



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

MARIANA SALES CARVALHO

**Influência no cultivo de *Rhodotorula glutinis* em manipueira para a produção de
suplemento vitamínico e proteico**

João Pessoa – PB
2022

MARIANA SALES CARVALHO

Influência no cultivo de *Rhodotorula glutinis* em Manipueira para a produção de suplemento vitamínico e proteico

Trabalho Final de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Engenharia Química no Departamento de Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira

JOÃO PESSOA – PB
2022

MARIANA SALES CARVALHO

Influência no cultivo de *Rhodotorula glutinis* em manipueira para a produção de suplemento vitamínico e proteico

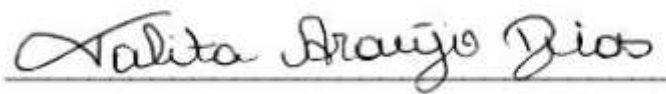
Trabalho Final de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Engenharia Química do Departamento de Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em Engenharia Química, sob a orientação da Profa. Dra. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira.

Aprovada em: 27 de junho de 2022

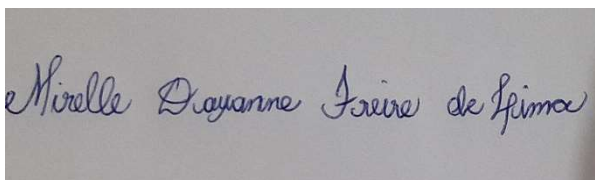
Banca Examinadora



Profa. Dra. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira



Me. Talita Araújo Dias



Eng. Mirelle Dayanne Freire de Lima
(Examinadora)

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C331i Carvalho, Mariana Sales.

Influência no cultivo de *Rhodotorula glutinis* em
manipueira para a produção de suplemento vitamínico e
proteico / Mariana Sales Carvalho. - João Pessoa, 2022.
36f. : il.

Orientação: Andrea Lopes de Oliveira.
TCC (Graduação) - UFPB/CT.

1. Manipueira. 2. Carotenoides. 3. *Rhodotorula*
glutinis. I. Ferreira, Andrea. II. Título.

UFPB/CT/BSCT

CDU 66.01(043.2)

*É preciso que eu suporte duas ou três larvas se quiser
conhecer as borboletas.*

Antoine de Saint-Exupéry

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me guiado até o presente momento nas conquistas, objetivos, desafios e até mesmo nos momentos difíceis.

Agradeço a minha família, especialmente minha mãe Marcilia, minha irmã Julia e minha avó Salete pelo apoio em todos os momentos da minha vida. Agradeço ao meu esposo Jessé Luiz que me acompanhou desde o início da graduação e me apoio em todos os momentos e me fez acreditar que seria capaz de alcançar o que eu não acreditava que iria alcançar.

Agradeço ao meu professor Carlos Bispo, que me deu a primeira oportunidade na universidade e que tanto me ensinou. A professora Sharline pelos ensinamentos, acolhimento e oportunidades e especialmente a minha orientadora Andrea que ao longo da graduação me ensinou não somente sobre engenharia, mas a ser um ser humano melhor todos os dias.

Agradeço também aos meus amigos Netto, Alany, Ailson, Julia, Mirelly e Vinicius pela amizade, paciência e aprendizado aos longos desses anos de graduação.

Agradeço a UFPB por me proporcionar viver esse momento único que é a graduação ao lado de pessoas incríveis.

Obrigado ao laboratório de Bioengenharia e a Débora por me auxiliar e acompanhar ao longo das minhas pesquisas e ao laboratório de produtos fermento destilados que foi a minha primeira casa dentro da universidade.

RESUMO

A manipueira é o resíduo gerado a partir do processo de prensagem da mandioca na produção da farinha. Ela é um líquido que possui em sua composição alto teor de ácido cianídrico, além de açúcares solúveis, o que a torna um substrato rico em fonte de carbono que pode ser utilizado em fermentação submersa para obtenção de biomoléculas como os carotenoides. Carotenoides são pigmentos naturais que podem ser encontrados em alimentos assim como podem ser produzidos por microrganismos como a *Rhodotorula glutinis*. Além disso, os carotenoides não são apenas pigmentos naturais, apresentam função de pró vitamina A responsável na prevenção de doenças degenerativas. Como forma de compreender a influência da concentração do substrato no desenvolvimento da *R. glutinis*, cultivos foram feitos variando as concentrações de manipueira em 25%, 50%, 75% e 100%. O pH de cada cultivo foi corrigido para 7 utilizando solução de NaOH 2% e a fermentação foi levada pelo período de 48 horas, onde foram retiradas amostras para determinação de açúcares redutores bem como para análise de crescimento de biomassa. Obtendo o comportamento do crescimento da biomassa pelo consumo de substrato foi possível obter dados cinéticos para cada experimento como o fator de conversão de substrato em células e a velocidade específica máxima para cada um deles.

Palavras-chave: Manipueira. Carotenoides. *Rhodotorula glutinis*.

ABSTRACT

Cassava wastewater is the residue generated from process of pressing cassava in the production of cassava flour. It is a liquid that has a high content of hydrocyanic acid in its composition. In addition, cassava wastewater has soluble sugars, which makes it a rich substrate in carbon source. However, cassava wastewater can be used for submerged fermentation to obtain biomolecules such as carotenoids. Carotenoids are natural pigments that can be found in foods as well as produced by microorganisms such as *Rhodotorula glutinis*. However, carotenoids are not only natural pigments, they also present pro-vitamin A activity which is responsible for preventing degenerative diseases. In order to understand the influence of substrate concentration on the development of *R. glutinis*, cultures were performed varying initial concentrations of cassava wastewater at 25%, 50%, 75% and 100%. The pH of each culture was corrected to 7 using 2% NaOH solution and fermentation was carried out for a period of 48 hours, where samples were taken for determination of reducing sugars as well as for analysis of biomass growth. Obtaining the behavior of biomass growth by substrate consumption, it was possible to obtain kinetic data for each experiment, such as the substrate conversion factor in cells and the maximum specific velocity for each one of them.

Keyword: Cassava wastewater. Carotenes. *Rhodotorula glutinis*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1	PRODUÇÃO DE MANDIOCA O BRASIL E NO MUNDO	14
3.2	MANIPUEIRA E SUAS CARACTERÍSTICAS	15
3.3	APLICAÇÕES DA MANIPUEIRA.....	17
3.4	CAROTENOIDES	18
3.5	CULTIVO SUBMERSO	18
4	MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1	PROTEÍNAS TOTAIS	20
4.2	DETERMINAÇÃO DE UMIDADE	21
4.3	DETERMINAÇÃO DE CINZAS	21
4.4	DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES	21
4.5	DETERMINAÇÃO DO PH	22
4.6	DETERMINAÇÃO DOS SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS (°BRIX)	23
4.7	MICROORGANISMO E MEIO DE CULTURA.....	23
4.8	PREPARAÇÃO DO INÓCULO	23
4.9	FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	24
4.10	CÁLCULO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS: VELOCIDADE ESPECÍFICA MÁXIMA DE CRESCIMENTO ($\mu_{\text{máx}}$) E FATOR DE CONVERSÃO DE SUBSTRATO EM CÉLULAS (YX/S)	24
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1	ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DA MANIPUEIRA.....	26
5.2	INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE MANIPUEIRA NOS CULTIVOS	27
5.3	PARÂMETROS CINÉTICOS DO CULTIVO DE R. GLUTINIS COM MANIPUEIRA	32
6	CONCLUSÃO.....	34
	REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

No Brasil foram produzidos cerca de 20 milhões toneladas de mandioca (Figura 1) no ano de 2017, sendo a região nordeste a maior produtora do tubérculo com cerca de 25% da produção no mesmo ano (EMBRAPA, 2018). A região nordeste possui como seu principal produtor o estado da Bahia, que produziu 10% da produção nacional, isso faz com que a Bahia fique em 3º lugar no *raking* nacional.

