



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**BRUNNO STEFANO OLIVEIRA GADELHA**

*PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS UTILIZANDO  
RESÍDUO AGROINDUSTRIAL.*

João Pessoa – PB

2022

BRUNNO STEFANO OLIVEIRA GADELHA

*PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS UTILIZANDO  
RESÍDUO AGROINDUSTRIAL.*

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Universidade Federal da  
Paraíba como parte dos requisitos  
necessários para obtenção do Grau de  
Bacharel em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Flávio Luiz Honorato da  
Silva.

João Pessoa – PB

2022

**Catalogação na publicação  
Seção de Catalogação e Classificação**

G124p Gadelha, Brunno Stefano Oliveira.

Produção de compostos bioativos utilizando resíduo agroindustrial: Cinética fermentativa da produção da astaxantina utilizando o microrganismo *Xanthophyllumices dendrophous* e *Rhodotorula glutinis*. / Brunno Stefano Oliveira Gadelha. - João Pessoa, 2022. 46 f. : il.

Orientação: Flávio Luiz Honorato da Silva Silva.  
TCC (Graduação) - UFPB/CT.

1. Engenharia química. 2. Aproveitamento de resíduo agroindustrial. 3. Bioengenharia. I. Silva, Flávio Luiz Honorato da Silva. II. Título.

UFPB/CT

CDU 66.01(043.2)

Elaborado por ROSANGELA GONCALVES PALMEIRA - CRB-216

**ATA DE DEFESA PÚBLICA DE (*TRABALHO FINAL DE CURSO OU ESTÁGIO SUPERVISIONADO*)**

Ao(s) *primeiro* dia(s) do mês de dezembro de 2022, no horário das 09h00 às 10h30 horas, foi realizada, em meio virtual, a defesa pública do *TRABALHO FINAL DE CURSO-TFC* do curso de Engenharia Química/UFPB do(a) discente **BRUNNO STEFANO OLIVEIRA GADELHA**, cujo projeto de pesquisa intitula-se: **PRODUÇÃO DE**

**COMPOSTOS BIOATIVOS UTILIZANDO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL.**

A Banca Examinadora, constituída pelo(a) orientador(a) Prof. Dr(a). Flávio Luiz Honorato da Silva, pelo(a) Prof. Dr. Carlos Augusto da Silva Santana e Prof. Dr. Josevan da Silva emitiu o seguinte parecer:

Nota do Orientador(a): 10,0

Nota do 1º Avaliador(a): 10,0

Nota do 2º Avaliador(a): 10,0

Foi aprovado(a) com média GERAL: 10,0

Eu, Prof(a). Dr(a) Flávio Luiz Honorato da Silva, orientador(a) e presidente da banca de defesa de (*TRABALHO FINAL DE CURSO OU ESTÁGIO SUPERVISIONADO*), lavrei a presente ata que segue por mim assinada com os pareceres de todos os membros da banca em anexo.

---

Prof(a). Dr(a). Flávio Luiz Honorato da Silva

---

Prof(a). Dr(a). Carlos Augusto da Silva Santana

---

Prof(a). Dr(a). Josevan da Silva

Soli Deo gloria, somente à Deus a  
glória. Dedico a Deus e à família o  
presente trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Conseguir chegar até aqui foi um caminho de intensas dificuldades em todos os aspectos da vida. Entretanto, consegui chegar até aqui graças ao apoio de diversas pessoas.

Em primeiro lugar, sou grato a Deus por ter sido meu refúgio durante esse tempo, sem Ele seria impossível chegar até aqui, bem como não faria sentido chegar até aqui, pois o viver é Cristo.

Além disso, posso citar a minha família, meu pai que é o homem que mais incentiva meus sonhos, minha mãe e irmã por dispor de base emocional para que eu pudesse suportar tudo. Ademais, posso citar minha noiva, pois é a pessoa que me escuta e sempre suporta junto de mim todas as coisas da vida, tem sido para mim fonte de força, alento à alma. Não poderia esquecer da família dela, que tem sido para mim fonte de sabedoria.

Não poderia esquecer dos meus companheiros no curso, pessoas preciosas demais que viveram essa experiência comigo, que se estressavam, sofriam, choravam quando era momento, alegravam-se, sorriam, regozijavam-se quando era devido, fizemos uma forte aliança, tornamo-nos amigos para toda a vida.

Sou grato ao meu orientador, Flávio, uma pessoa incrível, que me deu todo suporte em todo esse tempo, ajudando-me na elaboração do trabalho.

Agradeço à Universidade Federal da Paraíba (UFPB) por me conceder a experiência vivida durante a graduação, dar-me diversas experiências acadêmicas.

