosas tem sido voltadas para espécies como *Y. lipolytica*, *Lipomyces*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula graminis*, *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus albidus* e *Rhodospiridium toruloides*. Entretanto há dezenas de espécies oleaginosas que foram descobertas ao longo dos anos, mas tem sido menos estudadas. Abordando-se uma faixa mais ampla de leveduras oleaginosas, é possível realizar a seleção de leveduras e substratos específicos, tolerância à osmose, ao pH adverso e à inibição (SITEPU et al., 2014).

3.4.1 Leveduras do gênero *Rhodotorula*

Leveduras do gênero *Rhodotorula* são aeróbios estritos com características metabólicas peculiares. Uma delas é a capacidade de produzir glicogênio durante a fase exponencial de crescimento. Também são capazes de acumular lipídios e carotenoides durante a fase estacionária de crescimento (DWORECKA-KASZAK; KIZERWETTER- SWIDA, 2011).

Essas leveduras apresentam uma produção lipídica bastante divergente. Enquanto a *Rhodotorula glutinis* pode acumular até 72% de lipídios em biomassa, *Rhodotorula graminis* acumula cerca de 36%, entretanto o perfil de ácidos graxos dos lipídios produzidos por ambas é semelhante (BEOPOULOS et al., 2009).

Xue et al. (2008) utilizaram a levedura *R. glutinis* para produzir lipídios com potencial para a produção de biodiesel tendo como substrato águas residuais de glutamato monossódico. Nesse estudo, o efeito da adição de glicose foi estudado e os resultados mostraram que a adição de glicose favoreceu o crescimento da levedura e a produção de lipídios.

Do ponto de vista ambiental, leveduras do gênero *Rhodotorula* desempenham uma função importante. Estudos mencionam o potencial dessas leveduras no tratamento de resíduos já que precipitações químicas podem ser ineficazes ou inviáveis economicamente. Comparados com os métodos tradicionais, a biossorção apresenta várias vantagens como baixo custo de operação, alta eficiência na desintoxicação e um volume mínimo de resíduos descartáveis (BAI et al., 2010).

Embora leveduras sejam micro-organismos não fotossintéticos, algumas são capazes de biossintetizar carotenóides na célula. Leveduras do gênero *Rhodotorula* são capazes de acumular carotenoides no interior de suas células. A síntese de carotenoides naturais com

elevada importância comercial (β -caroteno, toruleno, torularodina) torna esses micro-organismos como fontes potenciais destes pigmentos (FRENGOVA e BESHKOVA, 2009).

Devido as suas propriedades antioxidantes, anticancerígenas, estimulantes de resposta imune, nutracêuticos e corantes, os carotenoides são amplamente utilizados na medicina e nas indústrias química, farmacêutica, de cosméticos, de alimentos e de rações (CUTZU et al. 2013; BHOSALE; BERNSTEIN, 2004).

3.4.1.1 *Rhodotorula mucilaginosa*

Vários substratos foram usados para a produção de lipídios pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, alguns deles são mostrados na Tabela 4.

Tabela 10 - Produção de lipídios utilizando a levedura *R. mucilaginosa*

Substrato	Referência
Glicerol bruto	Spier (2014)
Inulina hidrolisada e tubérculos de alcachofra	Zhao et al. (2010)
Amido de mandioca	Li et al. (2010)
Melaço de cana-de-açúcar	Karatay; Donmez (2010)

3.5 LIPÍDIOS

Principais constituintes do grupo dos lipídios, óleos e gorduras são componentes orgânicos dos alimentos formados por uma mistura de compostos denominados de triacilgliceróis, onde a maioria deles é constituída por três ácidos graxos e um poliálcool, geralmente o glicerol (BUTOLO, 2001). Podem ser encontrados em células vegetais, animais ou microbianas e são os maiores constituintes do tecido adiposo, exercendo diversas funções no organismo como: excelente fonte energética, fonte de ácidos graxos essenciais, transporte de vitaminas lipossolúveis, isolamento térmico, forte influência no sabor e palatabilidade dos alimentos (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007).

Os lipídios são moléculas biológicas com estrutura diversificada que são relativamente insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Eles dividem-se em duas classes básicas: moléculas derivadas de unidades fromisopreno, tais como os esteroides, carotenoides e ácidos graxos e seus similares como alcanos e alcenos (SITEPU et al., 2014).

Os ácidos graxos, juntamente com o glicerol, constituem os lipídios simples. Nos lipídios compostos, além destes também pode haver grupos fosfóricos, grupos nitrogenados

ou carboidratos. Podem ser saturados ou insaturados, sendo que os primeiros predominam em lipídios no estado sólido (gordura) e os últimos em lipídios no estado líquido (óleos). Os ácidos graxos insaturados podem ser definidos como ácidos monocarboxílicos contendo uma ou mais ligações duplas entre dois carbonos localizados na porção hidrocarbônica da molécula. São classificados de acordo com a quantidade de duplas ligações em mono ou poliinsaturados. Encontram-se principalmente na configuração “*cis*” da dupla ligação, sendo que a localização da primeira dupla ligação da cadeia carbônica, a partir do grupo metila, caracteriza a série do ácido graxo, por meio da letra ω , sendo os principais ω -3, ω -6 e ω -9 (SANTOS et al., 2013).

Santos et al. (2013) ressaltam que entre os ácidos graxos monoinsaturados (os que apresentam apenas uma ligação dupla ao longo da cadeia carbônica), o oleico (C18:1), da série ω -9, é o mais comum e é encontrado em grande quantidade no óleo de oliva.

Entre os polinsaturados o mais comum é o linoleico (C18:2), pertencente a família ω -6. O araquidônico (C20:4) da família ω -3 também é muito abundante, tendo como principais fontes a soja, linhaça e canola. Tanto o linoleico quanto o araquidônico são indispensáveis ao ser humano, já que as células dos mamíferos são incapazes de dessaturar (inserir uma dupla ligação) em um carbono antes do nono das cadeias de ácidos graxos (LOTTENBERG, 2009).

A maior parte dos ácidos graxos *trans* é formada durante o processo de hidrogenação de óleos vegetais, onde através de aquecimento e catalisadores metálicos, as duplas ligações são rompidas e os hidrogênios são inseridos nas moléculas dos ácidos graxos. Se em grandes quantidades no organismo, alguns deles como o elaídico (18:1n-9t) podem relacionar-se com enfermidades cardíacas. Pesquisas revelaram que dietas ricas em ácidos graxos *trans* reduzem os teores de Lipoproteínas de Alta Densidade (HDL), do inglês *High Density Lipoproteins* e, conseqüentemente, elevam os níveis das Lipoproteínas de Baixa Densidade (LDL) – *Low Density Lipoproteins* (SIMIONATO, 2008).

3.5.1 Lipídios microbianos

A extensa pesquisa e o desenvolvimento da produção de óleos microbianos realizada ao longo de anos ainda continua e visa melhorar a competitividade econômica entre os lipídios oriundos de micro-organismos com relação àqueles de origem vegetal e animal (CERTIK; SHIMIZU, 1999).

A indústria demonstra um grande interesse pela utilização de micro-organismos oleaginosos para a produção de lipídios em grande escala. Embora o custo de produção de óleos microbianos seja alto comparado aos óleos tradicionais devido à necessidade de

manutenção de condições assépticas, existem várias opções para a produção em larga escala (RATLEDGE; WYNN, 2002).

De acordo com Sitepu et al. (2014), muitas descobertas foram feitas durante as primeiras décadas de trabalho envolvendo a produção de óleos microbianos que impulsionaram novos estudos, incluindo condições de cultura que promovem o acúmulo de lipídios, a descoberta de espécies com alta produtividade e a conversão de resíduos de produtos industriais em lipídios através de leveduras.

Tem se demonstrado que a escolha do substrato depende do micro-organismo oleaginoso utilizado, uma vez que influencia diretamente no crescimento celular e acúmulo de lipídios. Além disso, o conjunto substrato e micro-organismo influenciam diretamente na composição do óleo produzido, assim como também as condições de fermentação, por isso é importante conhecer o efeito de cada parâmetro envolvido no processo fermentativo (LEIVA-CANDIA et al., 2014).

O aumento contínuo na demanda pelo biodiesel de primeira geração, obtido pela transesterificação de óleos, principalmente de plantas oleaginosas, tem elevado o preço de vários gêneros alimentícios, surgindo a necessidade da descoberta de fontes não convencionais de óleos que possam ser convertidos em biodiesel posteriormente. Os micro-organismos oleaginosos são vistos como fontes potenciais para a produção de matéria-prima para o biodiesel de segunda geração. Para o cultivo de tais micro-organismos vários resíduos podem ser utilizados como o glicerol bruto (SPIER, 2014) e o glutamato monossódico (LIU et al., 2012).

Meng et al. (2009) ressaltam que, para a produção de biodiesel alternativo, a maior parte dos trabalhos até o momento tem sido realizados com micro-organismos oleaginosos, isto porque estes podem acumular lipídios em elevadas quantidades, apresentar elevadas taxas de crescimento e o perfil de ácidos graxos dos lipídios produzidos é semelhante ao de óleos vegetais.

Diversos resíduos como hidrolisados lignocelulósicos e soro de leite podem ser utilizados como substrato para a produção de lipídios para a fabricação de biodiesel. Esses resíduos podem ser usados como fonte de carbono e nitrogênio para a síntese de óleos microbianos com ciclo de vida curto e pouco dependente das variações climáticas (AMARETTI et al., 2010).

Entretanto, nem todos os lipídios produzidos por micro-organismos são propícios para a produção de biodiesel. Apenas os lipídios capazes de formar ligações éster e com ácidos graxos livres, chamados de saponificáveis, podem ser convertidos em ésteres de alquila

(VICENTE et al., 2009). Os lipídios microbianos que contêm grandes quantidades de ácido esteárico (C18:0) e ácido oleico (C18:1) são alvos potenciais porque apresentam propriedades interessantes, além de possuir melhor estabilidade oxidativa e apresentar maior potencial para a produção industrial de biodiesel (MENG et al., 2009).

Melhorias no processo de produção de lipídios microbianos como a redução dos custos com transporte, matéria-prima, pré-tratamento, melhor utilização das fontes de carbono em hidrolisados lignocelulósicos, mais rápido crescimento microbiano, atingindo-se uma densidade celular mais elevada e com um maior acúmulo de óleo, podem resultar em um processo de produção economicamente viável (SITEPU et al., 2014).

As Figuras 2 e 3 ilustram lipídios microbianos dissolvidos em clorofórmio e seco, respectivamente.

Figura 2 - Lipídios dissolvidos em clorofórmio



Fonte: Autor

Figura 3 - Lipídios após evaporação do clorofórmio



Fonte: Autor

3.5.2 Acúmulo de lipídios em micro-organismos

A capacidade de acúmulo de lipídios em leveduras é bastante variável, enquanto algumas do gênero *Rhodotorula spp.* e *Cryptococcus curvatus* conseguem acumular de 40 a 70% de lipídios em relação a biomassa seca, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida utilis* são normalmente incapazes de acumular óleo em níveis superiores a 10% da biomassa seca, mesmo quando cultivadas nas mesmas condições (MENG et al., 2009).

“*Single-cell microorganisms*” (SCM), ou micro-organismos unicelulares, constituem uma alternativa potencial para fontes de lipídios de alto valor. Em micro-organismos, diferentes tipos de lipídios neutros são acumulados por diferentes tipos de “SCM”. Nas leveduras oleaginosas, os triacilgliceróis são acumulados no interior das células (ATHENSTAEDT; DAUM, 2006).

O acúmulo de lipídios em um micro-organismo oleaginoso começa quando se esgota um nutriente do meio, normalmente o nitrogênio. O excesso de carbono (geralmente sob a forma de glicose) ainda continua a ser assimilado pelas células e transformado em triacilgliceróis (TAG). As enzimas malato e ATP citrato liase (ACL) tem influência no acúmulo de lipídios em fungos, leveduras e outros micro-organismos oleaginosos (RATLEDGE, 2002).

Durante a fase de crescimento do micro-organismo, o nitrogênio é necessário para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos, enquanto que a fonte de carbono é utilizada para processos energéticos e anabólicos. Quando a fonte de nitrogênio cessa, a taxa de crescimento do micro-organismo diminui, e em oleaginosos a fonte de carbono é convertida em lipídios, que são acumulados dentro das células (AMARETTI et al., 2010).

O acúmulo de lipídios é um processo biológico que desempenha várias funções nos micro-organismos: contribuem para o crescimento e divisão celular, resposta ao stress, além de servir como reserva de energia para a sobrevivência (CHAPMAN; DYER; MULLEN, 2012).

As estratégias para o acúmulo de lipídios variam de acordo com os diferentes tipos de SCM. É importante compreender estas diferenças para que se possa desenvolver um processo tecnológica e economicamente viável para a produção de biocombustíveis, metabólitos lipídicos nutricionais e ácidos graxos polinsaturados (GARAY; BOUNDY-MILLS; GERMAN, 2014).

Dependendo das suas necessidades, as células de seres oleaginosos são capazes de converter lipídios polares em neutros e vice-versa. Lipídios polares podem ser armazenados e

transportados a partir de diferentes membranas celulares. A membrana plasmática é fundamental para o acúmulo de lipídios em eucarióticos e procarióticos. No caso de seres eucarióticos, as membranas do retículo endoplasmático, do peroxossomo, da mitocôndria, dos plastídeos e suas variantes, ou até as membranas dos tilacóides, dependendo do organismo, participam efetivamente do processo (MÜLROTH et al., 2013).

Em leveduras, o primeiro estágio da produção lipídica é a síntese de acetil co-A e NADPH, depois ocorre a biossíntese das cadeias graxas de acil, e estas por sua vez são convertidas em frações de lipídios polares ou neutros. Em seguida, essas frações se unem e formam as partículas de lipídios (GARAY; BOUNDY-MILLS; GERMAN, 2014).

É de fundamental importância para o desenvolvimento de processos de produção de SCO (*“single cell oil”*), ter conhecimento de como ocorre a síntese de ácidos graxos em micro-organismos e como eles são capazes de acumular tanto óleo, já que em alguns micro-organismos o teor de lipídios pode exceder 70% de sua biomassa. Dessa forma, pode-se identificar os genes que ativam as enzimas chaves que contribuem para o processo de produção e acúmulo de lipídios, podendo assim aumentar os níveis de produção, principalmente de ácidos graxos poliinsaturados (RATLEDGE, 2004).

3.5.3 Fatores que exercem influência no acúmulo de lipídios por leveduras

Em um processo de produção de lipídios microbianos deve-se selecionar a melhor linhagem e o melhor e menos oneroso substrato a ser utilizado no cultivo, entretanto a eficiência do processo é de extrema importância. Ami et al. (2014) destacam que é fundamental a realização de um monitoramento do micro-organismo e também do substrato utilizado no processo fermentativo, para que se possa manter a produtividade constante, seja em cultivos testes ou em ampliação de escala, já que estes podem ser afetados por diversos fatores.

Durante a fermentação, quando ocorre excesso de carbono, na forma de glicose, em relação a algum nutriente, geralmente sobre o teor de nitrogênio, inicia-se o acúmulo de lipídios nos micro-organismos, já que este excesso de carbono é convertido em triacilgliceróis. À medida que se limita a fonte de nitrogênio no meio, a multiplicação celular é impedida e os lipídios formados são armazenados intracelularmente (MENG et al., 2009).

A origem da fonte de nitrogênio também interfere na produção de lipídios durante a fermentação, sendo que fontes orgânicas ou inorgânicas são usadas com diferentes influências sobre o acúmulo de lipídios nas células (LIU, YANG; SHI, 2000). O nitrogênio proveniente de fontes inorgânicas é bom para o crescimento celular, porém não é adequado para a

produção de lipídios. Por outro lado o nitrogênio orgânico, presente em peptona, é eficiente para o acúmulo de óleos, porém pouco eficazes para o desenvolvimento da biomassa celular (HUANG et al., 1998).