Figura 1 – Mandioca in natura



Fonte: Safra viva (2022).

A mandioca pode ser consumida *in natura* ou após o beneficiamento, que resulta em fécula e farinha. Do processo de beneficiamento da mandioca (*Manihot esculenta*) obtém-se dois tipos de resíduos, o resíduo sólido composto por porções fibrosas que ficam retidas na peneira assim como o bagaço, e a parte líquida que é formada pela água residual do processo de prensagem e lavagem que é conhecida como manipueira (Figura 2). Essa é produzida em torno de 267 a 419 litros por tonelada de mandioca que é processada para obtenção de sua farinha ou fécula (BARRETO et al, 2014; PINTO et al, 2010).

Figura 2 – Manipueira



Fonte: EMBRAPA, 2015.

O resíduo líquido oriundo do processamento da mandioca é composto por açúcares solúveis e por glicosídeo cianogênico (linamarina), além disso, possui uma carga orgânica elevada. A presença de linamarina acarreta toxicidade significativa (RÊGO et al, 2019). Por esse motivo, esse líquido é danoso a natureza e em um processo de descarte inapropriado pode acarretar problemas ambientais, como, risco de morte de animais, de rios e lagos e improdutividade do solo. Porém, esse resíduo pode ser aplicado de diversas formas, pois possui elevada concentração de açúcares e nutrientes. Essas características físico-químicas favorecem os mais diversos usos desse efluente. Algumas de suas utilizações estão em aplicações em plantaçoão como adubo ou como pesticida para pragas de algumas culturas, como na seriguela (EMBRAPA, 2001).

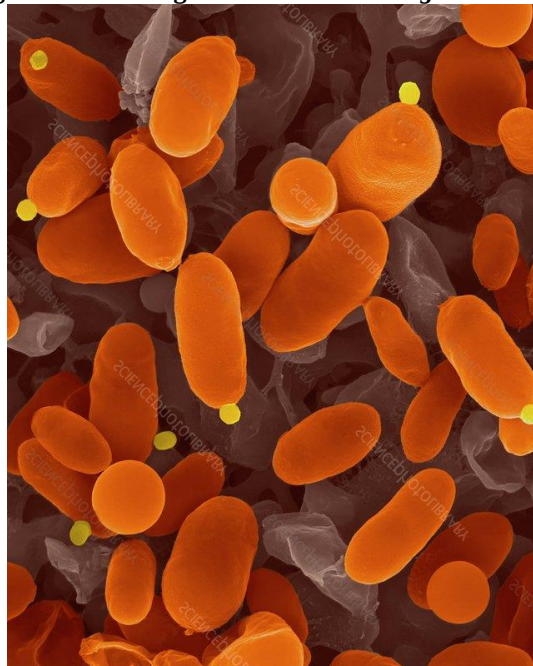
Outra forma de uso desse material é utilizar os açúcares para processos fermentativos. Utilizando o resíduo como fonte de cultivo para fungos, bactérias ou leveduras e processos fermentativos do tipo submerso, com a intenção de produção de biomolécula de interesse industrial. Uma forma de utilizar esse efluente como fonte de carbono em processos biotecnológicos é a produção de carotenoides.

Os carotenoides são pigmentos naturais responsáveis pelas colorações vermelho, laranja e amarela presentes em vegetais, peixes e óleos. Os carotenoides mais conhecidos são: a-

caroteno, licopeno, zeaxantina, luteína, beta-caroteno e beta-criptoxantina. Os carotenos, no organismo humano são sintetizados em vitamina A. Essa vitamina tem importância principalmente na formação da retina, no crescimento, reprodução e proliferação celular e no sistema imunológico.

Como mencionado anteriormente, esses pigmentos são encontrados em alimentos de origem vegetal e animal, porém eles podem ser sintetizados por microrganismos, como *Rhodotorula glutinis* (Figura 3) (KOT et al, 2017; VALDUGA et al, 2009).

Figura 3 – Microrganismo *Rhodotorula glutinis*



Fonte: Science photo library (2020).

Os carotenoides podem ser utilizados como opção de substituição de corantes na indústria alimentícia, assim como são amplamente usados na indústria farmacêutica devido as suas propriedades de prevenção de doenças degenerativas e do câncer. Além disso os carotenoides são conhecidos como precursores de vitamina A (MESQUITA et al, 2017; UENOJO et al, 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a influência das condições de cultivo submerso para produção de carotenoides usando manipueira como fonte de carbono, utilizando o microrganismo *Rhodotorula glutinis* ATCC 28052.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar o efeito da concentração de substrato (manipueira) no cultivo submerso de *Rhodotorula glutinis* para produção de carotenoides;
- Determinar parâmetros cinéticos tais como, velocidade específica de crescimento e conversão de substrato em célula ($Y_{x/s}$);
- Determinar melhores concentrações de forma a maximizar rendimento e produtividade na produção de carotenoide.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

Nesse tópico será tratado a produção mundial e nacional de mandioca no Brasil e no mundo bem como as características do seu subproduto a manipueira e suas possíveis aplicações.

3.1 PRODUÇÃO DE MANDIOCA O BRASIL E NO MUNDO

De acordo com FELIPE et al (2010) a mandioca foi produzida em mais de 100 países no ano de 2008. Esse grande alcance é possível tendo em vista de que a cultura é rústica e há facilidade em aplicações, que vão desde alimentação humana a insumos na indústria química.

Dentre os maiores produtores do tubérculo, destacam-se os países Tailândia e Indonésia. Esses países representaram 58% de todo continente asiático. Na Ásia ano de 2017 foram produzidos 85,7 milhões de toneladas de mandioca, onde sua principal destinação seria para exportação em forma de fécula e de “*pellets*”, onde, seus principais destinos de envio são a União Europeia e China.

Outro destaque na produção de mandioca se encontra no continente africano. A Nigéria produz altos volumes de mandioca principalmente para cultura de subsistência, ou seja, o tubérculo é produzido para o consumo humano, é gerado em propriedades pequenas e com pouca tecnologia. No ano de 2017, o país foi responsável por produzir 59,4 milhões de toneladas que representou 38% da produção do continente e 20% da produção mundial (SEAB, 2020).

A América do Sul também é um continente de destaque com relação a produção de mandioca. O continente liderou a produção mundial da mandioca até a década de 1970, com uma maior relevância para o Brasil. Após esse período, houve uma queda bruta na produção do país devido a substituição da matéria na ração animal, escassez de mão de obra devido a exploração de outros produtos, como algodão e soja. Nos últimos 4 anos houve um crescimento na demanda da mandioca, principalmente pelo seu beneficiamento em forma de tapioca.

O país produz a mandioca em toda as regiões, em maiores ou menores proporções. A região que mais produziu mandioca no país no ano de 2017, foi a região norte com 36,1% da produção nacional, seguida da região nordeste que foi responsável por 25,1% no mesmo período. A região sul, segue em 3º lugar com aproximadamente 22% da produção nacional.