## RESUMO

Partindo da pressuposição de que toneladas de resíduos são constantemente gerados, por intermédio da ação industrial, e que são descartados, em suma, de forma inconveniente ao meio ambiente, viabilizando impactos que poderiam ser evitados através de um reuso inteligente. Nesse contexto, as leveduras *Rhodotorula glutinis* e *Xanthophyllomyces dendrorhous* têm a capacidade de promover reutilização, produzindo compostos com um alto valor nutricional como carotenoides, utilizando como fonte de crescimento a manipueira, que seria, possivelmente, lançada de qualquer maneira no meio ambiente. Com isso, esse trabalho objetiva-se a avaliar as características do substrato e os efeitos dos componentes do meio de cultivo sobre a biomassa, lipídios e carotenoides proporcionados, através das leveduras *Rhodotorula glutinis* e a *Xanthophyllomyces dendrorhous* em manipueira. Na análise do subproduto agroindustrial, obtém-se 93,54% de umidade,  $32,24 \text{ g.L}^{-1}$  de açúcares redutores,  $47,18 \text{ g.L}^{-1}$  de açúcares totais, 1,58% de proteínas e 1,00% de cinzas, sólidos solúveis totais de 7,3 °Brix e pH equivalente a 5,30. No cultivo referente à levedura *Rhodotorula glutinis*, a biomassa obtida foi de  $8,52 \text{ g.L}^{-1}$  em aproximadamente 84 horas, nesse interim fora produzido 1,30 mg/L de carotenoides e 0,81 g/L de lipídeos, enquanto no cultivo em *Xanthophyllomyces dendrorhous*, obteve-se a biomassa de  $9,849 \text{ g.L}^{-1}$  em aproximadamente 84 horas, nesse contexto fora produzido 1,10 g/L de carotenoides e 4,20 g/L de lipídeos. Fazendo-se o cultivo misto, a biomassa obtida foi de  $7,74 \text{ g.L}^{-1}$ , 1,68 mg/L de carotenoides e 5,86 g/L de lipídeos. Portanto, manipueira mostrou-se como um potencial substrato para a produção de lipídios por *Rhodotorula glutinis* e *Xanthophyllomyces dendrorhous*, podendo ser utilizada em processos fermentativos, enriquecendo o resíduo e reduzindo possíveis consequências ambientais pelo descarte incorreto.

**Palavras-chave:** *Rhodotorula glutinis*, *Xanthophyllomyces dendrorhous* substrato, carotenoides.

## ABSTRACT

Based on the assumption that tons of waste are constantly generated, through industrial action, and that they are discarded, in short, in an environmentally inconvenient way, enabling impacts that could be avoided through intelligent reuse. In this context, *Rhodotorula glutinis* yeasts have the ability to promote reuse, producing compounds with a high nutritional value such as carotenoids, using manueira as a growth source, which would possibly be released into the environment anyway. Thus, this work aims to evaluate the characteristics of the substrate and the effects of the components of the culture medium on the biomass, lipids and carotenoids provided, through the yeast *Rhodotorula glutinis* and cassava. In the analysis of the agroindustrial by-product, 93.54% of moisture, 32.24 g/L of reducing sugars, 47.18 g/L of total sugars, 1.58% of proteins and 1.00% of ash are obtained, total soluble solids of 7.3 °Brix and pH equivalent to 5.30. In cultivation, the biomass obtained was 8.52 g/L in approximately 84 hours, in the meantime 1.30 mg/L of carotenoids and 0.81 g/L of lipids had been produced. Using mixed culture, the biomass obtained was 7.74 g/L, 1.68 mg/L of carotenoids and 5.86 g/L of lipids. Therefore, manueira proved to be a potential substrate for lipid production by *Rhodotorula glutinis*, which can be used in fermentation processes, enriching the residue and reducing possible environmental consequences due to incorrect disposal.

**Keywords:** *Rhodotorula glutinis*, substrate, carotenoids.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>7</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>9</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>10</b>
3.1 RESÍDUO AGROINDUSTRIAL .....	10
3.1.1 Manipueira como resíduo da agroindústria .....	11
3.2 LEVEDURAS.....	13
3.2.1 Levedura <i>Xanthophyllomyces Dendrorhous</i> como agente produtor de carotenoides .....	14
3.2.2 Levedura <i>Rhodotorula Glutinis</i> como agente produtor de carotenoides.....	15
3.3 LIPÍDIOS .....	16
3.3.1 Importância da produção do lipídio astaxantina.....	18
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
4.1 MANIPUEIRA .....	20
4.1.1 Tratamento da Manipueira.....	20
4.1.2 Análises físico-químicas do substrato.....	20
4.1.2.1 Açúcares redutores, não redutores e totais.....	20
4.1.2.2 Determinação da Umidade .....	22
4.1.2.3 Determinação de Cinzas.....	22
4.1.2.4 Determinação de Proteínas.....	22
4.1.2.5 pH.....	22
4.1.2.6 Determinação de Sólidos Solúveis Totais.....	23
4.1.2.7 Massa Específica.....	23
4.2 MICRORGANISMO.....	23