Efeitos da fonte de nitrogênio sobre a produção de biomassa e acúmulo de lipídios foram constatados em um estudo para otimização utilizando o glicerol bruto sobre as espécies *T. spathulata* e *K. ohmeri*. Entre as fontes de nitrogênio testadas para *T. spathulata* em uma mistura de extrato de levedura e peptona (1:1) obteve-se a máxima biomassa e produção lipídica (KITCHA; CHEIRSILP, 2011).

Yen; Yang; Yu (2012) relatam que a fonte de nitrogênio empregada durante a fermentação pode influenciar o acúmulo de lipídios. Quando *Rhodotorula glutinis* foi cultivada tendo como substrato uma mistura de glicerol e resíduo de cervejaria, houve um aumento de 27% em relação à biomassa produzida, quando se utilizou apenas o glicerol.

Quando óleos descartados por serviços de *fast food*, utilizados para fritura de carne, peixes e frango, foram usados como substrato para a produção de lipídios utilizando-se a levedura *Yarrowia lipolytica*, obteve-se o maior acúmulo de lipídios. Constatou-se também que a adição de glicose ao meio provocou uma variação no perfil de ácidos graxos dos lipídios produzidos (BIALY; GOMAA; AZAB, 2011).

Segundo Liu; Li; Du (2008), as condições de cultura, tais como a razão carbono/nitrogênio, temperatura, pH, oxigênio e concentração de minerais no meio, influenciam no acúmulo de lipídios nos micro-organismos. De modo geral, quando se aumenta a quantidade de nitrogênio no meio, reduz-se a quantidade de óleos nas células. Mainul et al. (1996) relataram que quando a razão carbono/nitrogenio aumentou de 25 para 70 o teor de óleo aumentou de 18 para 46%.

Taccari et al. (2012) realizaram um *screening* do crescimento de leveduras em glicerol bruto. Nesse estudo a fonte de carbono utilizada também não teve grande influência no crescimento das leveduras e das 45 cepas testadas em glicerol bruto e glicose como fontes de carbono, 13 produziram quantidades equivalentes de biomassa, 10 apresentaram maior produção de biomassa em glicerol, 16 cresceram melhor em glicose como fonte de carbono e 6 não cresceram.

Os minerais também exercem influencia na produção lipídica microbiana. Magnésio, ferro, potássio e cálcio são indispensáveis para a produção da biomassa e acúmulo de lipídios e quando presentes em baixas concentrações podem interferir no acúmulo de óleo de diferentes formas. Spier (2014) verificou que a concentração de sulfato de magnésio utilizado no processo fermentativo teve um efeito significativo positivo para a biomassa máxima,

produtividade de biomassa, teor de lipídios, lipídios totais e produtividade de lipídios, sendo a única variável que apresentou efeito significativo para a produtividade lipídica. Junto com a concentração de extrato de levedura, foram as variáveis que mais interferiram no processo fermentativo.

Por outro lado, Castanha et al. (2013) não detectaram nenhuma influência na produção de lipídios e biomassa com a suplementação do substrato utilizado (soro de leite) usando $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Entretanto, a concentração de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ interferiu diretamente na produção de lipídios totais utilizando a levedura *Cryptococcus laurentii* 11. A suplementação do meio com alguns metais como o Zn^{2+} , entre outros, pode elevar a biomassa produzida e o teor lipídico, porém altas concentrações de metais pesados pode provocar inibição do crescimento e modificação do pH (LI et al., 2006).

O mecanismo de acúmulo de lipídios em micro-organismos pode ocorrer de duas formas distintas: uma delas envolve a produção de precursores de ácidos graxos em condições definidas, como o acetil e malonil coenzima-A. A outra via envolve a captação de ácidos graxos, óleos e triacilgliceróis do meio de cultura e sua acumulação de forma modificada no interior das células. Esta via requer a hidrólise do substrato hidrofóbico, o transporte dos ácidos graxos lançados dentro das células e sua remontagem em triacilgliceróis e metil ésteres (BEOPOULOS et al., 2009).

A temperatura é um fator importante na produção de lipídios por micro-organismos. A temperatura ideal para o crescimento de leveduras é variável, depende da linhagem, e a maioria cresce bem em torno de 25 °C. Temperaturas muito elevadas ou muito baixas interferem no crescimento e na produção de lipídios. O ajuste na temperatura pode modificar o perfil lipídico alterando o grau de saturação dos lipídios produzidos, uma vez que o grau de saturação geralmente diminui com a redução da temperatura (BEOPOULOS et al., 2009).

O pH é uma variável que deve ser considerada já que está diretamente relacionado à atividade enzimática e ao metabolismo dos micro-organismos. O pH ácido é adverso para o crescimento do micro-organismo e o acúmulo de lipídios. Quando se trabalha com leveduras oleaginosas deve-se verificar o pH inicial e final e realizar o acompanhamento das possíveis variações ao longo do cultivo. Geralmente o pH inicial deve ser ajustado entre 5 e 6 para uma maior produção lipídica (KARATAY; DÖNMEZ, 2010).

A aeração também pode influenciar tanto no acúmulo como no perfil dos lipídios produzidos. Quando se limita a disponibilidade de oxigênio predomina a produção de ácidos graxos saturados; já em condições de aeração eleva-se a produção de ácidos graxos insaturados (VALERO; MILLIAN; ORTEGA, 2001).

Liu et al. (2012) utilizaram a levedura *Lipomyces starkeyi* para a produção de lipídios a partir de resíduos líquidos de glutamato monossódico. Foi verificada a influência da concentração de glicose, pH e tempo de cultivo sobre a biomassa e os lipídios produzidos. Os resultados mostraram que as melhores condições de fermentação foram concentração de glicose de 80 g.L⁻¹ e pH inicial de 5,0 durante 96 h.

3.6 ESTADO DA ARTE (PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE LIPÍDIOS)

Diversos substratos, a maioria destes subprodutos ou substâncias que normalmente seriam descartados, são utilizados para a produção de lipídios microbianos.

Lian et al. (2012) utilizaram ácidos carboxílicos obtidos a partir da pirólise de fases aquosas para produção de lipídios. Foram testadas as capacidades de fermentar do acetato formando hidroxí acetaldeído, fenol e acetol de três leveduras oleaginosas: *Cryptococcus curvatus*, *Rhodotorula glutinis* e *Lipomyces starkeyi*. Os resultados mostraram que o acetol poderia ligeiramente apoiar o crescimento levedura, mas inibir o acúmulo de lipídios. Assim como o acetol, hidroxíacetaldeído e fenóis mostraram um elevado crescimento de levedura, mas uma inibição ao mulo de lipídios.

Lian; Garcia-Perez; Chen (2013) produziram lipídios a partir da fermentação de levoglucosanos não hidrolisados (LG) por leveduras oleaginosas. Foram usadas as leveduras *Rhodospiridium toruloides* e *Rhodotorula glutinis*. Testes de atividade enzimática da LG cinases de ambas as leveduras foram realizados. As produções máximas de biomassa (6,8 g.L⁻¹) e de lipídios (2,7 g.L⁻¹) foram obtidas pela levedura *Rhodotorula glutinis* tendo como substrato o LG puro.

Karatay; Dönmez (2010) realizaram melhorias no processo de produção de lipídios usando melaço, onde se verificou o efeito de algumas variáveis como o sulfato de amônio e a concentração do melaço na produção de lipídios utilizando as leveduras *Candida lipolytica*, *Candida tropicalis* e *Rhodotorula mucilaginosa*. Wang et al. (2012) cultivaram a levedura oleaginosa *Rhodospiridium toruloides* 21167 para a produção de lipídios a partir do hidrolisado do amido de mandioca. Nesse estudo, os autores avaliaram a influência da concentração do hidrolisado do amido de mandioca na produção de lipídios e no crescimento da biomassa da levedura. Os resultados mostraram que o teor máximo de lipídios (66% m/m) foi obtido quando a concentração do hidrolisado de amido de mandioca era equivalente a 8,0%.

Alguns resíduos ricos em compostos orgânicos também são utilizados para a síntese lipídica. Bialy; Gomaa; Azab (2011) produziram lipídios usando a levedura *Yarrowia lipolytica* e resíduos de óleos usados para fritura em lanchonetes como substrato. Foram determinados e comparados os perfis dos ácidos graxos produzidos pelos diferentes substratos. Observou-se uma variação na produção de lipídios por parte das leveduras utilizadas, independentemente da fonte de isolamento.

Hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar foi utilizado por Tsigie et al. (2011) como fonte de carbono para a produção de lipídios através da levedura *Yarrowia lipolytica*. Foram utilizados meios à base de glicose e xilose, entretanto o crescimento máximo da levedura foi conseguido utilizando-se o meio a base do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar.

Vinhaça e melaço de cana-de-açúcar foram utilizados para a síntese de biomassa proteica e lipídica por leveduras e bactérias por Cazetta; Antonia; Colabone (2005). Foram utilizadas as leveduras *Candida lipolytica*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* e a bactéria *Corynebacterium glutamicum*. Utilizando-se a vinhaça bruta como meio de cultivo, a maior produção de biomassa ($7,05 \text{ g.L}^{-1}$) foi obtida pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa*. No melaço, *C. lipolytica* foi a levedura que apresentou maior produção de biomassa, $6,28 \text{ g.L}^{-1}$, seguida pela *S. cerevisiae* com $5,46 \text{ g.L}^{-1}$. A bactéria *C. glutamicum* atingiu $2,79 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa e a levedura *R. mucilaginosa* produziu apenas $1,62 \text{ g.L}^{-1}$. em ambos os meios, *C. lipolytica* produziu maior quantidade de lipídios, 21,16% na vinhaça e 25,59% no melaço, seguida por *R. mucilaginosa*, 18,38% na vinhaça e 18,80% no melaço, após 48 h de cultivo.

Xue et al. (2008) produziram lipídios utilizando a levedura *Rhodotorula glutinis* e águas residuais de glutamato monossódico como meio de cultura. Nesse estudo os autores verificaram a influência da adição de glicose no meio sobre a biomassa e os lipídios produzidos. Três estratégias diferentes foram testadas incluindo a adição inicial de glicose, adição na alimentação em batelada, e adição na realimentação. Os resultados mostraram que a glicose mostrou-se favorável não só para o crescimento celular, mas também para a síntese de lipídios. Entre os três métodos testados, a adição de glicose durante a realimentação mostrou-se mais eficaz, conseguindo-se produzir 25 g.L^{-1} de biomassa e 20% em lipídios.

Schneider et al. (2013) estudaram a produção de lipídios e carotenoides em resíduos de cervejaria pela levedura oleaginosa *R. glutinis*, onde foram utilizados o efluente bruto, o resíduo suplementado com glicose e um meio sintético para as fermentações. Os cultivos com o efluente bruto e suplementado com glicose resultaram em produções de lipídios mais elevadas. No perfil de ácidos graxos predominaram o palmítico, esteárico, oleico, linoleico e

linolênico, correspondendo mais de 90% dos ácidos graxos totais. Além disso, constatou-se uma redução dos ácidos graxos saturados ao mesmo tempo em que a concentração dos poli-insaturados aumentava.

Glicerol bruto como fonte de carbono e vinhaça fina como fonte de nitrogênio foram os substratos utilizados por Yen; Yang; Yu (2012) para cultivar *R. glutinis* visando à produção de lipídios. A mistura de glicerol e vinhaça fina proporcionou um aumento de 27% na produção de lipídios, quando comparada ao meio contendo apenas glicerol bruto. O uso do glicerol substituindo a glicose como fonte de carbono resultou em um aumento da quantidade de ácido linolênico (C18:2), passando a corresponder mais de 20% dos lipídios totais. Uma mistura de glicerol e vinhaça fina para a produção de óleo destinada à síntese de biodiesel poderia viabilizar significativamente a fabricação do combustível a partir de lipídios microbianos.

Águas residuais provenientes da produção de butanol, sem quaisquer tratamentos e sem a adição de nutrientes, foram usadas por Peng et al. (2013) como meio de cultura para produção de lipídios através da levedura *Trichosporon dermatis*. Análises químicas realizadas no substrato detectaram a presença de ácido acético, ácido butírico e açúcares como xilose e arabinose. A produção máxima de biomassa e de lipídios foram respectivamente 7,4 g.L⁻¹ e 13,5%. O perfil de ácidos graxos mostrou-se semelhante ao de óleos de palma com predominância de ácido palmítico, esteárico, oleico e linoleico.

Huang et al. (2009) produziram óleos microbianos utilizando hidrolisado da palha do arroz e a levedura *Trichosporon fermentans*. Conseguiu-se produzir uma biomassa máxima de 28 g.L⁻¹ e um teor de lipídios totais equivalente a 40,1%, valor este equivalente a 11,5 g.L⁻¹.

Yu et al. (2011) utilizaram um hidrolisado da palha de trigo pré-tratado com ácido sulfúrico diluído. Foram testadas cinco cepas de leveduras oleaginosas: *Cryptococcus curvatus*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodosporidium toruloides*, *Lipomyces starkeyi* e *Yarrowia lipolytica*, sendo que a levedura *C. curvatus* produziu as maiores quantidades de lipídios tanto no meio destoxificado, quanto no não-destoxificado, 4,2 e 5,8 g.L⁻¹ respectivamente.

O fungo *Mortierella isabellina* foi usado para a produção de lipídios a partir do soro de leite tratado com lactase por Demir et al. (2013). Soluções de soro em pó foram preparadas com diferentes concentrações iniciais de lactose (4,5%, 8,0%, 12,0%, e 16,0%). Os compostos proteicos foram precipitados através de um tratamento térmico a 115° C durante 10 min numa autoclave, sendo removidos logo em seguida por centrifugação. A concentração máxima de óleo microbiano (17,13 g.L⁻¹) e a taxa de produção de óleo microbiano (4,60 g.L⁻¹.d⁻¹) foram obtidas a partir da amostra com 16% de lactose. A biomassa do soro tratado com lactase

(26,55 g.L⁻¹) era quase duas vezes mais elevado do que no meio contendo 12% de lactose, sem tratamento enzimático (11,48 g.L⁻¹).

Chen et al. (2013) avaliaram o efeito da composição do meio de cultivo e as condições de fermentação para a produção de lipídios microbianos pela levedura *Trichosporon cutaneum* usando sabugo de milho hidrolisado. A adição de minerais como MgSO₄.7H₂O, CuSO₄.5H₂O, MnSO₄.H₂O e de KCl, estimularam a produção de lipídios. A concentração do inóculo, temperatura e pH inicial também influenciaram no acúmulo de lipídios, sendo fixados em 5%, 28 °C e 6,0, respectivamente, como valores ideais. A fermentação foi realizada sob as melhores condições e a biomassa máxima (22,9 g.L⁻¹) teve um leve aumento, apenas 3,6%, já o teor de lipídios (45,4%) aumentou 26,5% comparado às condições iniciais.

Através da hidrólise de alguns resíduos podem-se obter substratos com elevados teores de açúcares fermentáveis tornando-se interessantes para o cultivo de leveduras oleaginosas. Huang et al. (2013) utilizaram sabugo de milho hidrolisado para a produção de lipídios pela levedura oleaginosa *Trichosporon coremiiforme*. Considerando-se a biomassa, o maior rendimento de lipídios do *T. coremiiforme*, correspondente a 7,7 g.L⁻¹, foi obtido no oitavo dia de cultivo, tempo este que o coeficiente de lipídios era igual a 17,2. Curiosamente após o nono dia, um claro declínio no teor de lipídios foi observado, isto possivelmente ocorreu devido ao uso do lipídio acumulado para a proliferação celular por parte da levedura.

Huang et al. (2012) cultivaram a levedura oleaginosa *Trichosporon fermentans* em bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado por ácido sulfúrico para o acúmulo de lipídios. Para a otimização do processo de produção, utilizou-se o delineamento de Box-Behnken com uma metodologia da superfície de resposta contendo quatro variáveis e três níveis, onde se avaliou os efeitos da relação C/N, concentração do inóculo, pH inicial e tempo de fermentação no crescimento celular e acúmulo de lipídios. As condições ótimas para o cultivo encontradas foram as seguintes: 165 para a relação C/N, 11% de concentração do inóculo, pH inicial de 7,6 e o tempo de fermentação de nove dias. Realizando-se a fermentação em condições ótimas, a concentração de lipídios teve um aumento de 32,8% comparado às condições iniciais de cultivo.