Analisando a produção de mandioca por estados, no ano de 2017, o maior produtor de mandioca é o estado do Pará que possui mais de 125 mil hectares de áreas destinada a essa cultura, seguida do Paraná com mais de 3 milhões de toneladas do tubérculo e em 3ª posição o

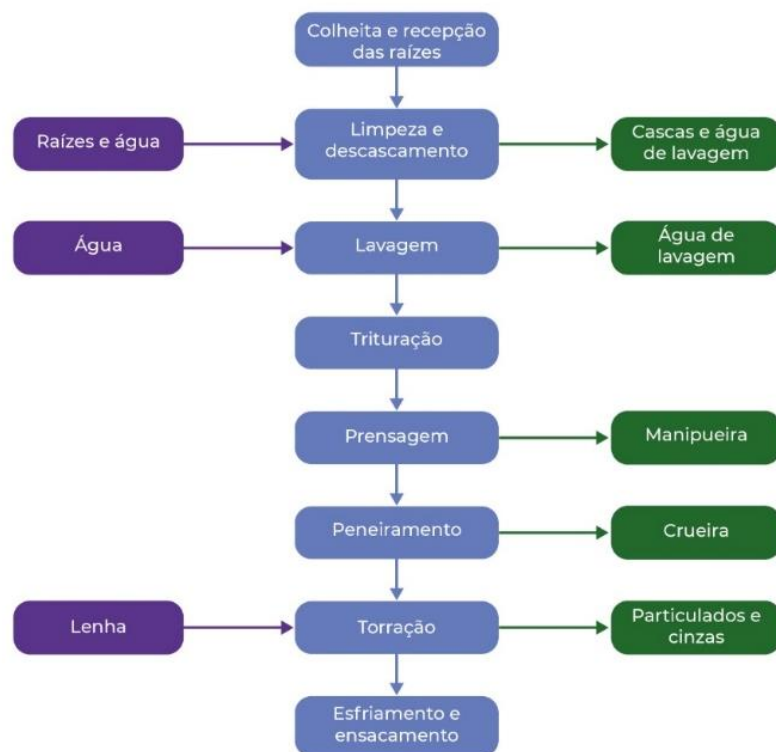
estado da Bahia com 192 mil hectares de áreas destinado ao plantio da mandioca e com uma produção anual de mais de 2 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2018).

A mandioca no Brasil é principalmente na região nordeste é utilizada para consumo *in natura*. Quando analisado o estado da Bahia, a sua região sudoeste é responsável por 10% da produção, principalmente para o município de Vitória da Conquista. O estado cultiva principalmente para agricultura familiar para o consumo *in natura* e venda de comida típicas para o turismo. Outra forma de comercialização da mandioca é seu beneficiamento em forma de farinha e fécula, principalmente para exportação como forma substituta da principal fonte de amido oriunda do milho (EMBRAPA, 2016) (CARVALHO et al, 2009).

3.2 MANIPUEIRA E SUAS CARACTERÍSTICAS

O processo de beneficiamento da mandioca é realizado conforme a Figura 4 que descreve esse processo em forma de fluxograma.

Figura 4 – Fluxograma do beneficiamento da mandioca



Fonte: Autor, 2022

Do processo de beneficiamento da mandioca são obtidos dois tipos de resíduos, o líquido e o sólido, além das emissões atmosféricas provenientes da queima de lenha no processo

de torração. O resíduo sólido é composto pela parte lenhosa das raízes e de porções fibrosas que ficam retidas no processo de peneiramento. Do processo de prensagem e lavagem do material para obtenção de farinha ou fécula, é obtido um resíduo líquido. O descarte líquido dessas etapas do processo chamamos de manipueira (BARRETO, 2014).

A manipueira possui aspecto de um líquido leitoso, amarelo-claro com uma alta carga orgânica e nutrientes minerais. Outra característica desse resíduo é a alta concentração de linamarina que é altamente solúvel em água. A linamarina é um glicosídeo cianogênico que quando hidrolisado se transforma em ácido cianídrico.

O processo de descarte da manipueira pode gerar vários impactos ambientais devido a sua elevada demanda de oxigênio (DBO) e a presença de compostos cianogênicos, que caracteriza o efluente como tóxico (MELO, 2014). Na Tabela 1 pode-se observar a composição média da manipueira.

Tabela 1 - Composição média da manipueira.

Variáveis	CEREDA (1994)	FERNANDES JR (1995)	BARANA (1995)	BARANA (2000)
Sólidos totais	6,28	6,00	4,51	5,54
Sólidos voláteis (% MS)	5,23	5,40	3,83	4,76
DQO (g/L)	63,0	69,3	60,0	62,3
Cianetos totais (mg/L)	444,00	206,83	140,7	112,2
Nitrogênio (mg/L)	4,900	2,000	3,000	1,242
Carbono (mg/L)	37,000	35,000	35,000	12,330
Fósforo (mg/L)	160	250	300	365
Potássio (mg/L)	1,863	2,810	3,800	1,972
Cálcio (mg/L)	227	200	400	838
Enxofre (mg/L)	195	78	200	60
Magnésio (mg/L)	405	290	600	326
Ferro (mg/L)	15,3	7,0	6,4	12,4
Cobre (mg/L)	1,1	1,2	1,4	3,1
Zinco (mg/L)	4,0	3,0	5,0	32,5
Manganês (mg/L)	3,7	3,3	3,5	2,2

Fonte: Autor, 2022.

As casas de farinha, onde ocorrem o processamento da mandioca, podem ser causadores de grandes impactos ambientais no que se refere ao descarte do resíduo líquido do

beneficiamento. São gerados cerca de 217 L à 419 L de manipueira por tonelada de mandioca (MELO, 2014). A manipueira, por apresentar alto teor de carbono (açúcares), atraem animais para seu consumo e isso gera a morte da fauna ao redor dos produtores de farinha. Os impactos também ocorrem quando há descarte em leitos de rios e lagos, que, por possuir uma grande carga de DBO que possibilitam o desenvolvimento de microrganismos anaeróbios facultativo que consomem o oxigênio gerando a morte dos peixes e outros animais.

Os impactos do descarte inadequado desse material resultam também na degradação do solo, pois, acaba gerando improdutividade (OLIVEIRA, 2013). Esse é o maior desafio dos produtores e casas de beneficiamento da raiz, o seu descarte de forma correta e que cumpram as leis ambientais. E o desafio desse mercado se torna maior quando se trata da utilização desse resíduo em aplicações e gerações de recurso financeiro.

3.3 APLICAÇÕES DA MANIPUEIRA

Devido a problemática ambiental, vem sendo estudado várias formas de aproveitamento seguro da manipueira. Hoje, é possível avaliar a utilização desse resíduo em diversas aplicações, principalmente no agronegócio, como por exemplo, em adubação de algumas culturas. Essa forma de reaproveitamento é possível devido suas concentrações de potássio, nitrogênio, fósforo, cálcio, magnésio, enxofre e outros micronutrientes presentes (BARRETO et al, 2013).

Ainda no que se refere ao agronegócio, a manipueira vem sendo amplamente estudada como opção de pesticida. Inicialmente foi testada como alternativa contra nematoides das galhas e se mostrou eficiente como um fungicida. Hoje é possível avaliar seu poder de pesticida em outros tipos de pragas, como no combate do oídio da seriguelira (EMBRAPA, 2001).

Seguindo com outras formas de reaproveitamento, é possível utilizar a manipueira como material fermentativo para produção de biogás. Essa é uma possibilidade devido a sua alta concentração de açúcares disponíveis no meio. Para esse tipo de reaproveitamento é indicado um tipo de biodigestor de duas fases e essa técnica pode ser amplamente aplicada e em grande escala para tratamento desse efluente, além de gerar combustível que pode ser aproveitado no processo de obtenção da farinha.

Devido as suas características físico-químicas já mencionadas, a manipueira pode ser amplamente aplicada nas mais diversas áreas, principalmente na biotecnologia para obtenção de biomolécula, onde é possível utilizar as fontes de carbono como açúcares fermentáveis e suas concentrações de micronutrientes diminuindo os custos de obtenção de meio propício

econômico e ainda como forma de tratamento desse efluente. As biomoléculas são utilizadas nas mais diversas indústrias, como na farmacêutica e alimentícia. As suas principais forma são as enzimas, corantes e/ou vitaminas.