4.3 CULTIVO EM MEIO SINTÉTICO (YM) .....	24
4.4 PREPARO DO INÓCULO.....	24
4.5 CONDIÇÕES DE CULTURA.....	24
4.6 BIOMASSA.....	25
4.7 AÇÚCARES REDUTORES.....	25
4.8 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CAROTENOIDES.....	25
4.9 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE LIPÍDEOS.....	26
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>27</b>
5.1 ANÁLISES QUÍMICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO SUBSTRATO.....	27
5.2 BIOMASSA.....	28
5.3 AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS.....	31
5.4 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CAROTENOIDES E LIPÍDEO.....	33
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>38</b>

## 1. 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). Tais resíduos são descartados no meio ambiente, causando-lhe consequentes danos. No entanto, diversos subprodutos e matérias-primas da indústria de alimentos e/ou da agroindústria têm sido empregados para o crescimento de microrganismos pela alta disponibilidade e baixo custo (BARBATO, 2014).

Um desses resíduos origina-se durante o processamento das raízes da mandioca limpas e secas, já que estas são prensadas e lavadas, resultando um volume extra de um líquido amarelo claro, conhecido popularmente como maniqueira (BARRETO et al., 2014). Tal líquido tem uma composição nutricional excelente, devido à presença de minerais, como fósforo, potássio, magnésio; além de a maniqueira ser boa fonte de açúcares fermentescíveis e nitrogênio, favorável ao crescimento de micro-organismos, esta pode ser também utilizada como fertilizante (DUARTE et al., 2012).

O processo envolve um conjunto de rotas tecnológicas capazes de fracionar, extrair, separar e converter a matéria-prima em diferentes produtos intermediários ou finais, incluindo alimentos, produtos químicos, biomateriais e energia, maximizando os ganhos econômicos, minimizando os aspectos ambientais negativos, e melhorando a eficácia e sustentabilidade das cadeias agroindustriais (ROSA et al., 2011). Assim sendo, nota-se que é possível usar resíduos agroindustrial em um fim produtivo e até lucrativo, diminuindo os impactos maléficos ao meio.

Na perspectiva biotecnológica, as leveduras são interessantes, pois além de produzir carotenoides, também apresentam um bom rendimento em biomassa (SQUINA et al., 2001), tendo uma boa fonte lipídica (YOON & RHEE, 1983), além de serem capazes de crescer em resíduos da indústria de alimentos como os substratos agrícolas de baixo custo (COSTA et al., 1987).

Acompanhado a esses fatores, o interesse na produção de astaxantina, que é um carotenoide, por fontes naturais vem aumentando significativamente nos últimos anos, devido à possibilidade de atuar como corante e sua capacidade antioxidante biológica potente (URNAU et al., 2015). Para tal produção, concordam Kobayashi et al. (1993) e Macias-Sanchez et al. (2010), que entre os organismos produtores de astaxantina, tem-se a alga verde *Haematococcus pluvialis* e a levedura *Phaffia rhodozyma*, as quais são atualmente consideradas de interesse industrial. Além disso, estudos realizados destacam a produção de carotenoides, em especial astaxantina, pelos microrganismos *Xantophyllum dendrorhous*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Blakeslea trispora* e *Haematococcus pluvialis* (VALDUGA et al., 2009).

Considerando a importância e abundância da matéria-prima, as possibilidades de revertê-la em um produto de interesse industrial, mediante a métodos biotecnológicos, então esta pesquisa se propõe a estudar a biomassa produzida pela levedura *Rhodotorula glutinis* e a *Xantophyllum dendrorhous*, bem como a produção do carotenoide astaxantina.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Estudo da cinética fermentativa da produção de astaxantina utilizando a manipueira como substrato e os microrganismos *Rhodotorula glutinis* e *Xanthophilomices dendrorhous* como agentes produtores.