Huang et al. (2014) investigaram a cinética de fermentação do hidrolisado da palha de arroz e a influência dos inibidores presentes no meio. Foram realizados dois cultivos utilizando a levedura *T. fermentans*. O primeiro serviu como cultivo padrão e o outro foi realizado para avaliar os efeitos dos inibidores presentes no substrato sobre o crescimento celular e acúmulo de lipídios. O tempo de fermentação, a biomassa máxima, e o teor de lipídios foram 10,5 dias, 28,6 g.L⁻¹ e 43,9%, respectivamente, enquanto que no cultivo

padrão, esses valores foram equivalentes a 8,5 dias, 27 g.L⁻¹ e 65%, indicando que os inibidores presentes no hidrolisado da palha do arroz exerceram influência, principalmente sobre o teor de lipídios acumulado.

O uso das águas residuais do processamento de batata para a produção de lipídios pelo fungo *Aspergillus oryzae* foi estudado por Muniraj et al. (2013). Análises físicas e químicas detectaram concentrações elevadas de sólidos, amido e nutrientes no resíduo, que após a esterilização, resultou em um meio gelatinizado, dificultando o crescimento do fungo. Dessa forma, foram feitas três diluições no meio para que se atingisse 25%, 50% e 75% de concentração antes da fermentação. Os resultados mostraram que as diluições favoreceram a produção de lipídios e a concentração correspondente a 25% de meio foi considerada ótima, obtendo-se uma concentração máxima de 3,5 g.L⁻¹ de lipídios totais.

4 METODOLOGIA

4.1 MANIPUEIRA

A manipueira utilizada foi gentilmente cedida por uma microindústria processadora de mandioca brava, da cidade de Sobrado no Estado da Paraíba (Latitude: 07° 08' 43" S e Longitude: 35° 14' 11"), Brasil, sendo armazenada a -18° C logo após a coleta.

4.1.1 Tratamento da manipueira

Primeiramente, foi realizado um tratamento térmico na manipueira a 85 °C durante 20 min para eliminação dos glicosídeos cianogênicos presentes, em seguida a manipueira foi resfriada. Para a remoção do excesso de sólidos e consequente clarificação, foi centrifugada (centrífuga refrigerada RB7) a 3200 rpm durante 10 min. Em seguida, o precipitado foi removido e o sobrenadante foi utilizado para o processo fermentativo.

4.1.2 Análises físico-químicas do substrato

4.1.2.1 Açúcares redutores e totais

Para a determinação dos açúcares redutores utilizou-se uma modificação do método do DNS, originalmente proposto por Miller (1959).

Preparo das soluções utilizadas:

100 mL de NaOH 2 mol.L⁻¹: Em Becker de 250 mL foram pesados 8 g de NaOH PA e dissolvidos com 50 mL de água destilada em banho com água fria. A solução foi transferida para balão volumétrico de 100 mL e aferida com água destilada.

500 mL de DNS: Foram pesados 5g de DNS (ácido 3,5 – dinitro-salicílico) e adicionados 100 mL de NaOH 2 mol.L⁻¹, em Becker de 250 mL. Em um Bécker de 500 mL foram pesados 150 g de tartarato duplo de sódio e potássio e dissolvidos em 250 mL de água destilada. A solução foi levada para aquecimento até dissolver completamente e a ela foi adicionado a solução de DNS sob aquecimento até dissolver completamente. Deixou-se esfriar, e aferiu-se em balão de 500 mL com água destilada. A solução foi armazenada em frasco escuro sob condições mínimas de luz.

Curva padrão: Na construção da curva padrão foram pesados 100 mg (0,1 g) de glicose e dissolvidos em 100 mL de água destilada em balão volumétrico. Após agitação vigorosa para homogeneizar, transferiu-se 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 mL da solução-mãe para

tubos de ensaio e o volume foi completado para 10 mL com água destilada. Os tubos foram homogeneizados e de cada tubo transferiu-se 1 mL para tubos com 1 mL de DNS (em duplicata). Os tubos foram aquecidos a 100 °C por 5 min, tendo-se o cuidado de não colocar os tubos antes de aquecimento vigoroso do banho e então resfriados em banho com água à temperatura ambiente por 3 min.

A cada tubo foram adicionados 8 mL de água destilada, e após homogeneizado, a absorvância foi lida a 540 nm. Com os valores de absorvância, foi construída a curva de absorvância versus concentração.

Análise das amostras: Inicialmente foi determinada a quantidade inicial de amostra que resultasse em leitura dentro da faixa da curva padrão. As diluições necessárias foram usadas no cálculo para determinação do teor de açúcar da amostra desconhecida. Depois de dissolver determinada quantidade de amostra em um volume definido de água, transferiu-se 1 mL para tubos de ensaio contendo 1 mL de solução DNS. A seguir, os tubos foram levados para banho de água fervente por exatos 5 min. Após este intervalo, os tubos foram retirados do banho de água quente e colocados em banho de água fria por 3 min, até completo resfriamento. Em cada tubo foi adicionado 8 mL de água destilada e feita a leitura imediatamente a 540 nm. A curva padrão foi usada para transformar a leitura de absorvância em miligramas de açúcares redutores por mililitro de solução. Efetuaram-se os cálculos para expressar os resultados em gramas de açúcares redutores por litro de amostra inicial. Quando a amostra tem sacarose é necessário fazer a inversão da sacarose, para análise dos açúcares totais. Para tal, foram misturados 1 mL da amostra com 1 mL de solução de ácido clorídrico 2 mol.L⁻¹ (16,8 mL de ácido concentrado por 100 mL), em seguida os tubos foram colocados em banho com água fervente por 5 min e resfriados em banho de água gelada. Depois de esfriar foram adicionados 2 mL de hidróxido de sódio 2 mol.L⁻¹. Homogeneizou-se bem e seguiu-se o procedimento idêntico à determinação de açúcares redutores a partir do item 5 da curva padrão. Neste caso multiplicou-se o resultado por 4 (diluição) para obter o valor de açúcares redutores totais (g.L⁻¹).

4.1.2.2 Determinação de umidade

Para quantificação do percentual de umidade foi utilizado o método de secagem em estufa comum (AOAC, 2000). Foram pesados 5 g da manipueira totalmente líquida, bem homogeneizada, em cápsulas de alumínio codificadas, previamente secas e taradas, anotando-se a massa das cápsulas e da amostra, e logo em seguida as cápsulas foram levadas para a estufa a 105 °C. Após 24 h, as cápsulas foram retiradas da estufa e colocadas em dessecador

durante 20 min para esfriar, em seguida pesadas e anotou-se a massa final para efetuar-se os cálculos. A análise foi realizada em triplicata.

4.1.2.3 Determinação de cinzas

Cadinhos de porcelana vazios foram colocados em mufla e deixados a 550°C, durante 15 min, em seguida foram deixados em dessecador até atingir a temperatura ambiente, foram pesados vazios e com 5 g da amostra, anotando-se ambas as leituras. Logo após a pesagem, os cadinhos foram levados à mufla durante aproximadamente 6 h, a 550°C, ou até o clareamento da cinza. Logo após os cadinhos foram retirados da mufla e colocados diretamente no dessecador para que atingissem a temperatura ambiente, novamente pesados, anotando-se as leituras finais para efetivação do percentual de cinzas na amostra. A análise foi realizada em triplicata. (AOAC 2000).

4.1.2.4 Determinação de proteínas

Foram pesados aproximadamente 0,5 g da amostra líquida em um tubo de ensaio, adicionaram-se duas pitadas (aproximadamente 2 g) da mistura catalítica para acelerar o processo de digestão. Os tubos foram levados ao digestor de Kjeldahl por cerca de 3,5 h, aumentando-se 50 °C a cada 30 min e, ao se atingir a temperatura de 350 °C, deixando-os no digestor por mais 1 h ou quando a amostra apresentasse uma coloração esverdeada transparente, desligando-se o digestor de Kjeldahl. Esperou-se a temperatura baixar e os tubos foram retirados do digestor e levados para o destilador de Kjeldahl. Acrescentou-se aos tubos três gotas da solução de fenolftaleína lavando as paredes dos tubos com água destilada. Em seguida, os tubos foram encaixados no destilador e, ainda com o aquecimento desligado, adicionou-se o hidróxido de sódio concentrado aos poucos até o ponto de viragem. Logo após, acionou-se a temperatura e a amônia volatilizada e condensada foi captada por um frasco Erlenmeyer contendo ácido bórico, formando então o borato de amônia. Este, por sua vez, foi titulado com uma solução de ácido clorídrico padronizado, anotou-se o volume gasto na titulação e efetuaram-se os cálculos. A análise foi realizada em triplicata.

Devido à inexistência de um fator específico para a manipueira, para se converter o nitrogênio total em proteico, foi utilizado o fator de conversão universal, equivalente a 6,25.

4.1.2.5 pH

Foi determinado em pHmetro digital, provido de um eletrodo de vidro, calibrado com solução tampão pH 7,0 e 4,0, seguindo os parâmetros descritos pelo método no 947.05 da AOAC (2000).

4.1.2.6 Determinação de acidez total titulável

A determinação de acidez total foi realizada de acordo com a metodologia da AOAC, (2000). Uma alíquota de 10 mL da amostra, bem homogeneizada, foi transferida para um frasco Erlenmeyer, adicionou-se duas gotas de fenolftaleína, titulando-se logo em seguida com hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ até o ponto de viragem (coloração rosa). Anotou-se o volume gasto e a acidez total foi expressa em $\text{meq NaOH.100 mL}^{-1}$.

4.1.2.7 Determinação de sólidos solúveis totais (°Brix)

A concentração de sólidos solúveis totais foi medida em °Brix. Adicionou-se 1 mL da amostra a 9 mL de água destilada e, após homogeneização, foi realizada a leitura em refratômetro. O resultado foi multiplicado por dez, devido à diluição, a fim de determinar o teor de sólidos solúveis do resíduo (AOAC 2000).

4.2 MICRO-ORGANISMO

Foi utilizada a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688, fornecida pela Fundação André Tosello, Coleção de Culturas Tropicais, São Paulo. A levedura *R. mucilaginosa* foi adquirida na forma ativada. Para crescimento e manutenção as colônias foram incubadas em placas de Petri com meio YMA (Yeast Malt Agar) cuja composição encontra-se na Tabela 1.

As placas foram incubadas na estufa a 30 °C durante 5 dias. Para a manutenção, as leveduras foram colocadas nas placas em refrigerador à temperatura de 4 °C. Nas Figuras 4 e 5 tem-se as ilustrações da levedura *R. mucilaginosa* reativada e em placa de Petri.

Figura 4 - Levedura *Rhodotorula mucilaginosa* reativada



Fonte: Autor

Figura 5 - Levedura *Rhodotorula mucilaginosa* em placa de Petri



Fonte: Autor

Tabela 11 - Composição do meio YMA (*Yeast Malt Agar*)

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
Dextrose	10,0
Extrato de levedura	3,0
Extrato de malte	3,0
Bacto peptona	5,0
Agar	20,0

4.3 CULTIVO EM MEIO SINTÉTICO

Para que se tivesse uma ideia do crescimento da levedura, um cultivo utilizando-se o meio sintético foi realizado. Células de *R. mucilaginosa* foram diluídas em água destilada estéril e inoculadas em frascos Erlenmeyer de 1000 mL, contendo 400 mL do meio sintético. Na Tabela 2 tem-se a composição do meio utilizado de acordo com Frengova et al. (1994). O inóculo foi mantido em incubadora tipo “Shaker” (Logen – LS4900 – THZ), a 30° C e 200 rpm. Durante o período de incubação, alíquotas foram removidas periodicamente durante os intervalos de tempo de 0, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 h para determinar o crescimento da

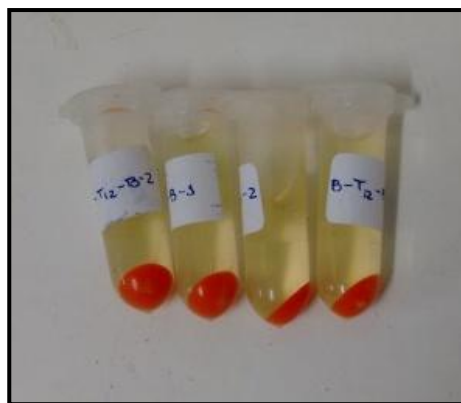
levedura (biomassa). As Figuras 6 e 7 ilustram o cultivo em meio sintético, após 120 h do inóculo e a biomassa de *R. mucilaginosa* centrifugada ainda com o sobrenadante.

Figura 6 - Cultivo em meio sintético após 120 h do inóculo



Fonte: Autor

Figura 7 – Biomassa da levedura *R. mucilaginosa* após a centrifugação



Fonte: Autor

Na Tabela 6 tem-se a composição do meio sintético utilizado para o crescimento da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* para a produção de lipídios.

Tabela 12 - Componentes do meio de cultivo sintético para crescimento da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* (Frengova et al, 1994).

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
Glicose	40,0
KH ₂ PO ₄	8,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
Extrato de levedura	3,0

4.4 PREPARO DO INÓCULO

Adicionou-se 5 mL de água destilada estéril a uma placa de Petri contendo a levedura *R. mucilaginosa*, raspando-se as células até formar uma suspensão. Os 5 mL foram transferidos para um frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL do meio utilizado para o cultivo sintético (Tabela 1). Após o inóculo, o frasco Erlenmeyer foi levado para a incubadora tipo “Shaker” a 30° C e 200 rpm. Após 24 h, o meio foi centrifugado cuidadosamente, com o tubo bem fechado, sob-refrigeração e o sobrenadante descartado, adicionou-se 50 mL de água

destilada estéril, em câmara de fluxo laminar, e a concentração celular foi determinada em câmara de Neubauer para cálculo do volume de inóculo correspondente a 1×10^7 células. mL^{-1} .

4.5 CONDIÇÕES DE CULTURA

Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 1000 mL, contendo 400 mL do meio de cultura, colocados em agitador rotativo tipo “shaker” e incubados durante 5 dias. Durante o período de incubação, alíquotas foram removidas periodicamente para determinar o crescimento da levedura (biomassa) e a produção de lipídios.

Através da realização de ensaios prévios decidiu-se a concentração de manipueira a ser utilizada nos experimentos (20, 50, 75 e 100% v/v).

4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.6.1 Biomassa

Alíquotas de 1 mL da amostra foram diluídas em água destilada e lidas em espectrofotômetro (Biospectro SP 220) ao comprimento de onda de 600 nm. Converteu-se o valor da absorvância em concentração através de uma curva padrão de biomassa (Apêndice A I).

4.6.2 Lipídios

O teor de lipídios foi determinado através do método de Bligh; Dyer (1959), adaptado por Manirakiza, Covaci e Schepens (2001). Primeiramente a biomassa seca foi tratada com uma solução de HCl 2 mol.L^{-1} para rompimento da parede celular. Para auxiliar na quebra, agitou-se a mistura em vortex por 2 min com posterior centrifugação a 3600 rpm por 10 min. Formaram-se três fases, onde os lipídios encontravam-se na fase inferior dissolvidos em clorofórmio, que foi evaporado e os lipídios quantificados por gravimetria, em massa seca e expressos em percentual de biomassa seca e em gramas por litro de substratos (g.L^{-1}).