3.4 CAROTENOIDES

O nome carotenoide é oriundo do nome científico da cenoura (*Daucus carote*) que foi determinado por Wackenroder (1931) como a primeira fonte de caroteno. Atualmente temos conhecimento de cerca de 600 carotenoides que são classificados em sete grupos estruturais e que possuem várias formas isoméricas (MORAIS, 2006).

Os carotenoides são pigmentos lipossolúveis, amarelo, laranjas e vermelho, presentes em frutas e vegetais. Nas plantas, esses pigmentos se encontram em organelas subcelulares (cloroplastos e cromoplastos). Nessas organelas subcelulares encontram-se também proteínas e por isso sua coloração é mascarada devido à grande concentração de outros pigmentos que atuam como fotoprotetores. Já no cromoplastos eles se encontram na forma cristalina ou como gotícula de óleo (SILVA et al, 2010).

Os alimentos de origem vegetal, como fruta e legumes, apresentam uma vasta variedade de carotenoides, como o tomate (licopeno), milho (luteína e zeaxantina), cenouras (alfa e beta caroteno). Algumas dessas forma apresentam uma estrutura cíclica que chamamos de b-ionona e essas por sua vez, são precursores de vitamina A como por exemplo o α -caroteno, β -caroteno e γ -caroteno e β -criptoxantina. Porém, a função dos carotenoides vai além de um simples pigmento. São molécula que apresentam funções no combate a radicais livres, apresentando, portanto, ação protetora contra o câncer. Além disso, algumas formas de carotenoides, cerca de 50 dos 600 já conhecidos, são precursores da vitamina A.

A vitamina A possui como função a formação de pigmentos fotossensíveis da retina (rodopsina), crescimento, reprodução, proliferação celular, diferenciação celular e integridade do sistema imune (WEIL, 2000). Importante ressaltar que essa vitamina sofre degradação pela ação da luz, oxigênio e altas temperaturas

3.5 CULTIVO SUBMERSO

A fermentação está presente na história da humanidade desde os primórdios, principalmente no processamento de alimentos. Atualmente a fermentação vem sendo bastante explorada para produção de biomoléculas de interesse industrial como as enzimas. Essa

atividade abre caminho para utilização de resíduos como fonte de carbono e nutriente para processos fermentativos utilizando microrganismos para obtenção de biomoléculas (PANDEY, 2003)

Os processos fermentativos se dividem em dois, fermentação sólida e fermentação submersa. A fermentação sólida ocorre quando existe uma matriz sólida envolvida por microrganismos e não há água livre no meio. Vemos exemplos desse tipo de fermentação quando se utiliza madeira, palha ou resíduos agroindustriais para cultivar fungos filamentosos. Alguma das vantagens desse tipo de fermentação é a ausência de espuma durante o processo, maior controle de contaminação e redução de custos (ORNELA, 2022).

A fermentação submersa ocorre quando há grande quantidade de água livre no meio, cerca de 95%. Esse tipo de fermentação possui grandes vantagens quando comparada ao cultivo em meio sólido, já que, é possível realizar um maior controle dos parâmetros como pH, temperatura, concentração de molécula solúvel em água, aeração. Outra vantagem é a separação da biomassa ao final do processo. Por esses motivos, esse é o tipo de fermentação mais utilizada nos processos industriais (MAGANHOTO, 2020).

O processo fermentativo em meio líquido possibilita utilizar resíduos agroindustriais para obtenção de biomoléculas, como a manipueira, dessa forma pode-se gerar valor agregado a um resíduo que quando descartado de forma errônea pode gerar grandes impactos ambientais e sociais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PROTEÍNAS TOTAIS

Para determinação de proteínas totais, seguiu-se metodologia apresentada em Instituto Adolfo Lutz (2008). Inicialmente, pesou-se 0,5 grama da amostra em papel livre de nitrogênio (manteiga ou seda), e transferiu-se para o tubo de digestão Kjeldahl. Em seguida, adicionou-se de 0,5 g de mistura catalítica e 10 ml de ácido sulfúrico concentrado, então acoplou-se ao sistema de digestão.

A digestão é conduzida até a solução tornar-se incolor ou levemente azulada. Para o ensaio em branco, o mesmo procedimento foi realizado, porém sem adição de amostra. Espera-se esfriar as amostras e o ensaio em branco até temperatura ambiente e lava-se com 5mL de água destilada as paredes do tubo e adiciona-se 4 gotas de fenolftaleína. O tubo foi então acoplado ao destilador de Kjeldahl. Foi adicionada uma solução de NaOH 30%, até atingir pH alcalino.

Na titulação, usou-se uma solução de HCl 0,1N padronizado para titular a solução do Erlenmeyer, até aparecimento de coloração rósea. Um ensaio em branco utilizando na digestão o papel de pesagem e demais reagentes, idêntico ao utilizado na amostra, acompanhou a análise. Os cálculos de quantificação de proteínas totais foram realizados seguindo a Eq. (1).

$$Proteínastotais em \frac{g}{100} = (VA - VB) \times fa \times F \times \frac{0,14}{P} \quad (1)$$

Em que:

VA é o volume de ácido clorídrico 0,1N padronizado gasto na titulação da amostra;

VB é o volume de ácido clorídrico 0,1N padronizado gasto na titulação do branco;

fa é o fator de correção da solução de ácido clorídrico 0,1N;

F é o fator de correspondência nitrogênio-proteína e

P é a massa da amostra em gramas.

Um ensaio em branco (referência) utilizando na digestão o papel de pesagem e demais reagentes, idêntico ao utilizado na amostra, acompanhou a análise. Os cálculos de quantificação de proteínas totais foram realizados seguindo a Eq. (1).

4.2 DETERMINAÇÃO DE UMIDADE

A determinação da umidade foi realizada pela técnica de aquecimento direto. Primeiramente, tomou-se uma cápsula de porcelana que havia passado 1 hora em estufa a 105°C, o seu resfriamento foi realizado em dessecador até temperatura ambiente. Após isto, foram pesadas 2 g de amostra nesta cápsula, e levou-se a banho-maria para que a água em excesso evaporasse. Por fim, levou-se a amostra sem excesso de água à estufa por 24h a 105°C, e, assim como anteriormente, foi levado ao dessecador até a temperatura ambiente. Em seguida foi pesando a cápsula tarada mais amostra sem líquidos voláteis. Para o cálculo da umidade foi utilizada a Eq. (2).

$$\%Umidade = \frac{(P_1 - P_2)}{(P_1 - P_0)} \times 100 \quad (2)$$

Em que:

P_1 é o peso da cápsula mais a amostra úmida;

P_2 é o peso da cápsula mais a amostra seca e

P_0 é o peso da cápsula.

4.3 DETERMINAÇÃO DE CINZAS

Primeiramente, tomou-se uma cápsula de porcelana que havia passado 1 hora em estufa a 105°C. Após o tempo, a cápsula foi evada ao dessecador até que atingisse a temperatura ambiente e em seguida foi realizada a pesagem. Após isto, foram pesadas 5 g de amostra nesta cápsula, e levou-se a banho-maria para que a água em excesso evaporasse. Então, carbonizou-se a amostra em bico de Bunsen e incinerou na mufla na temperatura de 550°C por 3 horas período esse em que o resíduo apresentou coloração branca ou cinza claro. Para o cálculo das cinzas foi utilizada a Eq. (3).

$$\%Cinzas = \frac{P_2 - P_1}{P} \times 100 \quad (3)$$

Em que:

P_2 é o peso da cápsula mais as cinzas;

P_1 é o peso da cápsula (tara) e

P é o número de grama da amostra.

4.4 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

Para a análise de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) presentes no substrato, utilizou-se a metodologia do ácido 3,5-dinitrosalicílico, segundo MILLER (1959).

Para as análises de açúcares redutores, foi utilizada a mesma quantidade de amostra e de DNS, 0,5 mL de cada. Em seguida foi adicionada a banho-maria a 100°C por 5 minutos, diluída com 9 mL de água destilada, em seguida foi colocado em banho de gelo para interromper a reação. Após isso, foi agitado e a leitura foi realizada em espectrofotômetro.