### 2.2. Objetivos específicos

- Caracterização físico-química da manipueira;
- Produzir e estudar o teor de biomassa;
- Analisar a quantidade de açúcares redutores totais;
- Verificar a produção de lipídeos;
- Fomentar, extrair, e verificar a quantidade de carotenoides astaxantina.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. RESÍDUO AGROINDUSTRIAL**

O Brasil, por ser um país de grande atividade agrícola, é um dos que mais produzem resíduos agroindustriais e a busca de alternativas para utilização da matéria orgânica gerada vem crescendo dentro de vários centros de pesquisa (CATANEO et al., 2008). Aproximadamente 5 bilhões de toneladas de resíduos agrícolas são gerados globalmente todos os anos (KUNG; KONG; CHOI, 2015). A maioria deles não é reaproveitada ou beneficiada, apenas é destinado à decomposição natural, levando ao seu acúmulo, gerando problemas ambientais (DE MORAES et al., 2017).

Se forem descartados sem tratamento prévio, incompleto ou ineficiente, os resíduos líquidos gerados durante o processamento de matérias-primas agrícolas, também podem se tornar uma fonte de poluição. Esses efluentes podem conter nutrientes em excesso, sedimentos, matéria orgânica, pesticidas, patógenos, metais pesados e outros diversos contaminantes. Uma vez descarregado em um corpo d'água, afetará a qualidade do abastecimento de água doce (e, portanto, a quantidade de água disponível). O destino dos descartes em rios e lagos geralmente é o oceano, o que tem um impacto negativo para o meio marinho (RYDER, 2017).

Sendo assim, atenção especial tem sido voltada à minimização ou reuso de resíduos e ao estabelecimento de novos usos de produtos e subprodutos agropecuários em substituição aos recursos não renováveis (ROSA et al., 2011). Além disso, alega Federici et al. (2009), que inúmeras empresas têm demonstrado interesse em novas possibilidades de uso dos resíduos, pois a recuperação de subprodutos e resíduos tem sido apoiado pela evidência crescente de promover benefícios à saúde. De acordo com Silva (2016), os avanços do agronegócio acarretaram um aumento da utilização de insumos, e

consequentemente, em uma elevação da geração de resíduos nas atividades agropecuárias e agroindustriais.

Vários compostos podem ser obtidos através dos resíduos, os quais podem ser transformados em produtos químicos (como produtos farmacêuticos, sabores, vitaminas e orgânicos ácidos), macromoléculas (como biopolímeros, lubrificantes e enzimas microbianas) e biocombustíveis (como bioetanol, biogás e biohidrogênio), através de processos biotecnológicos (FEDERICI et al., 2009). Kot et al. (2015) constataram que, além de utilizar subprodutos para produção biológica, as leveduras do gênero *Rhodotorula* também podem reduzir sua carga orgânica. Eles usaram a levedura *R. glutinis* para verificar a biodegradabilidade de água residuária de batata desproteinizada (fonte de nitrogênio) com glicerol (fonte de carbono), e obtiveram 77% de redução da DQO (demanda química de oxigênio) e assimilação de 70% de glicerol e 20,34 g/L de biomassa, quando usando 50 g/L de glicerol e 5% da água residual.

Com isso, relata Silva (2016), que investir na gestão de resíduos industriais contribuem para a promoção sustentável do país, e nesse contexto, Laufenberg et al. (2003) explica que novos métodos e políticas de resíduos, manuseio e tratamento estão sendo usadas, como por exemplo a biotecnologia, a qual tem chamado atenção, para reutilizar os recursos residuais. A possibilidade de aproveitamento desses excedentes da agroindústria tem grande importância ambiental e econômica. Eles representam a fonte de matérias-primas utilizadas para criar novos produtos, (REBECCCHI et al., 2013).

### **3.1.1. Manipueira como resíduo da agroindústria**

O processamento de uma tonelada de farinha de mandioca para produzir farinha gera aproximadamente 300 litros de águas residuais da mandioca, isto é, manipueira (COSTA et al., 2010). A manipueira é o resíduo líquido gerado nas indústrias processadoras de mandioca, para a obtenção de farinha e fécula, que em tupi-guarani quer dizer “o que brota da mandioca”, ela apresenta grande potencial poluente decorrente da quantidade de carga orgânica e toxinas capazes de afetar células nervosas e o transporte de oxigênio no sangue. Os efluentes de fecularias de mandioca, representam um desafio para órgãos

ambientais e industriais por não apresentar legislação específica para uso na agricultura, sendo tratada em lagoas anaeróbicas, gerando odores desagradáveis, ocupação de grandes áreas e contaminação do lençol freático (CAETANO, 2016).