REFERÊNCIAS

- AMARETTI, A.; RAIMONDI, S.; SALA, M.; RONCAGLIA, L.; LUCIA, M.; LEONARDI, A.; ROSSI, M. Single cell oils of the cold-adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785. **Microbial Cell Factories**, v. 9, p. 73-78, 2010.
- AMI, D.; POSTERI, R.; MEREGHETTI, P.; PORRO, D.; BRANDUARD, S. M. D. P. Fourier transform infrared spectroscopy as a method to study lipid accumulation in oleaginous yeasts. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 1-14, 2014.
- ANGENENT, L.T.; KARIM, K.; AL-DAHMAN, M.H.; WRENN, B.A.; DOMINGUEZ, E. R. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. **Trends in Biotechnology**, v. 22, p.477–485, 2004.
- ANGERBAUER, C.; SIEBENHOFER, M.; MITTELBACH, M.; GUEBITZ, G. M. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 99, p.3051–3056, 2008.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. Washington D.C.: AOAC, 1018 p, 2000.
- ATHENSTAEDT, K.; DAUM, G. The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, p. 1355–1369, 2006.
- AVANCINI, S.R.P.; FACCIN, G.L.; VIEIRA, M.A.; ROVARIS A.A.; PODESTA, R.; BARRIQUELLO, A.L.; VALDUGA, E. Avaliação de componentes nutricionais de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* crantz). **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n.1, p. 107-111, 2007.
- BAI, J.; YAO, H.; LIN, M.; ZHANG, L.; DING, H.; LEI, F.; WU, X.; LI, X.; GUO, J.; QIN, Z. Biosorption of uranium by chemically modified *Rhodotorula glutinis*. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 101, p. 969–973, 2010.
- BEOPOULOS, A.; CESCUT, J.; HADDOUCHE, R.; URIBELARREA, J.; MOLINA-JOUVE, C.; NICAUD, J. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in Lipid Research**, v. 91, p. 692–696, 2009.
- BEOPOULOS, A.; NICAUD, J. M.; GAILLARDIN, C. An overview of lipid metabolism in yeast and its impact on biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 1193-1203, 2011.
- BHOSALE, P.; BERNSTEIN, P. S. Carotene production by *Flavobacterium multivorum* in the presence of inorganic salts and urea. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p.565-571, 2004.
- BIALY, H. E.; GOMAA, O.M.; AZAB, K.S. Conversion of oil waste to valuable fatty acids using oleaginous yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 2791-2798, 2011.

BLAGBROUGH, I. S.; BAYOUMI, S. A. L.; ROWAN, M. G.; BEECHING, J. R. Cassava: an appraisal of its phytochemistry and its biotechnological prospects. **Phytochemistry**, v. 71, n. 17-18, p. 1940–1951, 2010.

BLIGH, E.G.; DYER, J. W. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911–917, 1959.

BORGHETTI, I. A. **Avaliação do crescimento da microalga *Chlorella minutíssima* em meio de cultura com diferentes concentrações de manipueira**. 2009, 103 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

BOUIS, H.E. Micronutrient fortification of plants through plant breeding: can it improve nutrition in man at low cost? **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 62, p. 403–411, 2003.

BOUIS, H.E. The potential of genetically modified food crops to improve human nutrition in developing countries. **Journal of Development Studies**, v.43, p.79–96, 2007.

BRASIL. Estudo de Mercado sobre a mandioca (farinha e fécula), estudos de Mercado ESPM/SEBRAE, 2008 relatório completo, disponível em: <<http://atividaderural.com.br/artigos/5602f3e181880.pdf>>, acesso em julho de 2015.

BRASIL. IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola - Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil**, Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Fasciculo/2012/lspa_201202.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/2012/lspa_201202.pdf)> acesso em outubro de 2015.

BRASIL. IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola, pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil**, Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_%5Bmensal%5D/Fasciculo/2015/lspa_201505.pdf> acesso em setembro de 2015.

BUCHHOLZ, K.; BORNSCHEUER, U. T., Highlights in biocatalysis – historical landmarks and current trends. **Engineering in Life Sciences**, v. 5, p. 309–323, 2005.

BUTOLO, J.E. Utilização de ingredientes líquidos na alimentação animal. In: Simpósio sobre ingredientes na alimentação animal. Campinas-SP. **Anais Campinas-SP: CBNA**, p.295-305, 2001.

CAPPELLETTI, B. M.; REGINATTO, V.; AMANTE, E. R.; ANTÔNIO, R. V. Fermentative production of hydrogen from cassava processing wastewater by *Clostridium acetobutylicum*. **Renewable Energy**, v. 36, n. 12, p. 3367–3372, dez. 2011.

CARDOSO, C. E. L. **Competitividade e inovação tecnológica na cadeia agroindustrial de fécula de mandioca no Brasil**. 188 f. Tese (Doutorado)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP, 2003.

CASTANHA, R. F.; MORAIS, L. A. S.; MARIANO, A. P.; MONTEIRO, R. T. R. Comparison of two lipid extraction methods produced by yeast in cheese whey. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, p. 629-636, 2013.

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

CENI, G. C.; COLET, R.; PERUZZOLO, M.; WITSCHINSKI, F.; TOMICKI, L.; FEDERICI, F.; FAVA, F.; KALOGERAKIS, N.; MANTZAVINOS, D. Valorisation of agro-industrial by-products, effluents and waste: concept, opportunities and the case of olive mill wastewaters **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, p. 895–900, 2009.

CERTIK, M.; SHIMIZU, S. Biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. **Biochimie**, v. 87, p. 1–14, 1999.

CHAPMAN, K. D.; DYER, J. M.; MULLEN, R. T. Biogenesis and functions of lipid droplets in plants. Thematic review series: Lipid droplet synthesis and metabolism: from yeast to man. **The Journal of Lipid Research**, v. 53, p. 215–226, 2012.

CHEN, X.-F.; HUANG, C.; YANG, X.-Y.; XIONG, L.; CHEN, X.-D.; MA, L.-L. Evaluating the effect of medium composition and fermentation condition on the microbial oil production by *Trichosporon cutaneum* on corncob acid hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 18–24, 2013.

COLIN, X.; FARINET, J.L.; ROJAS, O.; ALAZARD, D. Anaerobic treatment of cassava starch extraction wastewater using a horizontal flow filter with bamboo as support. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1602–1607, 2007.

CUNHA, M. A. P. **Mandioca e fruticultura**. Disponível em: <<http://www.camara.gov.br/internet/comissao/index/perm/capr/embrapamario.pdf>>. Acesso em: 30 de outubro de 2014.

CUTZU, R.; COI, A.; ROSSO, F.; BARDI, L.; CIANI, M.; BUDRONI, M.; ZARA, G.; ZARA, S.; MANNAZZU, I. From crude glycerol to carotenoids by using a *Rhodotorula glutinis* mutant. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 1009-1017, 2013.

CZABANY, T.; ATHENSTAEDT, K.; DAUM, G. Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1771, p. 299–309, 2007.

DAMASCENO, S.; CEREDA, M. P.; PASTORE, G. M.; OLIVEIRA, J. G. Production of volatile compounds by *Geotrichum fragrans* using cassava wastewater as substrate. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 4, p. 411–414, dez, 2003.

DEMIR, M.; TURHAN, I.; KUCUKCETIN, A.; ALPKENT, Z. Oil production by *Mortierella isabellina* from whey treated with lactase. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 365–369, 2013.

DWORECKA-KASZAK, B.; KIZERWETTER-SWIDA, M. Pseudomycelium forming *Rhodotorula*–unusual picture of biofilm. **Mikologia Lekarska**, v.18, p. 74–78, 2011.

FEDERICI, F.; FAVA, F.; KALOGERAKIS, N.; MANTZAVINOS, D. Valorisation of agro-industrial by-products, effluents and waste: concept, opportunities and the case of olive mill wastewaters. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, p. 895–900, 2009.

FELIPE, F. I.; RIZATO, M.; WANDALSEN, J. V. **Potencial econômico dos resíduos de mandioca provenientes de feculárias no Brasil**. 47º Congresso Sociedade Brasileira de economia administração e sociologia rural, Porto Alegre, 2009.

FIORETTO, R. A. Uso direto da manipueira em fertirrigação. **Manejo, uso e tratamentode subprodutos da industrialização da mandioca**. (Série: culturas de tuberosas amiláceas latino americanas), São Paulo: Cargil, v.4, p.13-37, 2001.

FAO: Food and Agricultural Organization of the United Nations. Available at: Food and Agriculture Organization, Faostat, 2008. Disponível em <http://faostat.fao.org>, acesso em 27/09/2015.

FAO: Food and Agricultural Organization of the United Nations. Available at: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>, 2013. Acesso em 08/10/2015.

FRENGOVA, G. I.; BESHKOVA, B. M. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 163-180, 2009.

GARAY, L. A.; BOUNDY-MILLS, K. L.; GERMAN, J. B. Accumulation of high-value lipids in single-cell microorganisms: A mechanistic approach and future perspectives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 2709–2727, 2014.

HUANG, C.; LI, Y.; LIU, L.; WU, H.; ZONG, M.; LOU, W. Kinetics and mechanism analysis on microbial oil production by *Trichosporon fermentans* in rice straw hydrolysate. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.53, p. 19034-19043, 2014.

HUANG, C.; WU, H.; LI, R. F.; ZONG, M. H. Improving lipid production from bagasse hydrolysate with *Trichosporon fermentans* by response surface methodology. **New Biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 372–378, 2012.

HUANG, C.; ZONG, M.; WU, H.; LIU, Q. Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 19, p. 4535–4538, 2009.

HUANG, J. Z.; SHI, Q. Q.; ZHOU, X. L.; LIN, Y. X.; XIE, B. F.; WU, S. G. Studies on the breeding of *Mortierella isabellina* mutant high producing lipid and its fermentation conditions. **Microbiology**, v. 25 n. 4, p. 187–191, 1998.

KAPDAN, IK; KARGI, F. Biohydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 569-82, 2006.

KARATAY, S. E.; DÖNMEZ, G. Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 20, p. 7988–7990, 2010.

KITCHA, S.; CHEIRSILP, B. Screening of oleaginous yeasts and optimization for lipid production using crude glycerol as a carbon source. **Energy Procedia**, v. 9, p. 274–282, 2011.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations **Bioresource Technology**, v. 87, p. 167–199, 2003.

LEAÑO, E.P.; BABEL, S. Effects of pretreatment methods on cassava wastewater for biohydrogen production optimization. **Renewable Energy**, v. 39 p. 339-346, 2012.

LEIVA-CANDIA, D.E.; PINZI, S.; REDEL-MACÍAS, M.D.; KOUTINAS, A.; WEBB, C.; DORADO, M. P. The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. **Fuel**, v.123, p. 33–42, 2014.

LI, Q.; DU, W.; LIU, D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 5, p. 749–56, out. 2008.

LIANG, M. H.; JIANG, J. G. Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. **Progress in Lipid Research**, v. 52, p. 395–408, 2013.

LIAN, J.; GARCIA-PEREZ, M.; CHEN, S. Fermentation of levoglucosan with oleaginous yeasts for lipid production. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 183–9, 2013.

LIAN, J.; GARCIA-PEREZ, M.; COATES, R.; WU, H.; CHEN, S. Yeast fermentation of carboxylic acids obtained from pyrolytic aqueous phases for lipid production. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 177–186, 2012.

LI, Q.; DU, W.; LIU, D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 5, p. 749–756, 2008.

LIMA, J. W. C. **Análise ambiental : processo produtivo de polvilho em indústrias do extremo sul de Santa Catarina**. 131 f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Engenharia da Produção, Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.

LI, M.; LIU, G. L.; CHI, Z.; CHI, Z. M. Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, p. 101-107, 2010.

LI, Y. H.; LIU, B.; ZHAO, Z. B.; BAI, F. W. Optimized culture medium and fermentation conditions for lipid production by *Rhodosporidium toruloides*. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 650–656, 2006.

LIU, H.; JIANG, G.M.; ZHUANG, H.Y.; WANG, K.J. Distribution, utilization structure and potential of biomass resources in rural China: with special references of crop residues. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 12, n. 5, p. 1402–1418, 2008.

LIU, S. J.; YANG, W.B.; SHI, A. H. Screening of the high lipid production strains and studies on its flask culture conditions. **Microbiology**, v.27, n.2, p.93–97, 2000.

LIU, J. X.; YUE, Q. Y.; GAO, B.Y.; MA, Z. H.; P. ZHANG. Microbial treatment of the monosodium glutamate wastewater by *Lipomyces starkeyi* to produce microbial lipid. **Bioresource Technology**, v. 106, p. 69–73, 2012.

LOTTENBERG, A. N. P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, p. 595-607, 2009.

MAINUL, H.; PHILIPPE, J. B.; LOUIS, M. G.; ALAIN, P. Influence of nitrogen and iron limitations on lipid production by *Cryptococcus curvatus* grown in batch and fed-batch culture. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 4, p. 355–361. 1996.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources - a review. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 2, p. 237-241, 1999.

MALISORN, C.; SUNTORNSUK, W. Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM 28 in fermented radish brine. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2281–2287, 2007.

MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roesse-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, p. 93-100, 2001.

MAYER, J.E.; PFEIFFER, W.H.; BEYER, P. Biofortified crops to alleviate micronutrient malnutrition. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 166–170, 2008.

MENG, X.; YANG, J.; XU, X.; ZHANG, L.; NIE, Q.; XIAN, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, v. 34, n. 1, p. 1–5, 2009.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426 – 428, 1959.

MÜHLEN, G. S.; MARTINS, P. S.; ANDO, A. Variabilidade genética de etnovarietades de mandioca avaliada por marcadores de DNA. **Scientia Agricola**, v.57, n.2, p.319-328, 2000.

MÜLROTH, A.; LI, K.; ROKKE, G.; WINGE, P.; OLSEN, Y.; HOHMANN-MARRIOTT, M. F.; VADSTEIN, O.; BONES, A. M. Pathways of lipid metabolism in marine algae, co-expression network, bottlenecks and candidate genes for enhanced production of EPA and DHA in species of Chromista. **Marine Drugs**, v. 11, p. 4662–4697, 2013.

MUNIRAJ, I. K.; XIAO, L.; HU, Z.; ZHAN, X.; SHI, J. Microbial lipid production from potato processing wastewater using oleaginous filamentous fungi *Aspergillus oryzae*. **Water Research**, v. 47, n. 10, p. 3477–3483, 2013.

MUSSATTO, S.I.; TEIXEIRA, J.A. Increase in the fructooligosaccharides yield and productivity by solid-state fermentation with *Aspergillus japonicus* using agro-industrial residues as support and nutrient source **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, p. 154–157, 2010.

NASU, E. G. C. **Composição química da manipueira e sua potencialidade no controle de *Meloidogyne incognita* em tomateiro no oeste do Paraná**. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Agronomia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2008.

NITSCHKE, M., PASTORE, G.M. Cassava flour wastewater as a substrate for biosurfactant production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 106, p. 295–302, 2003.

NITSCHKE, M., PASTORE, G.M., Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 336–341, 2006.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, p. 1031–1051, 2011.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**, v. 2, p. 118-127, 2007.

PENG, W. F.; HUANG, C.; CHEN, X. F.; XIONG, L.; CHEN, X.; CHEN, Y.; MA, L. L. Microbial conversion of wastewater from butanol fermentation to microbial oil by oleaginous yeast *Trichosporon dermatis*. **Renewable Energy**, v. 55, p. 31–34, 2013.

PEREZ, P. Bancos de germoplasma garantem futuro da cultura: entrevista com Nivaldo Peroni. Projeto Mandioca Brasileira. Disponível em: <<http://www.abam.com.br/not.php?id=80>>. Acesso em: 11 set. 2014.

PETERS, D.; NGAI, D.D.; AN, DT. Agro-processing wastewater assessment in periurban Hanoi. CIP Program Report., p. 451–457, 2000.

POLI, J. S.; DALLÉ, P.; SENTER, L.; MENDES, S.; RAMIREZ, M.; VAINSTEIN, M.; VALENTE, P. Fatty acid methyl ester produced by oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* QU21: an alternative for vegetable oils. **Revista Brasileira de Biociências**, v.11, p. 203–208, 2013.

RABAEY, K.; VERSTRATE W. Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. **Trends Biotechnology**, v.23, p. 291–298, 2005.

RAMOS, L. P. **Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agro- industriais**. Centro de Pesquisa em Química Aplicada, Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil, 2000.

RATLEDGE, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. **Biochimie**, v. 86, p. 807-815, 2004.

RATLEDGE, C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. **Biochemical Society Transactions**, v.30, p. 1047–1050, 2002.

RATLEDGE, C.; WYNN, J. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, v. 51, p. 1–51, 2002.

REUNGSANG, A.; SANGYOKA, S; IMAI, T; CHAIPRASERT P. Biohydrogen production from cassava starch manufacturing wastewater. **Asian Journal on Energy Environment**, v.7, p. 367-377, 2006.