Para as análises de açúcares redutores totais foram adicionados 1 mL de amostra e de HCL 2M e adicionado em banho-maria a 100°C por 5 minutos e adiciona, em seguida adicionar 3mL de NaOH 1M. Desse processo é retirado 0,5 mL e adiciona 0,5 mL de DNS e repetir o mesmo procedimento para a determinação de AR.

Foram realizados ensaios em duplicata do material bruto assim como para as amostras retiradas durante o processo fermentativo. As amostras de açúcares redutores e açúcares redutores totais foram levadas a espectrofotômetro, em que se realizou as leituras das absorbâncias em 540nm. O cálculo das concentrações de açúcares partiu de uma curva de calibração feita com uma solução padrão de glicose, que gerou uma reta que relaciona a absorbância com a concentração de açúcares.

4.5 DETERMINAÇÃO DO PH

Para análise do pH do substrato, utilizou-se pHmetro digital previamente calibrado com soluções tampão 4 e 7.

4.6 DETERMINAÇÃO DOS SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS (°BRIX)

Para determinação dos sólidos solúveis totais, utilizou-se um refratômetro de bancada tipo ABBE, para leitura do grau °Brix do substrato. A quantidade de sólidos solúveis é o total de todos os sólidos dissolvidos em água (açúcar, sal, proteínas, ácidos, etc.) e o valor medido é a soma de todos eles.

O procedimento consistiu em colocar uma quantidade pequena de amostra no prisma do refratômetro, em seguida observando-se a fronteira claro-escuro, ajustando o dispositivo que

compensa a dispersão da luz no líquido de maneira que a fronteira saísse de colorida para uma linha de contornos bem definidos.

4.7 MICRORGANISMO E MEIO DE CULTURA

Utilizou-se levedura *Rhodotorula glutinis* ATCC 28052, obtida da Fundação André Tosello (Campinas, SP, Brasil). Para sua manutenção, foi utilizado meio YMA (Yeast Malt Extract Agar), de seguinte composição:

3 g/L de extrato de levedura;
3 g/L de extrato de malte;
5 g/L de peptona;
10 g/L de glicose e
20 g/L de ágar.

Placas de Petri contendo meio YMA foram esterilizadas em autoclave na temperatura 120°C por 15 minutos e a pressão de 1 atm. Então, o meio foi transferido para as placas. Com uma alça de plástico estéril, transferiram-se as leveduras para as placas com o meio de manutenção e, em seguida, incubou-se por 72 h a 25°C, para que houvesse o crescimento das leveduras. O estoque dos microrganismos foi feito em geladeira, na temperatura 4°C, realizando repiques para manutenção das leveduras.

4.8 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Foi feito 100mL de meio YM (Yeast Malt Agar) contendo as seguintes quantidades.

3 g/L de extrato de levedura;
3 g/L de extrato de malte;
5 g/L de peptona e
10 g/L de glicose.

Em seguida, o Erlenmeyer foi esterilizado em autoclave por 15 min, 120°C e 1 atm. Colocaram-se cinco alçadas da levedura estocada no meio e então os Erlenmeyers foram

incubados a 180 rpm e 25°C onde a leitura de absorbância obtida próxima a 0,1 em um comprimento de onda de 650 nm.

4.9 FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Para fermentação submersa, utilizou-se como meio de cultivo a manipueira nas concentrações de 100%, 75%, 50% e 25% v/v, onde, o pH dos meios foram corrigidos para 7 utilizando solução de Hidróxido de sódio (NaOH) 2%. Os meios foram previamente esterilizados e adicionou-se 1 mL do inóculo. Os cultivos foram levados a incubadora nas condições de agitação de 180 rpm e temperatura de 25°C. Nos tempos pré-determinados foram retiradas amostras de 3 mL de cada experimento para análise de crescimento de biomassa utilizando os métodos de turbidimetria em espectrofotômetro (600nm), massa seca e determinação de açúcares redutores e açúcares redutores totais pelo método de DNS segundo MILLER (1959).

4.10 CÁLCULO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS: VELOCIDADE ESPECÍFICA MÁXIMA DE CRESCIMENTO ($\mu_{máx}$) E FATOR DE CONVERSÃO DE SUBSTRATO EM CÉLULAS ($Y_{X/S}$)

Para o cálculo da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$), primeiramente, identificou-se a fase exponencial de crescimento do microrganismo no meio, sendo ela definida pelo aumento mais acentuado da biomassa naquele cultivo, em que a concentração de células praticamente dobra de um ponto para outro.

Já para definir o fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$), fez-se uso da Eq. (5), combinada a os dados de concentração de biomassa e de substrato:

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (5)$$

Em que:

X é a concentração máxima de biomassa, em um determinado tempo de cultivo, sendo próprio para cada fermentação;

X_0 é a concentração inicial de células;

S é a concentração de substrato no mesmo tempo em que se tem a concentração máxima de biomassa e

S_0 é a concentração inicial de substrato.

Após isto, foi feito um gráfico do logaritmo neperiano dessas concentrações *versus* tempo, o que fornece uma curva de equação do tipo $y = ax + b$, sendo o coeficiente angular da reta o $\mu_{máx}$ (em h^{-1}).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DA MANIPUEIRA

A Tabela 2 apresenta os resultados físico-químicos da manipueira utilizada no trabalho.

Tabela 2 – Resultados das análises físico-químicas da manipueira.

Parâmetro observado	Resultado
Açúcares redutores (AR)	13,07 ± 0,48 (g/L)
Açúcares redutores totais (ART)	14,1 ± 0,0 (g/L)
Umidade	94,03 ± 0,13 (%)
Cinzas	0,56 ± 0,064(%)
Proteínas totais	1,70 ± 0,03 (%)
pH	3,78
Sólidos solúveis totais	7,50 (°Brix)

Fonte: Autor, 2022.

A composição da manipueira pode variar devido a fatores com clima, solo, tipo da mandioca entre outros, entretanto as características são importantes para a determinação de sua utilização (SCHMIDT, 2022). Os resultados dispostos na Tabela 2 indicam que os açúcares redutores totais presentes no material são de 14,1 g/L, segundo SCHMIDT (2022), os principais açúcares presentes da manipueira são sacarose, glucose e frutose. A maior concentração é a de sacarose que é um açúcar simples que é determinado pelo método de AR, e os outros açúcares são de cadeias mais longas e que é possível determinar como a diferença entre o ART e o AR. Esses açúcares são utilizados para crescimento e manutenção do microrganismo e produção de carotenoide. Assim como o nitrogênio é utilizado para desenvolvimento da *R. glutinnis*. O nitrogênio presente na manipueira utilizada nesse trabalho encontra-se na forma de proteína e apresenta o valor de 1,70% do material total.

O material apresentou em sua composição cerca de 0,5% de cinzas. As cinzas são os micronutrientes como potássio, fósforo, cálcio que estão presentes no substrato. Os minerais são utilizados para o desenvolvimento do microrganismo no meio.

Outro fator que pode ser determinado nas análises realizadas é a quantidade de sólidos solúveis que na manipueira. Os sólidos totais foram determinados pela análise de °Brix que

determina os sólidos que são solúveis em água como os açúcares e minerais. A manipueira utilizada nesse trabalho apresentou o valor de 7,50 °Brix que corrobora com os dados anteriormente, a concentração de açúcares e minerais.

Outra característica obtida é o pH que o material se encontra que é de 3,78, caracterizando o material como ácido. O baixo pH é produzido pela presença de uma concentração elevada de ácido cianídrico. A caracterização de SCHMIDT foi obtida o pH de 5,8 se encontrando na faixa ácida. A diferença ocorre devido às condições ambientais, conforme citado anteriormente nessa seção.