Diante de toda preocupação decorrente de para onde a manipueira está indo, tal resíduo líquido leitoso amarelo-claro, contém, no entanto, açúcares, amidos, proteínas, linamarina, sais e outras substâncias (DUARTE et al., 2012), além disso, Ribas et al. (2010) afirma que contém nitrogênio fósforo, potássio, sódio, ferro, zinco, cobre, ácido cianídrico, DBO, DQO. Além disso, as águas residuais de mandioca são também um resíduo rico em carboidratos gerado em grandes quantidades durante a produção de farinha de mandioca (COSTA et al., 2010). A alta demanda química de oxigênio (DBO) é uma das principais causas de problemas oriundas da relação meio ambiente com manipueira, quando esta não for tratada. Todavia, todos os minerais tornam o resíduo atraente para cultivos de microrganismos e produção de substâncias importantes (SILVA, 2016).

Utilizar a manipueira como meio de cultura em processo biotecnológico, resulta em agregação de valor ao resíduo e consequentemente reduz o descarte inadequado no ambiente, favorecendo o desenvolvimento sustentável nas indústrias geradoras de substrato. Além disso, contribuiria com a redução do impacto ambiental ocasionado pelo seu descarte inadequado na natureza (SILVA, 2016). Leonel e Cereda (1995) relataram em seu trabalho que é possível a utilização com sucesso da manipueira para a produção de produtos biológicos.

Nesse contexto de reuso da manipueira em uma perspectiva da biotecnologia, notou-se em algumas análises de utilização do resíduo, como em cultivo de alface, onde Duarte et al. (2012) percebe que ao aumentar a dose do resíduo, constata-se um aumento foliar da alface quadraticamente, e afirma que este fato fora possibilitado devido aos nutrientes contidos na manipueira. Jesus et al. (2016) usaram a manipueira como fonte alternativa de carbono para produzir lipase. Os autores relataram que o *Bacillus subtilis* pode produzir lipase por fermentação submersa, utilizando como fonte de carbono a manipueira tratada sem adição de indutor enzimático. A manipueira pode ser utilizada como

matéria-prima para processos industriais por conter em sua composição, altas concentrações de carboidratos, nitrogênio e sais minerais (CORDEIRO, 2006).

### **3.2. LEVEDURAS**

Há milênios o homem vem utilizando leveduras para a produção de pão, cerveja, vinho e outros alimentos obtidos por intermédio da fermentação. Atualmente, elas são usadas numa ampla faixa de processos fermentativos visando a produção dos mais variados tipos de produtos (BENTO, DE ALMEIDA; 2006). Microrganismos são bons produtores de biomoléculas e essa produção possui grandes vantagens para a indústria pela possibilidade de produção em curto período de tempo, em qualquer época do ano, em pequeno espaço, usando substratos de baixo custo, além de permitir o controle das condições de cultivo (VALDUGA et al., 2014).

As leveduras são microrganismos e, assim como bactérias, algas e outros fungos, têm sido utilizadas na alimentação humana e animal. Estes microrganismos unicelulares são as mais antigas fontes de proteínas unicelulares consumidas pelo homem através de produtos naturais, bebidas e alimentos elaborados por processos fermentativos. Sob o ponto de vista industrial, as leveduras são muito interessantes, pelo fato de essa matéria-prima ser composta de uma variedade de componentes úteis e, por esse motivo, amplamente explorada (COSTA, 2004).

As leveduras são bastante utilizadas, pois possuem uma capacidade ampla de obterem variedades de componentes, têm na biomassa uma fonte lipídica, podendo acumulá-la numa faixa de 20-70% (w/w) na parede celular, precisando-se para tanto qualquer substrato. O conteúdo lipídico relatado no estudo, demonstra a abundância produtiva pelas leveduras, de 2120 Kg/m<sup>3</sup> de lipídios, em relação às bactérias e fungos, os quais têm, respectivamente, uma produção lipídica de 678,8 Kg/m<sup>3</sup>, e o outro não detectou produção, tais valores foram retirados dos maiores produtores dentre todas as espécies testadas, porém, pode-se dizer que a levedura produziu bem mais do que os outros microrganismos (SAWANGKEAW; NGAMPRASERTSITH, 2013).

Além disso, as condições de cultivo são mais fáceis de controle do que de outros microrganismos, como a temperatura, tipos de nutrientes e níveis, pH e, se aplicável, níveis de luz, e o cultivo de oleaginosos microrganismos não requerem qualquer inseticida, pesticida ou herbicida, e com isso pode-se dizer que manipular leveduras, além de produzirem mais componentes, são mais simples de se trabalhar. Ao contrário do cultivo de microalgas, fungos e leveduras são favoravelmente cultivados na ausência de luz, e assim um fermentador é apropriado (SAWANGKEAW; NGAMPRASERTSITH, 2013).