RIBEIRO, E. P. SERAVALLI, E. A. G. Química de Alimentos. 2ª edição. São Paulo: Edgard Blucher, 2007, 184 p.

SÁNCHEZ, M. D. Estudio sobre los ácidos grasos libres em queso blanco Venezolano. **Revista de la Facultad de Farmacia**, v. 46, p. 29-31, 2004.

SANTOS, L.; KOTOVICZ, V.; BARANA, A. C.; ALMEIDA, M. M. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de amiloglucosidase por *Aspergillus awamori* (agroindustrial wastes utilization to glucoamylase production by *Aspergillus awamori*). **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 6, n. 1, p. 655–664, 2013.

SAWANGKEAW, R.; NGAMPRASERTSITH, S. A review of lipid-based biomasses as feedstocks for biofuels production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 25, p. 97–108, 2013.

SCHNEIDER, T.; GRAEFF-HÖNNINGER, S.; FRENCH, W. T.; HERNANDEZ, R.; MERKT, N.; CLAUPEIN, W.; HETRICK, M.; PHAM, P. Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents. **Energy**, v. 61, p. 34–43, nov. 2013.

SHETTY, J. K.; STROHM, B. A.; LEE, S. H.; DUAN, G.; BATES, D. Cassava, the next corn for starch sweeteners. **Industrial Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 275–284, 2014.

SIMIONATO, J. I. Composição química e quantificação de ácidos graxos com ênfase ao ácido linoléico conjugado (CLA) em leite e derivados. 115 f. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Química, Maringá, 2008.

SITEPU, I. R.; GARAY, L. A.; SESTRIC, R.; LEVIN, D.; BLOCK, D. E.; GERMAN, J. B.; BOUNDY-MILLS, K. L. Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 1336–1360, 2014.

SITEPU, I. R.; SESTRIC, R.; IGNATIA, L.; LEVIN, D.; GERMAN, J. B.; GILLIES, L. A.; ALMADA, L. A. G.; BOUNDY-MILLS, K. L. Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 360–369, 2013.

SPIER, F. **Produção de lipídios microbianos a partir de glicerol bruto na síntese de biodiesel**. 190f. Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, 2014.

SRIROTH, K.; CHOLLAKUP, R.; CHOTINEERANAT, S.; PIYACHOMKWAN, K.; OATES, C. G. Processing of cassava waste for improved biomass utilization. **Bioresource Technology**, v. 71, n. 1, p. 63–69, 2000.

TACCARI, M.; CANONICO, L.; COMITINI, F.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. Screening of yeasts for growth on crude glycerol and optimization of biomass production. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 488–495, 2012.

THIRU, M.; SANKH, S.; RANGASWAMY, V. Process for biodiesel production from *Cryptococcus curvatus*. **Bioresource Technology**, v.102, p. 10436–10440, 2011.

TIMOFIECSYK, F. R.; PAWLOWSKY, U. Minimização de resíduos na indústria de alimentos: Revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa e de Processamento de Alimentos**, v.18, p. 221-236, 2000.

TSIGIE, Y. A.; WANG, C.-Y.; TRUONG, C.-T.; JU, Y.-H. Lipid production from *Yarrowia lipolytica* *Polg* grown in sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9216–9222, 2011.

VALERO, E.; MILLAN, C.; ORTEGA, J. M. Influence of oxygen addition during growth phase on the biosynthesis of lipids in *Saccharomyces cerevisiae* (M(3)30-9) in enological fermentations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.92, p.33-38, 2001.

VICENTE G.; BAUTISTA, L. F.; RODRIGUEZ, R.; GUTIERREZ, F. J; SADABA, I.; RUIZ-VAZQUEZ, R. M. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p.22–27, 2009.

WANG, W.; XIE, L.; LUO, G.; ZHOU, Q.; LU, Q. Optimization of biohydrogen and methane recovery within a cassava ethanol wastewater/waste integrated management system. **Bioresource Technology**, v.120, p. 165–172, 2012.

WYMAN, C.E. Potential synergies and challenges in refining cellulosic biomass to fuels, chemicals, and Power. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 254–262, 2003.

XUE, F.; MIAO, J.; ZHANG, X.; LUO, H.; TAN, T. Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5923–5927, 2008.

XUE, F.; ZHANG, X.; LUO, H.; TAN, T. A new method for preparing raw material for biodiesel production. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1699–1702, 2006.

YEN, H-W.; YANG, Y-C.; YU, Y-H. Using crude glycerol and thin stillage for the production of microbial lipids through the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 4, p. 453–456, 2012.

YU, X.; ZHENG, Y.; DORGAN, K. M.; CHEN, S. Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 6134–6140, 2011.

ZHANG, Q.H.; LU, X.; TANG, L.; MAO, Z.G.; ZHANG, J.H.; ZHANG, H.J.; SUN, F.B. A novel full recycling process through two-stage anaerobic treatment of distillery wastewater for bioethanol production from cassava. **Journal of Hazardous Materials**, v.179, p. 635–641, 2010.

ZHAO, X.; KONG, X.; HUA, Y.; FENG, B.; ZHAO, Z. K. Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkey*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, p. 405–412, 2008.

ZHAO, C.; ZHANG, T.; LI, M.; CHI, Z. Single cell oil production from hydrolysates of inulin and extract of tubers of Jerusalem artichoke by *Rhodotorula mucilaginosa TJY15a*. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1121–1126, 2010.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados identificados e discussão estão apresentados na forma de artigos científicos, elaborados de acordo com as normas sugeridas pelos periódicos escolhidos, intitulados:

Artigo 1: Produção biotecnológica de lipídios por *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando manipueira.

Artigo 2: Avaliação da manipueira como substrato para a produção de biomassa e lipídios pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa*.

ARTIGO 1

Produção biotecnológica de lipídios por *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando manipueira

Josevan da Silva^a, Flávio L. H. Silva^{*b}, José E. R. Santos^c, Marta S. Madruga^d, Lorena L. Medeiros^c, Andrea L. O. Ferreira^e

^aAluno de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba

^bProfessor do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal da Paraíba

^cAlunos do doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba

^dProfessora do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba

^eProfessora do Instituto Federal da Bahia

*flavioluizh@yahoo.com.br.

Em virtude da alta e constante atividade industrial distribuída pelo mundo, diariamente são gerados milhares de toneladas de resíduos, muitos destes não são aproveitados, sendo descartados diretamente no meio ambiente sem nenhum tratamento prévio, podendo ocasionar sérios impactos ambientais. Assim, buscam-se alternativas para o reaproveitamento desses resíduos para a produção de substâncias que tenham potencial para ser utilizadas como produto, minimizando a poluição ao meio ambiente e agregando valor ao resíduo. Uma forma de reaproveitamento de resíduos tóxicos e/ou poluentes é o seu uso para a produção, por processos biotecnológicos, de substâncias de interesse, como vitaminas, pigmentos, enzimas e, inclusive, lipídios. Em vista disso, essa pesquisa teve como objetivo avaliar os efeitos dos componentes do meio de cultivo sobre a biomassa e lipídios produzidos através da fermentação do principal resíduo da mandioca (manipueira) utilizando a levedura *Rhodotorula mucilaginosa*. As células de *R. mucilaginosa* foram cultivadas em meio YMA e inoculadas em frascos Erlenmeyer contendo 400 mL de meio com 20% de manipueira, 10 g.L⁻¹ glicose, 1,0 g.L⁻¹ sulfato de magnésio e 0,8 g.L⁻¹ extrato de levedura. Os cultivos foram realizados em agitador rotativo (shaker) submetidos à temperatura de 30 °C sob agitação constante de 200 rpm por 120 h. Durante os intervalos de tempo de 0, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 h alíquotas foram retiradas do meio para a análise de biomassa e lipídios. A manipueira analisada apresentou 92,38% de umidade, 30,2 g.L⁻¹ de açúcares redutores, 51 g.L⁻¹ de açúcares totais, 1,17% de proteínas e 0,53% de cinzas, acidez titulável de 3,20 (meq NaOH.100 mL⁻¹), sólidos solúveis totais de 7,0° Brix, e pH equivalente a 5,26. Com relação ao cultivo do micro-organismo no meio sintético, a biomassa máxima foi equivalente a 14,05 g.L⁻¹, 96 h após o inóculo. No cultivo utilizando-se um meio à base de manipueira, a biomassa máxima foi equivalente a 7,49 g.L⁻¹, 96 h após o inóculo, e nesse mesmo intervalo de tempo foram produzidos 30% de lipídios em biomassa seca. A manipueira mostrou-se como um bom substrato para a produção de lipídios por *R. mucilaginosa*, podendo ser utilizada em processos fermentativos, agregando valor ao resíduo e minimizando possíveis impactos ambientais pelo descarte inadequado.

Introdução

Investimentos que possibilitem uma melhor gestão de resíduos industriais podem contribuir de forma significativa para promover o desenvolvimento sustentável de um país. Entre estes, destaca-se a manipueira, que é um resíduo da indústria processadora de mandioca, sendo produzida em grande quantidade no Brasil e, apesar dos nutrientes que possui, é um resíduo pouco aproveitado e muitas vezes descartado de forma incorreta no meio ambiente.

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta cujas raízes são utilizadas para a nutrição humana e animal servindo de matéria-prima para a fabricação de vários produtos, dentre eles os mais importantes são a farinha, a fécula e o polvilho de mandioca (Avancini et al., 2009).

Para se produzir a farinha, a raiz de mandioca é triturada e prensada, originando uma massa esbranquiçada com alta umidade, que é seca e torrada, já para a fabricação de fécula adiciona-se um grande volume de água à

massa, resultando em um volume extra equivalente a 60% da matéria-prima em resíduos líquidos, conhecido popularmente como manipueira (Borghetti, 2009).

Uma alternativa relacionada ao aproveitamento de resíduos agroindustriais é a utilização de micro-organismos para a produção de agentes antioxidantes, agentes antimicrobianos, vitaminas, lipídios, proteínas e pigmentos, substâncias de grande interesse da indústria alimentícia. Podem ser produzidos também xilitol (Lima et al., 2014) e enzimas (Dias et al., 2014).

Leveduras do gênero *Rhodotorula* são aeróbios estritos com características metabólicas peculiares. Uma delas é a capacidade de produzir glicogênio durante a fase exponencial de crescimento. Também são capazes de acumular lipídios e carotenoides durante a fase estacionária de crescimento (Dworecka-Kaszak and Kizerwetter-Swida, 2011).

Em um processo de produção de lipídios microbianos deve-se selecionar a melhor linhagem e o melhor e menos oneroso substrato a ser utilizado no cultivo, entretanto a eficiência do processo é de extrema importância. Ami et al. (2014) destacam que é fundamental a realização de um monitoramento do micro-organismo e também do substrato utilizado no processo fermentativo, para que se possa manter a produtividade constante, seja em cultivos testes, ou em ampliação de escala, já que estes podem ser afetados por diversos fatores.

Diversos substratos, a maioria destes subprodutos, ou substâncias que normalmente seriam descartadas, são utilizados para a produção de lipídios microbianos. Na maioria dos casos, consegue-se produzir lipídios em altas concentrações.

Nesse trabalho buscou-se avaliar a influência de alguns nutrientes do meio de cultivo sobre biomassa produzida e o acúmulo de lipídios pela levedura *R. mucilaginosa*, utilizando a manipueira como substrato.

Material e métodos

Manipueira

A manipueira utilizada foi gentilmente cedida por uma micro indústria de farinha do município de Sobrado no Estado da Paraíba, Brasil e armazenada a -18° C logo após a coleta.

Análises físico-químicas do substrato

Foram realizadas as análises de açúcares redutores e totais utilizando-se o método do DNS, proposto por Miller (1959). A determinação de proteínas, umidade, cinzas, acidez total, sólidos solúveis (°Brix) e pH seguiram a metodologia da AOAC (2000). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Micro-organismo

Foi utilizada a levedura *R. mucilaginosa* CCT 7688, fornecida pela Fundação André Tosello, Coleção de Culturas Tropicais, de São Paulo. A levedura *R. mucilaginosa* foi adquirida na forma ativada. Para crescimento e manutenção as colônias foram incubadas em placas de Petri com meio YMA (Yeast Malt Agar) composto por 10 g.L⁻¹ de glicose, 3 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 3 g.L⁻¹ de extrato de malte, 5 g.L⁻¹ de bacto peptona e 20 g.L⁻¹ de ágar. As placas foram incubadas na estufa a 30 °C. Para a manutenção, as leveduras foram colocadas nas placas em refrigerador à temperatura de 4 °C.

Cultivo em meio sintético

Células de *R. mucilaginosa* CCT 7688 foram diluídas em água destilada estéril e inoculadas em frascos Erlenmeyer de 1000 mL, contendo 400 mL do meio sintético. Na Tabela 2 tem-se a composição do meio utilizado de acordo com Frengova et al. (1994). O inóculo foi mantido em incubadora tipo "Shaker" (Logen – LS4900 – THZ), a 30 °C e 200 rpm. Durante o período de incubação, alíquotas foram removidas periodicamente durante os intervalos de tempo de 0, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 h para determinar o crescimento da levedura (biomassa).

Tabela 1 – Componentes do meio de cultivo sintético para crescimento da levedura *R. mucilaginosa*.

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
Glicose	40
KH ₂ PO ₄	8,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
Extrato de levedura	3,0

Pré-inóculo

Adicionou-se 5 mL de água destilada estéril a uma placa de Petri contendo a levedura *R. mucilaginosa*, raspando-se as células até formar uma suspensão. Os 5 mL foram transferidos para um frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL do meio utilizado para o cultivo sintético (Tabela 1). Após o inóculo, o frasco Erlenmeyer foi levado para a incubadora tipo "Shaker" a 30° C e 200 rpm. Após 24 h, o meio foi centrifugado e o sobrenadante descartado, adicionou-se 50 mL de água destilada estéril e a concentração celular foi determinada em câmara de Neubauer para cálculo do volume de inóculo correspondente a 1×10^7 células. mL⁻¹.

Condições de cultura

Para a remoção do excesso de sólidos e consequente clarificação, a manipueira foi centrifugada (Centrífuga refrigerada RB7) a 3200 rpm durante 10 min, em seguida o precipitado foi removido por filtração e o sobrenadante foi utilizado para o processo fermentativo.

Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 1000 mL, contendo 400 mL do meio de cultura, resultante da adição do meio de cultivo, suspensão de leveduras (inóculo) e água destilada estéril colocados em agitador rotativo e incubados durante 120 h. As condições de cultura foram estabelecidas de acordo com Spier (2014), sendo descritas na Tabela 2. Ensaios preliminares definiram a concentração de manipueira e os nutrientes utilizados para suplementação.

Tabela 2 - Condições de cultivo para produção de lipídios pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa*.

Componente	Concentração (g.L ⁻¹).
Manipueira (% v/v)	20
Glicose (g.L ⁻¹)	10
MgSO ₄ .7H ₂ O (g.L ⁻¹)	1,0
Extrato de levedura (g.L ⁻¹)	0,8

Métodos analíticos

Biomassa

Alíquotas de 2 mL foram retiradas durante os intervalos de tempo de 0, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 h para análise de concentração de biomassa (g.L⁻¹). As alíquotas foram centrifugadas (mini spin Eppendorf) a 10000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi descartado e os Eppendorfs foram colocados em estufa a 105 °C por 24 h, sendo posteriormente pesados. Alíquotas de 1 mL da amostra foram diluídas em água destilada e lidas em espectrofotômetro (Bioespectro SP 220) ao comprimento de onda de 600 nm. O valor da absorvância foi convertido em concentração através de uma curva padrão de biomassa.

Lipídios

Para quantificação dos lipídios totais, foram utilizadas as biomassas produzidas após 96 e 120 h de cultivo. Nestes intervalos de tempo, 300 mL do fermentado foram coletados e centrifugados a 3600 rpm por 10 min, o sobrenadante foi descartado e a biomassa foi seca em estufa a 105 °C por 24 h. A biomassa seca foi macerada com grau e pistilo para diminuição das partículas e para facilitar a ação dos solventes durante a extração. O teor de lipídios foi determinado através do método de Bligh and Dyer (1959), utilizando-se uma mistura de clorofórmio, metanol e água. Primeiramente a biomassa seca foi tratada com uma solução de HCl 2 mol.L⁻¹ para rompimento da parede celular. Para auxiliar no processo de rompimento celular, agitou-se a mistura em vortex por 2 min com posterior centrifugação a 3600 rpm por 10 min. Formaram-se três fases, a fase superior foi descartada e a inferior foi evaporada em estufa a 70 °C e os lipídios quantificados por gravimetria, em massa seca.