Para que fosse possível o desenvolvimento do microrganismo, o pH foi corrigido para 7,0 utilizando solução de hidróxido de sódio (NaOH) 2%. Os outros parâmetros foram mantidos sem a necessidade de correção ou suplementação. Dessa forma, pode-se considerar o resíduo econômico para obtenção de biomoléculas como os carotenoides.

5.2 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE MANIPUEIRA NOS CULTIVOS

Nesse trabalho foram feitos experimentos variando a concentração de manipueira. As concentrações iniciais da manipueira para o processo fermentativo foram de 25%, 50% 75% e 100% (Figura 5).

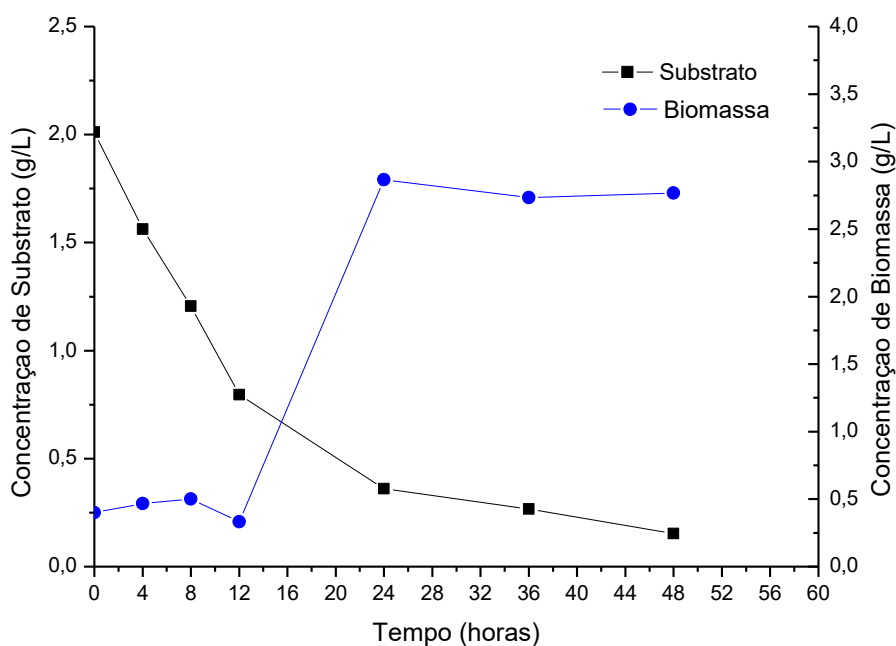
Figura 5 – Cultivo de *R. glutinnis* variando a concentração da manipueira



Fonte: Autor, 2022.

A Figura 6 apresenta o comportamento de crescimento da levedura, ou seja, concentração de biomassa, utilizando a concentração de 25% do substrato.

Figura 6 – Comportamento do crescimento de *R. glutinis* versus concentração de substrato em cultivo contendo 25% de manipueira

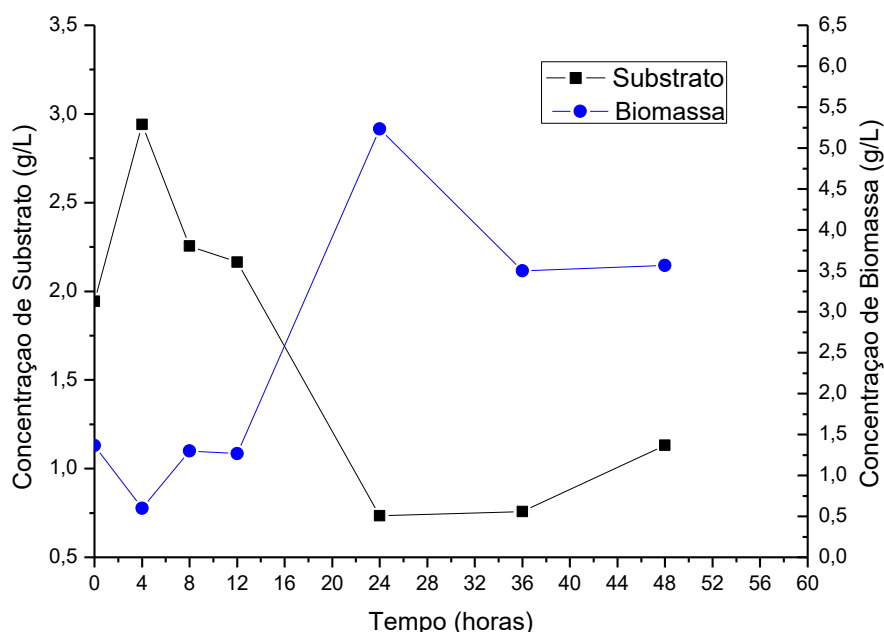


Fonte: Autor, 2022.

O comportamento da *R. glutinis* no cultivo contendo 25% de manipueira possuía inicialmente a concentração de açúcares redutores no valor de 2,01 g/L. Ao longo do processo fermentativo pôde-se observar que o comportamento da curva de concentração de substrato decaí, chegando ao valor de 0,15 g/L ao final de 48h. A concentração de açúcar diminui, pois, o microrganismo consome, inicialmente para sua manutenção e em seguida para se multiplicar.

O comportamento da curva de concentração de biomassa nas primeiras 12 horas de fermentação não é possível observar um crescimento acentuado, isso pode ser ocasionado devido a questões de adaptação do microrganismo ao meio. A concentração inicial da levedura é de 0,4 g/L e ao final do processo o valor obtido foi de 2,77 g/L. A Figura 7 apresenta a curva de crescimento do microrganismo, ou seja, concentração de biomassa, utilizando a concentração de 50% de manipueira.

Figura 7 – Comportamento do crescimento de *R. glutinis* versus concentração de substrato em cultivo contendo 50% de manipueira.



Fonte: Autor, 2022.

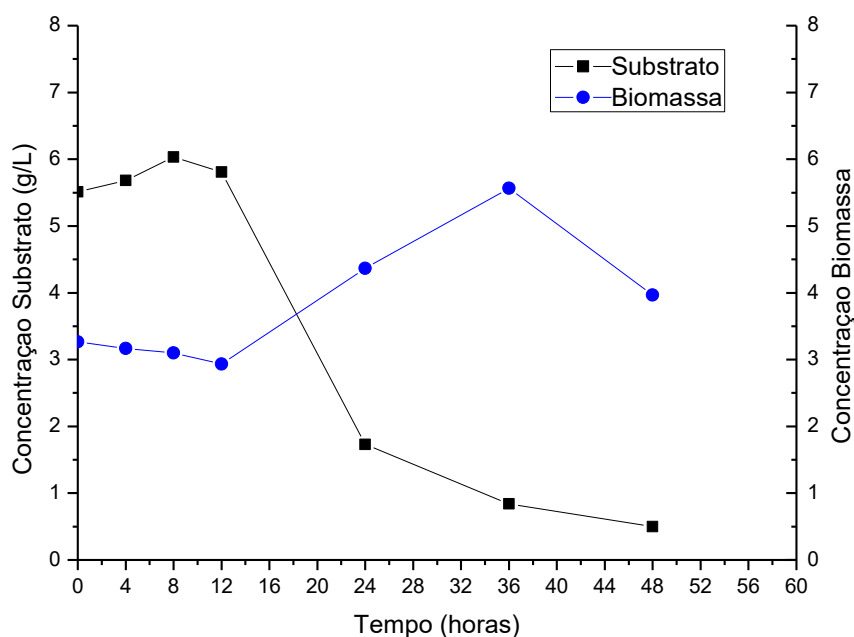
Comportamento similar ao cultivo contendo 25% de manipueira é visto também para a concentração de 50% de manipueira. A concentração inicial no cultivo foi de 1,94 g/L e ao final do processo fermentativo encontrava-se em 1,13 g/L enquanto para a biomassa a concentração inicial foi de 1,37 g/L e ao final do processo a concentração de biomassa era de 3,57 g/L.