### **3.2.1. Levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* como agente produtor de carotenoides**

*P. rhodozyma* foi isolado pela primeira vez de seu habitat natural, as feridas de bétulas em regiões mais frias, de Phaff no final dos anos 1960. Mais tarde, foi taxonomicamente classificado como o novo gênero *Phaffia* representado por uma única espécie, *P. rhodozyma* (MILLER, YONEYAMA, SONEDA, 1976).

Desde que descobriu o estágio sexual de *P. rhodozyma*, a forma sexual foi designada *X. dendrorhous* e o estado assexuado *P. rhodozyma*. Avaliou-se que *P. rhodozyma* cumpre vários critérios, que permitem uma alocação ao filo dos basidiomicota, como a capacidade de sintetizar compostos semelhantes ao amido e pigmentos (GOLUBEV, 1995). De acordo com Andrewes e Starr (2001), os principais pigmentos são as xantofilas, onde a astaxantina representa a maioria com 83-87% dos carotenoides totais, seguida pela fenoxantina (5-7%), 3-hidroxiquinenona (3-4%), equinenona (2-4%) e β- caroteno (2-2,5%).

Além disso, como fora dito, vários pigmentos carotenoides são sintetizados, sobretudo o carotenoide astaxantina, e se formam células em massa, com características de cor laranja para cor vermelho-salmão, no produto final da carotenogênese em *P. rhodozyma* (MILLER, YONEYAMA, SONEDA, 1976; SCHIMIDT et al., 2011).

A astaxantina é uma xantofila vermelha (carotenoide oxigenado) com grande importância nas indústrias de aquicultura, farmacêutica e alimentícia. A

alga verde *Haematococcus pluvialis* e a levedura heterobasidiomiceta *Xanthophyllomyces dendrorhus* são atualmente conhecidas como os principais microrganismos úteis para a produção de astaxatina em escala industrial (ANDREWES, STARR, 2001). A melhoria do título de astaxantina de fermentação microbiana é um requisito para ser competitivo com a fabricação de sintéticos por procedimentos químicos, que atualmente é a principal fonte do mercado (SCHIMIDT et al., 2011).

### **3.2.2. Levedura *Rhodotorula glutinis* como agente produtor de carotenoides**

O gênero *Rhodotorula* refere-se a um grande grupo de leveduras pigmentadas esporogênicas pertencentes ao filo *Basidiomycota*, classe *Urediniomycetes* e ordem *Sporodiales*. (ALMANZA et al., 2014). O gênero *Rhodotorula* é conhecido por sua capacidade de biossintetizar carotenoides, tais como  $\beta$ -caroteno, toruleno e torularrodina, em diferentes proporções. Tal microrganismo tem sido estudado devido a seu potencial para produção industrial de carotenoides, uma vez que oferecem vantagens sobre os outros gêneros em termos de taxa de crescimento elevada e uso de substratos de baixo custo (BRANCO; SOARES, 2015). Além disso, várias linhagens de *Rhodotorula* apresentam características importantes, como a produção de grandes proteínas unicelulares, etanol, ácido acético e acetaldeído (ALMANZA et al., 2014).

Leveduras do gênero *Rhodotorula* são microrganismos estritamente aeróbios com características metabólicas peculiares, como a aptidão de engendrar glicogênio durante a fase de crescimento exponencial e também produção de grandes quantidades de lipídios e pigmentos carotenoides durante a etapa estacionária do desenvolvimento (ALMANZA et al., 2014).

Entre as leveduras capazes de produzir lipídios, a literatura destaca os gêneros *Candida*, *Lipomyces*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* e *Trichosporon*, capazes de produzir 60% ou mais de gordura (LIMA, SATO, 2001).

Em estudos, comparando leveduras, tais como *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida lipolytica* e *Saccharomyces cerevisiae*, tendo como substrato a vinhaça bruta e melaço, a *R. mucilaginosa* foi a que apresentou maior produtividade de biomassa e proteína (CAZETTA, CELLIGOI, 2005). Atualmente, este gênero tem sido estudado devido ao seu potencial para produção industrial, como corantes alimentares e antioxidantes (EVANGELISTA, 2008).

O gênero *Rhodotorula* inclui trinta e quatro espécies, dentre elas tem as *Rhodotorula mucilaginosa*, *R. rubra*, *R. minuta*, *R. glutinis*. *R. glutinis* é uma levedura pigmentada, parte do filo *Basidiomycota*, particularmente importante para as indústrias de alimentos devido ao seu potencial biotecnológico e implicações de segurança (ALMANZA et al., 2014).