Resultados e discussão

Análises químicas e físico-químicas do substrato

Os resultados da composição química e físico-química da manipueira encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Composição físico-química da manipueira analisada

Determinação	Quantificação
Umidade (%)	92,38
Proteínas (%)	1,17
Açúcares redutores (g.L ⁻¹)	30,20*
Açúcares não redutores (g.L ⁻¹)	20,40
Açúcares totais (g.L ⁻¹)	50,60
Cinzas (%)	0,54
Sólidos solúveis totais (°Brix)	7,0
pH	5,26
Acidez total titulável (meq NaOH.100 mL ⁻¹)	3,20

* Açúcares redutores estão inclusos em açúcares totais.

Avancini et al. (2007) em um estudo de caracterização e avaliação da toxicologia da manipueira, encontraram um teor de proteínas equivalente a 1,35%, valor este bem próximo ao encontrado no presente trabalho. O pH e o teor de cinzas encontrados foram bem mais baixos comparados aos do presente estudo, 3,20 e 0,02% respectivamente.

Nitschke e Pastore (2006), na produção e a avaliação das propriedades de um biossurfactante obtido a partir do *Bacillus subtilis*, tendo a manipueira como substrato, realizaram a caracterização do resíduo e obtiveram 12,8 g.L⁻¹ de açúcares redutores, teor este bem abaixo do encontrado no presente trabalho. Já o teor de açúcares não redutores, equivalente a 22,2 g.L⁻¹, foi bastante semelhante. O nitrogênio total encontrado pelos autores foi de 2,5%, um pouco acima do valor encontrado, e o pH medido foi equivalente a 5,9, ligeiramente mais básico do que o verificado nesse trabalho.

Cultivo em meio sintético

Na Figura 1 está ilustrado o crescimento da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* em meio sintético com o perfil da velocidade específica de crescimento.

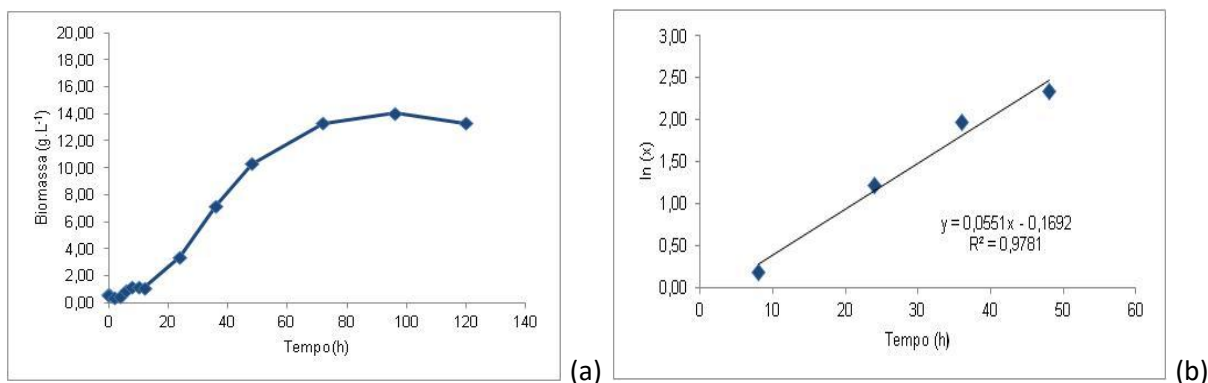


Figura 1 – (a) Crescimento da levedura *R. mucilaginosa* em meio sintético

(b) Perfil da velocidade específica de crescimento do micro-organismo em meio sintético

Com relação ao cultivo do micro-organismo no meio sintético, observa-se pela Figura 1(a) que no meio sintético houve crescimento da levedura até 96 h após o início da fermentação, sendo este o ponto de máxima biomassa produzida equivalente a 14,05 g.L⁻¹.

Observando-se a Figura 1 (a), pode-se perceber também que não houve crescimento nas primeiras 12 h de cultivo, caracterizando a fase *lag* do micro-organismo, atingindo-se seu ponto máximo 96 h após a inoculação do micro-organismo, destaque para a pequena fase estacionária, durando poucas horas, seguida da fase de declínio ou morte celular.

A Figura 1(b) apresenta o perfil da velocidade específica máxima de crescimento celular (μ máx), obtendo-se o valor de 0,055 h⁻¹.

Cultivo realizado utilizando a manipueira como substrato

Na Figura 2 tem-se a curva de crescimento da levedura *R. mucilaginosa*, com o perfil da velocidade específica de crescimento em meio contendo a manipueira.

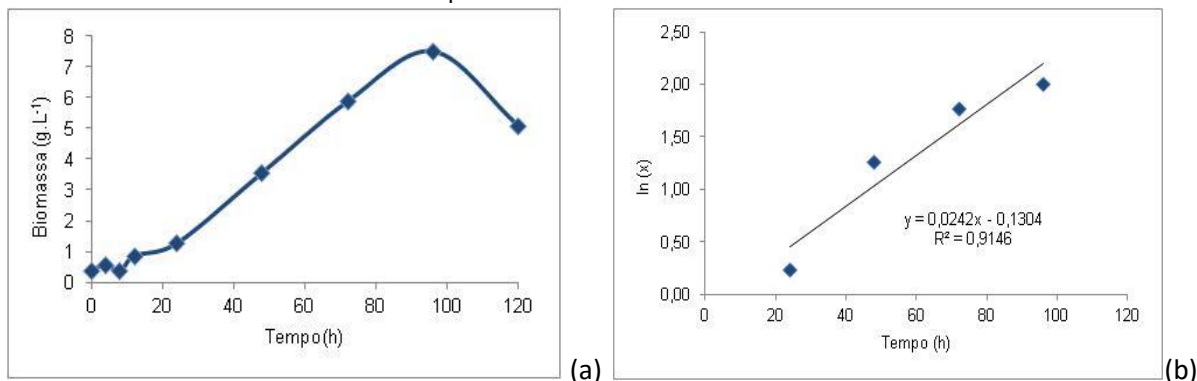


Figura 2 – (a) Crescimento da levedura *R. mucilaginosa* em meio contendo manipueira

(b) Perfil da velocidade específica de crescimento do micro-organismo em meio contendo manipueira

No cultivo utilizando-se o meio à base de manipueira suplementado com glicose, extrato de levedura e sulfato de magnésio, a biomassa máxima produzida foi de 7,49 g.L⁻¹, 96 h após o início da fermentação. A velocidade específica máxima de crescimento celular (μ máx), foi equivalente a 0,0242 h⁻¹.

Comparando-se as biomassas produzidas nos tempos 96 h e 120 h pode-se constatar que houve uma considerável redução, nesse intervalo de tempo, apresentando uma diminuição da biomassa, próximo ao tempo de 80 h, caracterizando a fase declínio, ou morte celular, de modo análogo ao ocorrido no cultivo sintético (Figura 1 (a)).

Aksu e Eren (2007) verificaram que a biomassa em células secas, aumentou com o a elevação da concentração inicial de glicose até 20 g.L⁻¹, atingindo seu máximo nesse ponto. Os autores destacam também a capacidade da levedura *R. mucilaginosa* de crescer em uma variedade de fontes de carbono, tais como glicose, sacarose e lactose, configurando-se como uma grande vantagem.

Com o máximo de biomassa (7,49 g.L⁻¹ em 96 h), analisou-se o % de lipídios equivalente, obtendo-se 30%, com relação à biomassa produzida, valores ainda não otimizados, ou seja, em estudo futuro buscar-se-á a otimização do processo, verificando as influências das variáveis % de manipueira, concentração de glicose, concentração de MgSO₄·7H₂O e extrato de levedura no meio.

Castanha et al. (2013) compararam dois métodos de extração de lipídios produzidos por leveduras oleaginosas em soro de queijo, a levedura *R. graminis* CBS 2826 produziu 9,71 g.L⁻¹ de biomassa e 0,09 g.L⁻¹ de lipídios totais. Comparando-se esses valores ao presente estudo, constata-se que a produção de lipídios da *R. mucilaginosa* foi superior.

Cazetta et al. (2005) utilizaram vinhaça e melaço de cana-de-açúcar para a síntese de biomassa lipídica por leveduras e bactérias. Utilizando-se a vinhaça bruta como meio de cultivo e a levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, conseguiu-se a maior produção de biomassa, 7,05 g.L⁻¹, valor bastante similar ao encontrado nesse estudo. No melaço de cana-de-açúcar, *Candida lipolytica* produziu 6,28 g.L⁻¹ em biomassa e a maior quantidade de lipídios, 21,16% na vinhaça e 25,59% no melaço. Já *R. mucilaginosa* produziu 18,38% na vinhaça e 18,80% no melaço, após 48 h de cultivo.

Xue et al. (2008) verificaram a influência da adição de glicose no meio sobre a biomassa e os lipídios produzidos utilizando a levedura *R. glutinis* e águas residuais de glutamato monossódico como substrato. A adição de glicose mostrou-se favorável não só para o crescimento celular, mas também para a síntese de lipídios. Entre os três métodos testados, a adição de glicose durante a realimentação mostrou-se mais eficaz, conseguindo-se produzir 25 g.L⁻¹ de biomassa e 20% em lipídios.

A biomassa produzida no presente estudo foi superior a obtida por Reyna-Martinez et al. (2014), na síntese de lipídios por leveduras e por culturas mistas de leveduras e microalgas. Os autores produziram 6,27 g.L⁻¹ de biomassa seca utilizando a levedura *R. mucilaginosa*, o teor de lipídios produzidos pela levedura foi equivalente a 20,84 % em biomassa seca, valor este inferior ao do presente estudo.

Conclusão

O uso de um meio de cultivo à base de manipueira, suplementado de alguns nutrientes, possibilitou uma boa produção de biomassa e de lipídios, assim como um considerável rendimento dos lipídios em biomassa seca. A manipueira mostrou-se como uma boa alternativa para a produção de lipídios microbianos, podendo ser utilizada em processos fermentativos, agregando valor ao resíduo e minimizando impactos ambientais por ela provocados.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao suporte financeiro do Conselho Nacional de Tecnologia e Desenvolvimento Científico (CNPq) e a Fundação André Tosello pela doação do micro-organismo.

Referências

- Aksu, Z.; Eren, A. T., 2007. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. Biochemical Engineering Journal, v. 35, p. 107-113.
- Ami, R.; Posterl, R.; Mereghetti, P.; Porro, D.; Branduard, S. M. D. P., 2014. Fourier transform infrared spectroscopy as a method to study lipid accumulation in oleaginous yeasts. Biotechnology for Biofuels, v. 7, p. 1-14.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis., 2000. Washington D.C.: AOAC, p.1018.
- Avancini, S.R.P.; Faccin, G.L.; Vieira, M.A.; Rovaris A.A.; Podesta, R.; Tramonte, R.; Souza, N.M.A.; Amante, E.R., 2007. Cassava starch fermentation wastewater: Characterization and preliminary toxicological studies. Food and Chemical Toxicology, v. 45, p. 2273-2278.
- Bligh, E.G.; Dyer, J. W., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, v. 37, p. 911-917.
- Borghetti, I. A., 2009. Avaliação do crescimento da microalga *Chlorella minutissima* em meio de cultura com diferentes concentrações de manipueira, dissertação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Castanha, R. F. Moraes, L. A. S.; Mariano, A. P.; Monteiro, R. T. R. 2013. Comparison of two lipid extraction methods produced by yeast in cheese whey. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 56, p. 629-636.
- Cazetta, M. L.; Antonia, M.; Colabone, P. 2005. Use of sugar cane molasses and vinasse for proteic and lipidic biomass production by yeast and bacteria. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, v. 26, n. 2, p. 105-112.
- Dias, P.V.S.; Ramos, K.O.; Padilha, I.Q.M.; Araújo, D.A.M.; Santos, S.F.M.; Silva, F.L.H. 2014. Optimization of cellulase production by *Bacillus* sp. isolated from sugarcane cultivated soil, Chemical Engineering Transactions, v. 38, p. 277-282.
- Dworecka-Kaszak, B.; Kizerwetter-Swida, M., 2011. *Pseudomycelium* forming *Rhodotorula*—unusual picture of biofilm. Mikologia Lekarska, v.18, p. 74-78.
- Frengova, G.; Simova, E.; Pavlova, K.; Beshkova, B.; Grigorova, D., 1994. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. Biotechnology and Bioengineering, v. 44, p. 888-894.
- Lima, F.C.S.; Silva, F.L.H.; Gomes, J.P.; Muniz, M.B.; Santiago, A.M.; Silva, C.G., 2014. Biotechnological production of xylitol: evaluation of detoxification process with residual lignin using response surface methodology, Chemical Engineering Transactions, v. 38, p.415-420.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, v.31, p.426 – 428.
- Nitschke, M.; Pastore, G.M., 2006. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. Bioresource Technology, v. 97, p. 336-341.
- Reyna-Martínez, R.; Gomez-Flores, R.; López-Chuken, U. J.; González-González, R.; Fernández-Delgadillo, S.; Balderas-Rentería, I., 2014. Lipid production by pure and mixed cultures of *Chlorella pyrenoidosa* and *Rhodotorula mucilaginosa* isolated in Nuevo Leon, Mexico. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 175, p. 354-359.
- Spier, F. Produção de lipídios microbianos a partir de glicerol bruto na síntese de biodiesel. 2014. 190f. Tese. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande-RS, Brasil.
- Xue, F.; Miao, J.; Zhang, X.; Luo, H.; Tan, T., 2008. Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. Bioresource Technology, v. 99, p. 5923-5927.

ARTIGO 2

AVALIAÇÃO DA MANIPUEIRA COMO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA E LIPÍDIOS PELA LEVEDURA *RHODOTORULA MUCILAGINOSA*

Josevan da Silva^{*1}, Flávio L. H. Silva², Sharline F. M. Santos³, José E. S. Ribeiro, Lorena L. Medeiros⁵, Andrea L. O. Ferreira⁶

^{1,4,5} Alunos de doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba

^{2,3} Professores do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal da Paraíba

⁶ Professora do Instituto Federal da Bahia

*e-mail: josevanufpb@gmail.com

RESUMO

Esse estudo teve como objetivo avaliar o uso da manipueira como substrato para a produção de biomassa e de lipídios pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa*. As células de *Rhodotorula mucilaginosa* foram cultivadas em meio YMA e inoculadas em frascos Erlenmeyer contendo 200 mL de meio composto de 50, 75 e 100% de manipueira, suplementados com 3,0 g.L⁻¹ de extrato de levedura. Também foi realizado um cultivo controle em 200 mL de meio sintético. Os cultivos foram realizados em agitador rotativo (shaker), submetidos à temperatura de 30° C, sob agitação constante de 200 rpm por 120 h. Durante os intervalos de tempo de 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas alíquotas foram retiradas do meio para a análise do crescimento e do consumo da fonte de carbono. Os lipídios foram quantificados ao final do cultivo (120 h). Foram produzidos 4,1, 6,95, 5,77 g.L⁻¹ de biomassa e 13,33, 7,71, 8,47% de lipídios nos cultivos com 50, 75 e 100% de manipueira, respectivamente. O cultivo sintético produziu 9,39 g.L⁻¹ de biomassa e 41,92% de lipídios. O experimento com 100% de manipueira apresentou o melhor coeficiente de rendimento de conversão de açúcares redutores totais em biomassa (0,5188 g.g⁻¹) e o cultivo com 50% o

melhor rendimento na produção de lipídios ($0,0049 \text{ g.g}^{-1}$). Dessa forma, a manipueira mostrou-se como um potencial substrato para o crescimento da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* e para a produção de lipídios, podendo ainda essa produção ser otimizada.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate variation effects of concentration of cassava wastewater over production of biomass and lipids by the *Rhodotorula mucilaginosa* yeast. The *Rhodotorula mucilaginosa* cells were cultivated in YMA medium and inoculated in Erlenmeyer flasks of 200 mL medium, composited by 50, 75 and 100% of cassava wastewater supplemented with 3 g.L^{-1} of yeast extract. Also it was performed a control culture in syntethic medium. The cultures were realized in a shaker subjected to 30°C of temperature and a constant shaking of 200 rpm during 120 hours. During time intervals of 0, 24, 48, 72, 96 and 120 hours, aliquots were retired of the medium for the biomass analysis. The lipids were quantified at the cultivation's end (120 h). Were produced 4,1, 6,95, 5,77 g.L^{-1} of biomass and 13,33, 7,71 and 8,47% of lipids in the cultivations with 50, 75 and 100% of cassava wastewater, respectively. The syntethic culture produced 9,39 g/L of biomass and 41,92% of lipids. The experiment with 100% manipueira presented the best conversion efficiency coefficient of total reducing sugars in biomass (0.5188 gg^{-1}) and the growth with 50%, the best performance in the production of lipids (0.0049 gg^{-1}). Thus, the cassava wastewater proved be a good substract to the *Rhodotorula mucilaginosa* yeast's growing and for the lipids production, where this production could be optimized.