A Figura 8 apresenta o comportamento de consumo do substrato e o crescimento de biomassa, utilizando a concentração de 75% do substrato.

Para o cultivo contendo 75% do volume de manipueira, pode-se observar no gráfico da Figura 8 que nas primeiras 12 horas de fermentação praticamente tornou-se constante em que sua concentração inicial foi de 3,27 g/L de *R. glutinis* após esse período é possível perceber um crescimento exponencial do microrganismo e ao final do processo fermentativo obteve-se a concentração de biomassa no valor de 3,97 g/L.

Para o substrato comportamento inverso ao de biomassa é visto já que o microrganismo se utiliza dessa fonte de carbono para se desenvolver, manutenção, assim como produção da biomolécula em questão que é o carotenoide. O valor inicial do substrato nesse cultivo foi de 5,51 g/L e ao final do processo o valor da concentração da fonte de carbono foi de 0,49 g/L.

Figura 8 – Comportamento do crescimento de *R. glutinis* versus concentração de substrato em cultivo contendo 75% de manipueira.

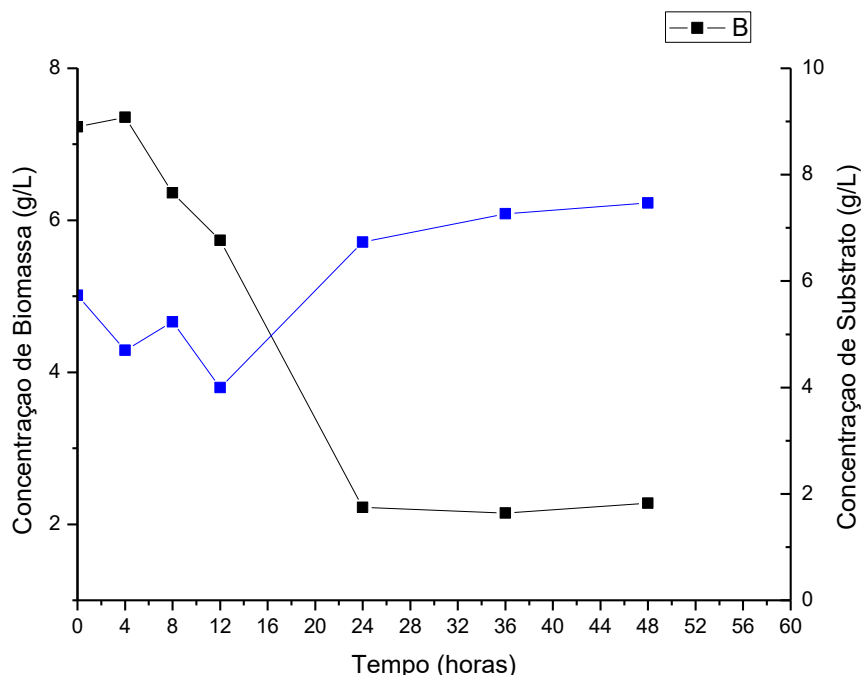


Fonte: Autor, 2022.

No gráfico da Figura 9, observa-se o comportamento do microrganismo em um cultivo com manipueira concentrada. A concentração de açúcares presentes no substrato inicialmente era de 7,23 g/L e após 48 horas de fermentação o valor dos açúcares redutores foi de 2,28 g/L. Enquanto a curva de substrato decai a de biomassa cresce, sendo sua concentração inicial 5,73 g/L e ao final obteve-se a concentração de microrganismos 7,47 g/L.

Fazendo um comparativo entre os cultivos onde houve a variação da concentração de substrato apresentado nas Figuras 6, 7, 8 e 9, é observado que a concentração que possui maior variação da concentração de biomassa foi o cultivo contendo 50% manipueira onde em 24 horas do processo fermentativo obteve um pico de concentração no valor de 5,23 g/L. Já no cultivo de 100% manipueira onde não ocorreu a diluição do substrato, pode-se observar no gráfico da Figura 9 que a curva de crescimento da levedura tende ao crescimento assim como a curva de substrato é visto que ainda possui uma quantidade de açúcar possível de ainda ser metabolizada. Logo é possível perceber que o processo fermentativo pode não ter alcançado seu pico de produção de biomassa. Já para o cultivo de 25% manipueira a quantidade residual de açúcares é mínima então é possível concluir que o processo para esse cultivo chega ao final no período de 48 horas.

Figura 9 – Comportamento do crescimento de *R. glutinis* versus concentração de substrato 100% manipueira.



Fonte: Autor, 2022.

A determinação de carotenoide foi feita indiretamente, a partir da concentração de biomassa ao longo do processo fermentativo. Ao final da fermentação o substrato fermentado foi centrifugado e houve a separação dos sedimentos e do sobrenadante para que em estudos futuros fossem caracterizados os tipos de carotenoides presentes.

A determinação indireta da produção de carotenoide se faz necessária pois, os carotenoides são biomoléculas que não são excretadas pelo microrganismo, ficando alocada internamente da levedura e caracterizando a coloração alaranjada mais forte.

5.3 PARÂMETROS CINÉTICOS DO CULTIVO DE *R. glutinis* COM MANIPUEIRA

A partir dos gráficos obtidos para cada cultivo onde houve a variação da concentração do substrato foi possível obter os parâmetros cinéticos referentes a velocidade específica máxima de crescimento e o fator de conversão de substrato em célula. A velocidade específica máxima foi obtida a partir do gráfico formado pelo logaritmo natural da concentração celular a partir da fase exponencial, ou seja, onde há um crescimento acentuado, para cada um dos cultivos em relação ao tempo de fermentação. Os dados obtidos para os experimentos podem ser observados na Tabela 3. Nessa Tabela também é possível ver a determinação de conversão

de substrato em biomassa para cada cultivo realizado.

Tabela 3 – Parâmetros cinéticos dos cultivos com *R. glutinis* usando manipueira como substrato.

Concentração de substrato (%)	Parâmetros cinéticos	
	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	$Y_{\text{x/s}}$
25%	0,7798	1,270013
50%	0,1487	2,707026
75%	0,1016	0,139637
100%	0,0754	0,004646

Fonte: Autor, 2022.

O ensaio com a maior velocidade específica foi o cultivo realizado com a concentração inicial de substrato de 25%, pois como a concentração de açúcares disponível era menor comparado aos outros 3 experimentos, foi possível consumi-lo mais rapidamente durante o processo.

O cultivo realizado com concentração inicial de 50% de manipueira apresentou a maior conversão em biomassa. A conversão foi maior comparado ao de 25%, pois existia mais açúcares livres para consumo, não só para manutenção como para proliferação e produção de carotenoide.

Os cultivos com maiores concentrações podem não ter alcançado o ápice do processo de conversão e por isso os números são menores quando comparados a fermentação de 50% manipueira. Seria importante extrapolar o tempo padrão utilizado nesse experimento para avaliar melhor os parâmetros de velocidade e conversão em biomassa.

6 CONCLUSÃO

No presente trabalho utilizou manipueira como fonte de carbono em processos fermentativos submersos para produção de carotenoides. As fermentações foram realizadas utilizando o microrganismo *Rhodotorula glutinis* e mostraram-se como uma promissora possibilidade de aplicação de um efluente sem destinação e que pode gerar agravantes em seu descarte. Para determinar o seu impacto na produção de carotenoides é necessário a determinação do material não excretado pelo organismo por meio de extração física e/ou química para seguir com análises cromatográficas. Mas, é possível observar que por possuir açúcares simples disponível para fermentação e micronutrientes que possibilitam seu uso economicamente viável. As pesquisas pode-se aprofundar para demais avaliações, como de outros fatores que possam afetar o desempenho do processo. É importante ressaltar que não houve tratamento com relação ao ácido cianídrico por meio de aquecimento, apenas no processo de neutralização utilizando base, ou seja, o microrganismo possui uma grande adaptabilidade ao meio de cultivo.