*Rhodotorula glutinis* é uma levedura que tem uma vantagem sobre as algas, outros fungos e bactérias devido à sua taxa de crescimento unicelular, que é relativamente alta com a utilização de meio de fermentação de baixo custo (TASKIN & ERDAL, 2011). Em estudo da curva de crescimento da *R. glutinis*, Marova (2010) verificou um comportamento bifásico típico em fase estacionária prolongada, provavelmente devido à competência das células de levedura de utilizar armazenamentos lipídicos formados durante o crescimento como fonte de energia adicional. Observou-se também que a produção de carotenoides durante o crescimento flutuou e foram vistos alguns máximos e mínimos locais. O principal carotenoide produzido pelas células *R. glutinis* é o β-caroteno.

Dai (2007) percebeu que *R. glutinis* acumulava lipídios em até 60,69% em uma base de biomassa celular. Também observou que o biodiesel tem uma composição muita parecida com a do óleo produzido. Portanto *R. glutinis* pode ser considerada uma potencial cepa para converter hidrolisados lignocelulósicos em matéria-prima para produção de biodiesel.

### **3.3. LIPÍDIOS**

Os ácidos graxos poliinsaturados omega-6 e omega-3, que são tipos de lipídios, são essenciais ao organismo, principalmente pelas propriedades

funcionais que apresentam (NOVELLO et al., 2008). Além disso, os lipídios são considerados fontes energéticas com alta concentração de energia prontamente disponível, pois são constituídos de grande proporção de ácidos graxos, os quais possuem 2,25 vezes mais energia que os carboidratos (SILVA et al., 2007).

Os lipídios da dieta são fonte de ácidos graxos essenciais para o organismo humano, onde se encontram os ácidos linoléico e  $\alpha$ -linolênico. Os ácidos graxos são importantes para o balanço energético, biossíntese de membranas, produção de eicosanóides e outras funções especializadas. Nos tecidos, os ácidos graxos podem ser oxidados a acetil-CoA ( $\beta$ -oxidação) ou esterificados a acilglicerol, onde como triacilglicerol constituem a forma mais eficiente de reserva calórica do organismo. Muitas das propriedades funcionais das membranas são influenciadas por ácidos graxos que compõem os fosfolipídeos. Os ácidos graxos saturados diminuem a fluidez das membranas, enquanto os ácidos graxos polinsaturados promovem maior fluidez (MOREIRA et al., 2002).

Em estudo que analisa as consequências de ter ou não ter lipídios no leite materno, demonstra a importância da existência dos lipídios para o desenvolvimento da criança, bem como do próprio feto. A fração lipídica do leite representa a maior fonte de energia para crianças e fornece nutrientes essenciais, tais como vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos poliinsaturados (AGPI). Os ácidos graxos essenciais (AGE) linoléico (LA, 18:2n-6) e  $\alpha$ -linolênico (ALA, 18:3n-3) são precursores dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (AGPI-CL), incluindo os ácidos docosahexaenóico (DHA) e araquidônico (ARA). A qualidade dos lipídios no leite secretado está diretamente relacionada com a ingestão materna. Os AGPI-CL são importantes na proteção contra alergia e infecções, no processo visual e no desenvolvimento cognitivo na infância (TINOCO et al., 2007).

Para a produção dos lipídios as leveduras são cultivadas em meios que forneçam condições ideais para o seu crescimento e desenvolvimento (DELABIO et al., 2012). Muitas espécies de leveduras são capazes de gerar e acumular lipídios em suas células. Por exemplo, várias cepas de levedura exibem produção lipídica significativa e níveis de acumulação com diferentes

substratos, como cana-de-açúcar melaço, palha de trigo e hidrolise de palha de arroz (SAWANGKEAW; NGAMPRASERTSITH, 2013).

A engenharia genética consegue melhorar a produtividade ou a composição específica dos lipídios, os quais podem ser preferivelmente obtidos em muitas leveduras do que em insetos (por exemplo, larvas de moscas de soldado preto) e plantas petrolíferas (por exemplo, soja e dendê). Em além disso, as leveduras geneticamente modificadas podem ser completamente contidas dentro do tanque de fermentação como este é um sistema fechado em contraste com o cultivo aberto de insetos ou plantas. Devido às vantagens do cultivo em um fermentador, os lipídios derivados de leveduras e fungos são potencialmente promissores matérias-primas à base de lipídios. O perfil de ácido graxo dos lipídios de leveduras e fungos cultivados em meios selecionados pode ser semelhante ao dos óleos vegetais comuns, como soja e ácido oleico alto contendo óleos de girassol (SAWANGKEAW; NGAMPRASERTSITH, 2013).