INTRODUÇÃO

A intensa e constante atividade industrial é responsável pela geração de milhões de toneladas de resíduos agroindustriais em todo o mundo (MAKRIS et al., 2007). Grande parte desses resíduos não é aproveitada, sendo descartada diretamente ao meio ambiente e podendo causar danos à flora e à fauna presentes, desequilibrando ecossistemas.

Um desses resíduos é originário da mandioca. Durante o processamento, as raízes são prensadas e lavadas resultando em um volume extra de um líquido amarelo claro, conhecido popularmente como manipueira. (AVANCINI et. al., 2009).

A excelente composição nutricional da manipueira, devido à presença de minerais como o fósforo, potássio, magnésio, além de ser boa fonte de açúcares fermentescíveis e nitrogênio, favorece o seu uso como substrato para crescimento de diversos micro-organismos e produção de várias substâncias de interesse, como compostos voláteis (DAMASCENO et al., 2003), biossurfactante (NITSCHKE; PASTORE, 2006), hidrogênio (CAPPELLETTI et al., 2011) e metano (FELIPE; RIZATO; WANDALSEN, 2009).

Na biotecnologia, leveduras são amplamente utilizadas porque são fáceis de cultivar e apresentam um bom histórico com relação à segurança de cultivo, já que poucas espécies são patogênicas (SAWANGKEAW; NGAMPRASERTSITH, 2013). São úteis também para a produção renovável e sustentável de óleos biodegradáveis com potencial para uso em gêneros alimentícios, combustíveis e produtos químicos (SITEPU et al., 2014).

Para a produção de lipídios, devem-se escolher linhagens que apresentem uma melhor cinética de desenvolvimento, com uma maior velocidade de crescimento, necessitando de menores tempos de cultivo, que não produzam substâncias indesejáveis e que tenham a capacidade de metabolizar substratos de custo reduzido (POLI et al., 2013). Nesse trabalho

buscou-se avaliar a influência da concentração de manipueira do meio de cultivo sobre a produção de biomassa e de lipídios pela levedura *R. mucilaginosa*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Manipueira

A manipueira utilizada foi gentilmente cedida por uma indústria de farinha localizada no Estado da Paraíba, Brasil e armazenada a -18 °C logo após a coleta. Para remoção dos compostos tóxicos e possíveis inibidores, foi realizado um tratamento térmico durante 20 min, a uma temperatura de 85 °C. Logo após, a manipueira foi resfriada e centrifugada a 6000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi coletado e utilizado como meio para os cultivos.

Micro-organismo

Foi utilizada a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688, fornecida pela Fundação André Tosello, coleção de culturas tropicais de São Paulo. A levedura *R. mucilaginosa* foi adquirida na forma ativada, e para o crescimento e manutenção, as colônias foram incubadas em placas de Petri com meio YMA (Yeast Malt Agar) composto por 10 g.L⁻¹ de glicose, 3 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 3 g.L⁻¹ de extrato de malte, 5 g.L⁻¹ de bacto peptona e 20 g.L⁻¹ de ágar.

As placas foram incubadas em estufa a 30° C. Para a manutenção das colônias, as leveduras foram colocadas nas placas em refrigerador à temperatura de 4° C.

Pré-inóculo

Adicionou-se 5 mL de água destilada estéril a uma placa de Petri contendo a levedura *R. mucilaginosa*, raspando-se as células até formar uma suspensão. Os 5 mL foram transferidos para um frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL do meio utilizado para o cultivo sintético (Tabela 2). Após o inóculo, o erlenmeyer foi levado para a incubadora tipo “Shaker”

a 30° C e 200 rpm. Após 24 h, o meio foi centrifugado e o sobrenadante descartado, adicionou-se 20 mL de água destilada estéril e a concentração celular foi determinada em câmara de Neubauer para cálculo do volume de inóculo correspondente a 1×10^7 células. mL⁻¹.

Cultivos

Foram realizados quatro cultivos, sendo três deles utilizando-se o meio à base de manipueira e um experimento realizado em meio sintético (controle). Todos os cultivos foram realizados em triplicata.

Na Tabela 1 tem-se a composição dos meios à base de manipueira utilizados e na Tabela 2 a composição do meio sintético utilizado de acordo com Frengova et al. (1994), os meios foram preparados e autoclavados a 1 atm por 15 min. Aos meios estéreis foram adicionados volumes iguais de pré-inóculo correspondentes a 1×10^7 células. mL⁻¹. O cultivo foi mantido em incubadora tipo “Shaker” (Logen – LS4900 – THZ), a 30° C e 200 rpm por 120 h. Durante o período de incubação, alíquotas foram removidas periodicamente durante os intervalos de tempo de 0, 24, 48, 72, 96 e 120 h para determinar o crescimento da levedura (biomassa). Ao final do cultivo (120 h) os lipídios foram extraídos e quantificados.

Tabela 1 – Composição dos meios à base de manipueira

Código	Percentual de manipueira (v/v)	Extrato de levedura (g.L ⁻¹)
E-1	50%	3,0
E-2	75%	3,0
E-3	100%	3,0

Tabela 2 – Componentes do meio de cultivo sintético para crescimento da levedura *R. mucilaginosa*.

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
Glicose	40
KH ₂ PO ₄	8,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
Extrato de levedura	3,0

Quantificação da Biomassa

Alíquotas de 2 mL foram retiradas durante os intervalos de tempo de 0, 24, 48, 72, 96 e 120 h para análise de concentração de biomassa (g.L⁻¹). Alíquotas de 2 mL da amostra foram utilizadas para leitura em espectrofotômetro (Bioespectro SP 220) no comprimento de onda de 600 nm. O valor da absorvância foi convertido em concentração através de uma curva padrão de biomassa.

Consumo Da Fonte De Carbono

Para monitoramento do processo de consumo de açúcares pela levedura, durante os intervalos de tempo de 0, 24, 48, 72, 96 e 120 h, foram coletados 2 mL do meio, sendo centrifugados (mini spin Eppendorf) a 10000 rpm por 10 min, e o sobrenadante foi utilizado para análise de açúcares redutores pelo método de DNS (Miller, 1959).

Extração e Quantificação dos Lipídios

Para quantificação dos lipídios totais, foram utilizadas as biomassas produzidas ao final do cultivo (120 h). O restante do fermentado (cerca de 180 mL) foi coletado e centrifugado a 3600 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e a biomassa foi seca em estufa a 105° C por 24 h. A biomassa seca foi macerada com grau e pistilo para diminuição das partículas e para facilitar a ação dos solventes durante a extração. Primeiramente, a biomassa seca foi tratada com uma solução de HCl 2 mol.L⁻¹ para rompimento da parede celular. O teor de

lipídios foi determinado através do método de Bligh; Dyer (1959) adaptado por Manirakiza, Covaci; Schepens (2001), através da extração dos lipídios polares e não polares da biomassa utilizando-se uma mistura de metanol e clorofórmio. Formaram-se três fases, a fase superior foi descartada e a inferior foi evaporada em estufa a 70 °C e os lipídios quantificados por gravimetria em massa seca.

Análise Estatística

Os experimentos foram tratados por meio da Análise de Variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Biomassa

Na Figura 1 tem-se o resultado para a biomassa produzida pela *Rhodotorula mucilaginosa* ao longo do tempo de cultivo.

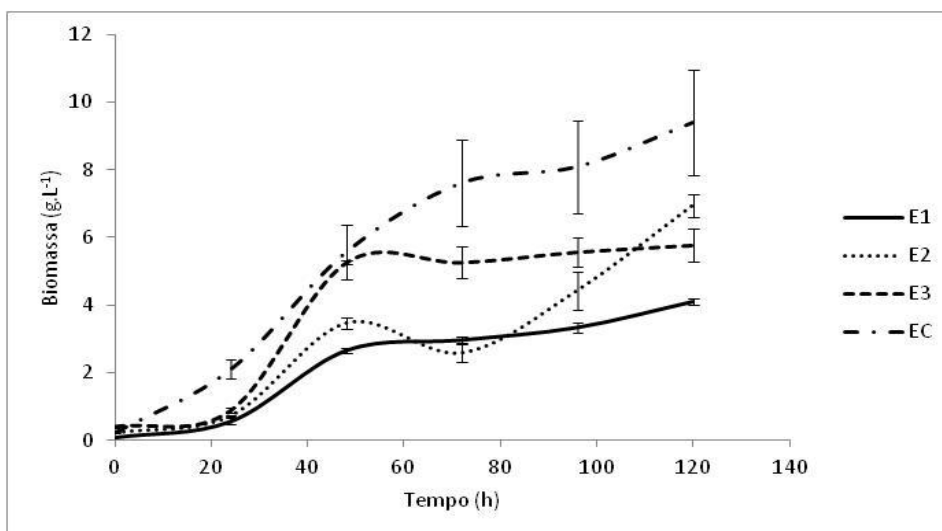


Figura 1 - Biomassa produzida pela *Rhodotorula mucilaginosa* ao longo do tempo de cultivo.

De acordo com a Figura 1, o experimento 2 (75% de manipueira) apresentou a mais elevada produção de biomassa ($6,95 \text{ g.L}^{-1}$) entre os 3 experimentos realizados em meio à base de manipueira, sua biomassa final foi inferior apenas ao cultivo realizado em meio sintético

(9,39 g.L⁻¹). Os experimentos 1, 2 e 3 apresentaram taxas de crescimento muito similares nas 24 primeiras horas de cultivo, e todos atingiram suas respectivas biomassas máximas em 120 h após o inóculo.

Cazetta e Celligoi (2005) cultivaram *R. mucilaginosa* em vinhaça e melaço de cana-de-açúcar e produziram 1,62 g.L⁻¹ de biomassa utilizando um meio com 10% de melaço, e 7,05 g.L⁻¹ tendo como substrato a vinhaça bruta. Reyna-Martinez et. al (2015) obtiveram 6,27 g.L⁻¹ e 6,53 g.L⁻¹ de biomassa seca utilizando a levedura *R. mucilaginosa*, e como substratos, um meio com limitação de nitrogênio (NLM) e um meio de cultura misto para microalgas e leveduras, respectivamente.

Li et al (2010) verificaram que a fonte de carbono não influenciou significativamente no crescimento da levedura *R. mucilaginosa*. Foram utilizadas glicose, sacarose, xilose e o hidrolisado da fécula de mandioca como fontes de carbono para crescimento da levedura, produzindo-se, respectivamente, 13, 13, 12 e 11 g.L⁻¹ de biomassa. Entretanto, no mesmo estudo, foram utilizados extrato de levedura, peptona, NaNO₃, (NH₄)₂SO₄ e (NH₄)₂NO₃ como fontes de nitrogênio, e com o uso de (NH₄)₂SO₄ e peptona foram obtidas as maiores biomassas, 23 e 24 g.L⁻¹, respectivamente.

Lipídios

Os resultados para a produção de lipídios pela levedura *R. mucilaginosa* em manipueira encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Produção de lipídios e rendimento em relação ao substrato por *R. mucilaginosa* em manipueira em diferentes concentrações.

Experimento	% de lipídios	Biomassa final (g.L ⁻¹)
E1	13,33 ^{b*} ± 1,01	4,1 ^c ± 0,10
E2	7,71 ^c ± 0,81	6,95 ^b ± 0,34
E3	8,47 ^c ± 1,56	5,77 ^{bc} ± 0,47
Controle	41,92 ^a ± 2,13	9,39 ^a ± 1,57

*Letras iguais não diferem ao nível de 5% de significância $p < 0,05$ (Teste de Tukey).

De acordo com a Tabela 3, a concentração de manipueira no meio de cultivo influenciou na produção lipídica, já que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o experimento com 50% de manipueira (E1), 75% (E2) e controle. Pôde-se constatar uma redução na produção lipídica quando se elevou a concentração de manipueira, possivelmente devido a uma provável inibição à produção devido à presença de cianeto na forma de linamarina, que não é facilmente volatilizado durante o tratamento térmico da manipueira. A presença de nutrientes como o sulfato de magnésio e o fosfato de potássio no cultivo controle pode ter influenciado para a elevada produção lipídica, comparada aos outros experimentos.

No cultivo com o meio sintético conseguiu-se a maior produção lipídica (41,92% em biomassa seca). Quanto aos cultivos em meio à base de manipueira, no experimento realizado utilizando-se 50% do resíduo, conseguiu-se o mais elevado teor de lipídios (13,33%). Já nos cultivos com 75 e 100% de manipueira, produziu-se 7,71 e 8,47% de lipídios, respectivamente. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre a produção lipídica usando-se 75 e 100% de manipueira.

R. mucilaginosa cultivada em vinhaça bruta produziu 18,38% de lipídios em biomassa seca, equivalente a 0,62 g de lipídios por litro de substrato. No melaço de cana-de-açúcar, conseguiu-se produzir 18,80% de lipídios, 0,6 g de óleo para cada litro de substrato utilizado

(CAZETTA e CELLIGOI, 2005). Reyna-Martinez et al. (2015) cultivaram a levedura *R. mucilaginosa* utilizando um meio de cultura com limitação de nitrogênio (NLM), e um meio de cultura misto para leveduras e microalgas. No cultivo com limitação de nitrogênio produziram $1,31 \text{ g.L}^{-1}$ de lipídios, já no meio de cultura misto, obtiveram $1,05 \text{ g.L}^{-1}$.

Melhorias no processo de produção de lipídios microbianos, como a redução dos custos, melhor utilização das fontes de carbono, mais rápido crescimento microbiano, atingindo-se uma densidade celular mais elevada e com um maior acúmulo de óleo, podem resultar em um processo de produção economicamente viável (SITEPU et al., 2014).

Consumo Da Fonte De Carbono

O resultado para o consumo da fonte de carbono durante o cultivo encontra-se na Figura 2.

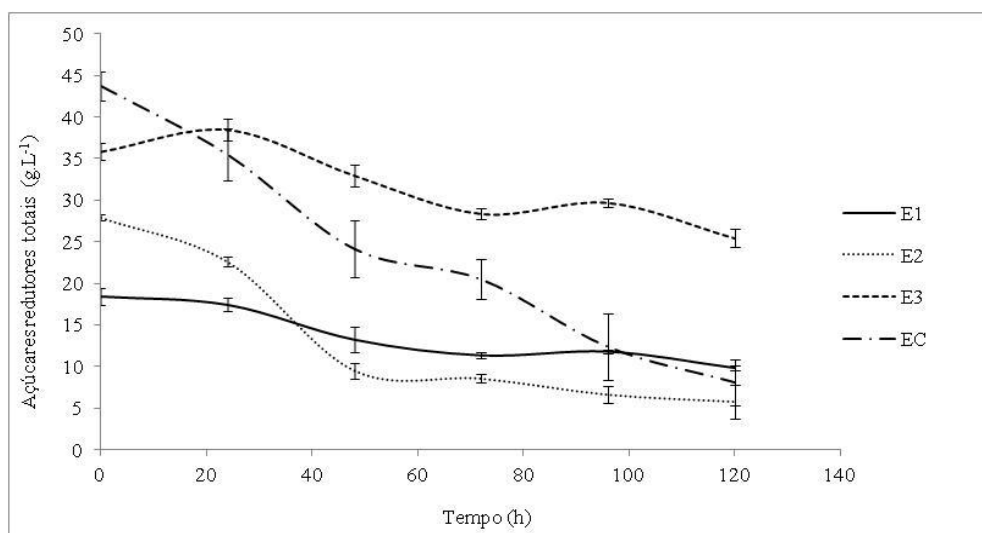


Figura 2 – Consumo de açúcares redutores (g.L^{-1}) durante o cultivo de *R. mucilaginosa* em manipuladora com diferentes concentrações.