REFERÊNCIAS

- AMBRÓSIO, C.L.B. *et al.* Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. *In: Revista de Nutrição*, Campinas, v. 19, n. 2, p. 233-243, mar-abr/2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rn/a/BsWDc6NZRZD634L94BY6Pvz/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 14 maio 2022.
- BANZATTO, David; FREITA, L. A. D; MUTTON, M. J. R. Carotenoid production by *Rhodotorula rubra* cultivated in sugarcane juice, molasses, and syrup. *In: Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 33, n. 1, p. 14-15, fev./2013. Disponível em: http://old.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612013000500003&script=sci_abstract. Acesso em: 30 maio 2022.
- BARRETO, M. T. L. *et al.* Desenvolvimento e acúmulo de macronutrientes em plantas de milho biofertilizadas com manipueira. *In: Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v. 18, n. 5, p. 487-489, dez./2013. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-43662014000500004&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 30 maio 2022.
- CAMILI, P. H. M. *et al.* Processo de flotação do yratamento da manipueira originada da fábrica de farinha de mandioca. **RETEC. Revista de Tecnologias**, Botucatu, v. 3, n. 1, p. 53-62, jan./2010. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/134414>. Acesso em: 14 maio 2022.
- CARVALHO, F.M. *et al.* Sistemas de produção de mandioca em treze município da região sudoeste da Bahia. *In: Bragantia*, Campinas, v.68, n.3, p. 699-702, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/brag/a/RTs8GDWRVps583Kk667pz8M/?lang=pt&format=html>. Acesso em: 15 abr. 2022.
- EMBRAPA. Mandioca em números. *In: Congresso de Mandioca 2018*, Brasília. Disponível em: <https://www.embrapa.br/congresso-de-mandioca-2018/mandioca-em-numeros>. Acesso em: 08 abr. 2022.
- EMBRAPA. Mandioca em números. *In: Congresso de Mandioca 2018*, Brasília. Disponível em: <https://www.embrapa.br/congresso-de-mandioca-2018/mandioca-em-numeros>. Acesso em: 08 abril 2022.
- EMBRAPA. Uso da manipueira no controle do oídio da cerigueleira: resultados preliminares. *In: Comunicado técnico 2001*. Fortaleza: Ministério da Agricultura e Pecuária, 2001. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/424162/1/Ct070.pdf>. Acesso em: 08 abr. 2022.
- FELIPE, F.I. *et al.* Panorama e perspectivas para a indústria de fécula de mandioca no Brasil. *In: Revista Raízes e Amidos Tropicais*, São Paulo, v. 6, p.134-146, jan/2010. Disponível em: <https://revistas.fca.unesp.br/index.php/rat/article/view/1114/1170>. Acesso em 12 abr. 2022.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. [E-book]

MAGANHOTO, N.H. **Otimização dos parâmetros para fermentação líquida submersa de *Clonostachys rosea***. TCC (Bacharel em Engenharia Alimentos). Paraná: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2013. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/handle/1/41094>. Acesso em 12 abr. 2022.

MELO, J. M. M. **Mapeamento de resíduos e consumo de recursos naturais na produção de farinha de mesa**. p. 64 - 66. TCC (Bacharelado) em Engenharia Agrícola e Ambiental). Petrolina, PE: Universidade Federal do Vale do São Francisco, 2014. Disponível em: <http://www.univasf.edu.br/~tcc/000004/00000447.pdf>. Acesso em 12 abr. 2022.

MESQUITA, S. S. et al. Carotenoides: Propriedades, Aplicações e Mercado. In: **Revista Virtual de Química**, no prelo, v. 9, n. 2, p. 1-17, abr./2017. Disponível em: <http://rvq.sbq.org.br/imagebank/pdf/MesquitaNoPrelo.pdf>. Acesso em: 10 maio 2022.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. In: **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORAIS, F. L. **Carotenoides: Características biológicas e químicas**. p. 15 - 18. Monografia (Especialização) De Qualidade em alimentos. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 2006. Disponível em: https://bdm.unb.br/bitstream/10483/546/1/2006_FlaviaLuisaMoraes.pdf. Acesso em: 10 maio 2022.

OLIVEIRA, R.S. **Avaliação dos impactos ambientais e aplicação das normas regulamentadoras de segurança do trabalho em uma unidade processadora de derivados de mandioca na região noroeste do Paraná**. TCC (Bacharelado) em Engenharia Alimentos. Paraná: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2013. Disponível em: http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/6774/2/CM_COEAL_2012_2_08.pdf. Acesso em 28 maio 2022.

ORNELA, P.H.O. **Produção de quitinases pelo fungo *Aspergillus niveus* em fermentação submersa e em estase sólido utilizando resíduos da indústria pesqueira do camarão e análise do potencial antifúngico**. Tese (Doutorado) em Biotecnologia. Paulista, PE: Universidade Estadual Paulista, 2013. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/217398>. Acesso em 28 maio 2022.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. In: **Biochemical engineering journal**, v. 13, n. 2-3, p. 81-84, 2003. Disponível em: http://www.davidmoore.org.uk/21st_Century_Guidebook_to_Fungi_PLATINUM/REPRINT_collection/Pandy_solid-state-fermentn2003.pdf. Acesso em 28 maio 2022.

RÊGO, A. P. B. *et al.* Produção de enzimas cmcase e pectinase por processo fermentativo utilizando casca de café suplementada com manipueira como substrato. In: **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, Curitiba, v. 8, n. 1, p. 104-121, jan./2019. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/rber/article/view/53947>. Acesso em: 13 jun. 2022.

SANTOS, A. Usos e impactos causados pela manipueira na microrregião sudoeste da Bahia-Brasil. In: **Problemas sociales y regionales em América Latina**. v.1, Barcelona: Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona, 2009. p. 11 – 23.

SCHMIDT, V. K. O. **Hydrophobic inducers to enhanced surfactin production using cassava wastewater a low-cost culture médium: A prospecto non new homologues**. 2022. p. 126- 132. Dissertação (Mestrado) em Engenharia Química. Santa Catarina, RS: Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/332056217_Producao_de_enzimas_CMCase_e_pec_tinase_por_processo_fermentativo_utilizando_casca_de_cafe_suplementada_com_manipueira_como_substrato. Acesso em: 13 jun. 2022.

SEAB. **Prognóstico Cultural Mandioca**, Curitiba: Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento, 2022. Disponível em: https://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2020-12/Prog%C3%B3stico%20Mandioca%20-%202020_21.pdf. Acesso em: 08 abr. 2022.

SILVA, J. D. *et al.* Produção de biomassa e lipídios pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando a manipueira como substrato. *In: Brazilian Journal Food Technolof*, Campinas, v. 21, n. 1, p. 1-6, out./2018. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1981-67232018000100461&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 5 jun. 2022.

SILVA, L. C. *et al.* Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *In: Semina: Ciências Agrárias*. 2010, v. 31, n. 3, p. 669-68. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445744097017>. Acesso em: 20 mai 2022

UENOJO, Mariana; JUNIOR, M. R. M; PASTORE, Gláucia Maria. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. *In: Química Nova*, Campinas, v. 30, n. 3, p. 616-622, fev./2007. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422007000300022&script=sci_abstract. Acesso em: 29 maio 2022.

VALDUGAI, E. *et al.* Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. *In: Química Nova*, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, out./2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000900036. Acesso em: 6 jun. 2022.

WEIL, J.H. **Bioquímica geral**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2000. p. 316.