Tabela 4 – Coeficientes de rendimento da conversão de açúcares redutores totais em biomassa e lipídios

Experimento	$Y_{X/S}^*$ (g.g ⁻¹)	$Y_{P/S}^*$ (g.g ⁻¹)
E1	0,4674	0,0049
E2	0,3040	0,0011
E3	0,5188	0,0030
Controle	0,2572	0,0036

$Y_{X/S}$ = Coeficiente de rendimento da conversão de açúcares redutores totais em biomassa.

$Y_{P/S}$ = Coeficiente de rendimento da conversão de açúcares redutores totais em lipídios.

* Os coeficientes foram calculados com base no consumo de substrato e na biomassa e lipídios produzidos 120 h após o inóculo. O teor de lipídios no início do cultivo foi desprezado.

Nos experimentos 1 e 3, utilizando-se 50 e 100% de manipueira, ocorreram as menores taxas de consumo de açúcar (apenas cerca de 10 g.L⁻¹ foram consumidos). O cultivo sintético apresentou a maior taxa de consumo, seguido pelo cultivo com o meio composto de 75% de manipueira. O maior uso da fonte de carbono foi responsável pela maior biomassa produzida, assim como a menor taxa de consumo de açúcar originou a menor biomassa produzida. No experimento com 75% de manipueira atingiu-se a menor concentração de açúcares (5,77 g.L⁻¹).

De acordo com Meng et al (2009), durante a fermentação, quando ocorre excesso de carbono, na forma de glicose, em relação a algum nutriente, geralmente sobre o teor de nitrogênio, inicia-se o acúmulo de lipídios nos micro-organismos, a multiplicação celular é impedida, o carbono em excesso é convertido em lipídios e estes são armazenados intracelularmente.

Com relação ao consumo do substrato, o experimento 3 apresentou o melhor coeficiente de rendimento de conversão de açúcares redutores totais em biomassa (0,5188 g.g⁻¹). Já para a produção lipídica, no experimento 1 conseguiu-se o mais eficiente rendimento (0,0049 g.g⁻¹).

Mesmo conseguindo-se produzir as mais elevadas taxas de biomassa e lipídios, os coeficientes de rendimento de conversão da fonte de carbono, no cultivo controle, não foram os melhores. Para a biomassa, no experimento controle obteve-se o menor coeficiente de rendimento entre os 4 experimentos realizados.

Dessa forma, a conversão de uma fonte de carbono originária da manipueira em biomassa e lipídios, mostrou-se mais eficiente do que a oriunda de uma fonte tradicional (sintética).

CONCLUSÃO

A manipueira configura-se como um substrato potencial para o cultivo da levedura *R. mucilaginosa* devido ao rendimento de conversão da fonte de carbono em biomassa e lipídios. Embora esteja um pouco distante de competir com o meio sintético, principalmente nos níveis de acúmulo de lipídios, é possível aumentar as taxas de produção de óleo otimizando-se o processo e, dessa forma, aumentar os níveis de produção de biomassa e lipídios.

REFERÊNCIAS

- AVANCINI, S.R.P.; FACCIN, G.L.; VIEIRA, M.A.; ROVARIS A.A.; PODESTA, R.; BARRIQUELLO, A.L.; VALDUGA, E. (2007). Avaliação de componentes nutricionais de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* crantz). Alimentos e Nutrição, Vol. 20, n.1, p. 107-111.
- BLIGH, E.G.; DYER, J. W. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, Vol. 37, p. 911–917.

- CAPPELLETTI, B. M.; REGINATTO, V.; AMANTE, E. R.; ANTÔNIO, R. V. (2011). Fermentative production of hydrogen from cassava processing wastewater by *Clostridium acetobutylicum*. *Renewable Energy*, Vol. 36, n. 12, p. 3367–3372.
- CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. G. (2005). Aproveitamento do melaço 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.
- DAMASCENO, S.; CEREDA, M. P.; PASTORE, G. M.; OLIVEIRA, J. G. (2003). Production of volatile compounds by *Geotrichum fragrans* using cassava wastewater as substrate. *Process Biochemistry*, Vol. 39, n. 4, p. 411–414.
- FELIPE, F. I.; RIZATO, M.; WANDALSEN, J. V. (2009). Potencial econômico dos resíduos de mandioca provenientes de fecularias no Brasil. 47º Congresso sociedade brasileira de economia administração e sociologia rural, Porto Alegre-RS.
- LI, M.; LIU, G. L.; CHI, Z.; CHI, Z. M. (2010). Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. *Biomass and Bioenergy*, Vol.34, p. 101-107.
- MAKRIS, D. P.; BOSCOU, G.; ANDRIKOPOULOS, N. K. (2007). Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol.20, p.125-132.
- MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. (2001). Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol. 14, p. 93-100.
- MENG, X.; YANG, J.; XU, X.; ZHANG, L.; NIE, Q.; XIAN, M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, Vol. 34, n. 1, p. 1–5.

MILLER, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analitical Chemistry*, Vol.31, p.426 – 428.

NITSCHKE, M., PASTORE, G.M. (2006). Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresource Technology*, Vol. 97, p. 336–341.

POLI, J. S.; DALLÉ, P.; SENTER, L.; MENDES, S.; RAMIREZ, M.; VAINSTEIN, M.; VALENTE, P. (2013). Fatty acid methyl ester produced by oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* QU21: an alternative for vegetable oils. *Revista Brasileira de Biociências*, Vol.11, p. 203–208.

REYNA-MARTÍNEZ, R.; GOMEZ-FLORES, R.; LÓPEZ-CHUKEN, U. J.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, R.; FERNÁNDEZ-DELGADILLO, S.; BALDERAS-RENTERÍA, I. (2014). Lipid production by pure and mixed cultures of *Chlorella pyrenoidosa* and *Rhodotorula mucilaginosa* isolated in Nuevo Leon. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 175, p. 354–359.

SAWANGKEAW, R.; NGAMPRASERTSITH, S. (2013). A review of lipid-based biomasses as feedstocks for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 25, p. 97–108.

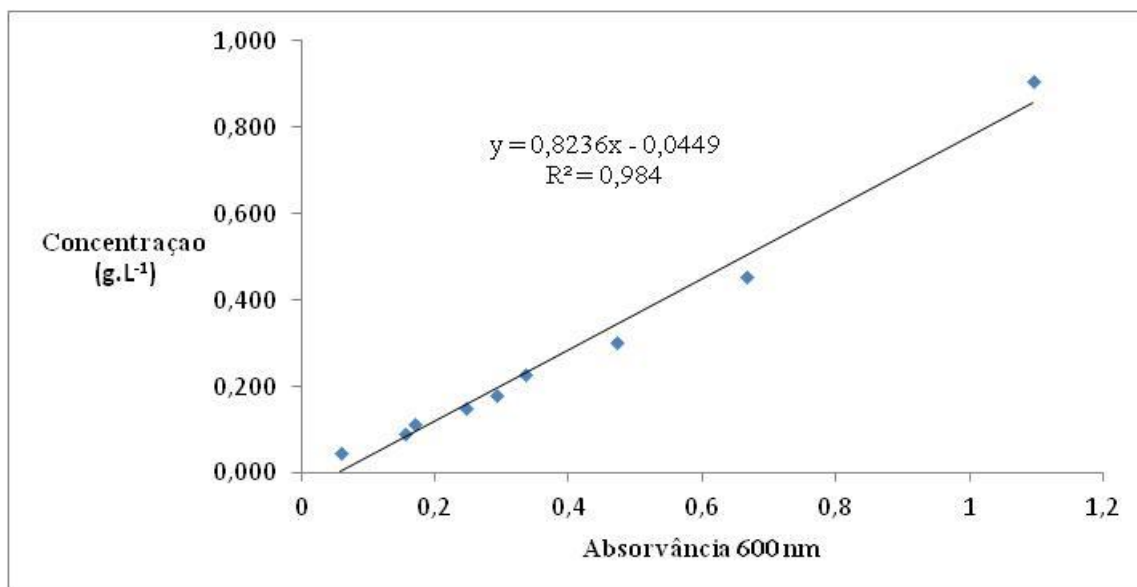
SITEPU, I. R.; GARAY, L. A.; SESTRIC, R.; LEVIN, D.; BLOCK, D. E.; GERMAN, J. B.; BOUNDY-MILLS, K. L. (2014). Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnology Advances*, Vol. 32, p.1336–1360.

AGRADECIMENTOS

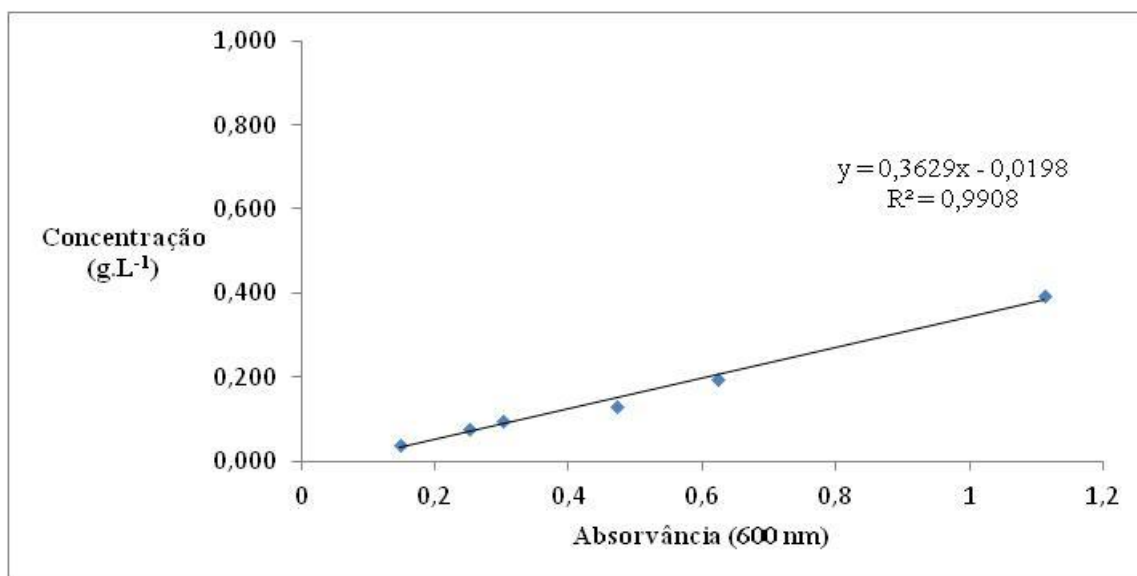
Os autores agradecem ao suporte financeiro do Conselho Nacional de Tecnologia e Desenvolvimento Científico (CNPq) e a Fundação André Tosello pela doação do micro-organismo.

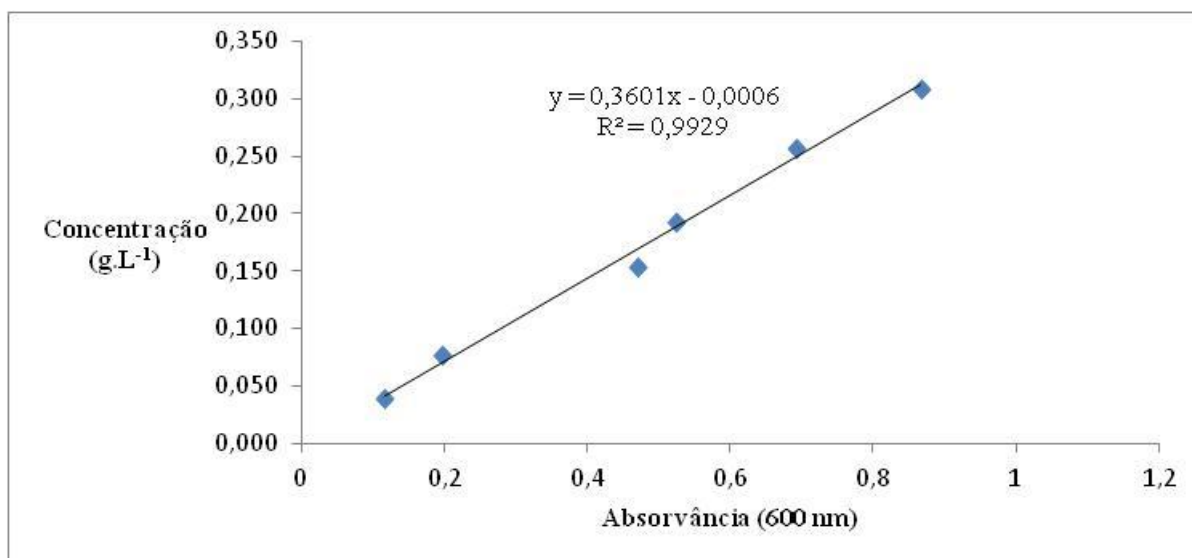
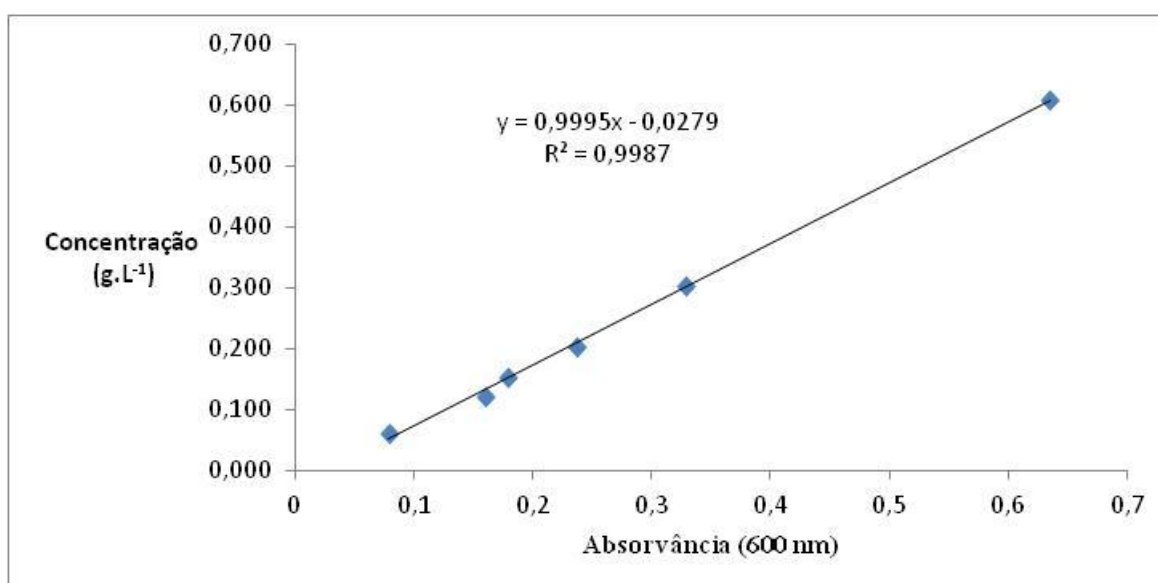
APÊNDICE

APÊNDICE A - Curva padrão da absorvância do experimento 1 A.



APÊNDICE B - Curva padrão da absorvância do experimento 1.



APÊNDICE C - Curva padrão da absorvância do experimento 2.**APÊNDICE D - Curva padrão da absorvância do experimento 3.**

APÊNDICE E - Curva padrão da absorvância do experimento controle (meio sintético).