### **3.3.1. Importância da produção do Lipídio Astaxantina**

Cada vez mais as propriedades promotoras da saúde da astaxantina têm sido reveladas, o que abre novas possibilidades para uma aplicação potencial como nutracêutico e como ingrediente constitucional para cosméticos. Ademais, vários efeitos benéficos sobre a saúde são devidos à atividade antioxidante notavelmente alta da astaxantina, que se provou ser até dez vezes mais forte do que o  $\beta$ -caroteno e 100 vezes maior do que o  $\alpha$ -tocofero (MIKI et al., 1991).

É um carotenoide pertencente à família das xantofilas que pode ser encontrado em grande quantidade na microalga *Haematococcus pluvialis* e em microalgas do gênero *Chlorella* (PARK; LEE, 2001). Apesar de poder ser sintetizada por plantas, bactérias e alguns fungos, a microalga *H. pluvialis* possui a maior capacidade para o acúmulo de astaxantina na célula, podendo-se obter de 4 a 5% em relação a sua biomassa seca (YUAN et al., 2011).

O carotenoide possui atividade antioxidante e diversos estudos têm demonstrado os efeitos positivos para a prevenção e tratamento de várias doenças como, câncer, doenças crônicas inflamatórias, síndromes metabólicas,

diabetes, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e doenças nos olhos e na pele (RAO et al., 2013).

O interesse pelo uso do lipídio como corante natural na indústria de alimentos e como aditivo em rações para a aquicultura tem crescido nos últimos anos. Sua molécula apresenta dois grupos carbonila, dois grupos hidroxila e onze duplas ligações etilênicas conjugadas. Pode agir como um forte antioxidante através da doação de elétrons para radicais livres tornando-os produtos mais estáveis, bloqueando a reação em cadeia destes radicais em uma ampla variedade de organismos vivos (YUAN et al., 2011).

Sua síntese e armazenamento é intracelular e a ação destas moléculas está em desativar os radicais livres produzidos durante o metabolismo normal das células, tais como o  $O_2$ , o radical hidroxila ( $OH^-$ ), peróxidos e outros oxidantes por meio de um processo no qual a energia é transferida de altos níveis de excitação para uma molécula de carotenoide, a qual pode retornar ao estado fundamental liberando calor (BERERA et al., 2010).

A grande capacidade que as leveduras tem de crescer em vários substratos como resíduos agroindustriais, tornam-nas microrganismos promissores para a produção de carotenoides. A descoberta da produção de biomoléculas por meio de leveduras na década de 1960 e a elucidação das estruturas químicas dos pigmentos fizeram com que o interesse em produzir carotenoides por leveduras aumentasse (MALDONADE; SCAMPARINI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2007).

A produção de carotenoides pela levedura *R. glutinis* cultivada em diferentes subprodutos agroindustriais vem sendo estudada. Malisorn e Suntornsuk (2009) aplicaram um planejamento composto central rotacional para otimizar as condições de cultivo para a levedura *R. glutinis*, tendo como resposta a produção de  $\beta$ -caroteno. *Rhodotorula glutinis* é um microrganismo aeróbico capaz de produzir carotenoides em suas células, como fruto do seu metabolismo, sintetizando o  $\beta$ -caroteno, o toruleno e a torularrodina como carotenoides principais (AKSU; EREN, 2007).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. MANIPUEIRA

A manipueira utilizada foi gentilmente cedida por uma microindústria processadora de mandioca brava, da cidade de Itambé no Estado de Pernambuco, Brasil, sendo armazenada a -18 °C logo após a coleta.

#### 4.1.1. Tratamento da Manipueira

Foi realizado, primeiramente, um tratamento térmico na manipueira a 85° C durante 20 minutos para eliminar glicosídeos cianogênicos presentes, em seguida a manipueira foi resfriada. Para remoção do excesso de sólidos e consequente clarificação, foi centrifugada (centrífuga refrigerada RB7) a 3200 rpm durante 10 minutos. 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, não redutores e totais

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

Preparo das soluções utilizadas:

100 mL de NaOH 2 mol.L<sup>-1</sup>; Em Becker de 250 mL foram pesados 8g 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<sup>-1</sup>, 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 absorbância foi lida a 540 nm. Com os valores de absorbância, foi construída a curva de absorbância 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 à leitura imediatamente a 540 nm. A curva padrão foi usada para transformar a leitura de absorbância 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<sup>-1</sup> (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<sup>-1</sup>. 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<sup>-1</sup>).

#### **4.1.2.2. Determinação da 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 44 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**

O método baseia-se na adição de etanol, ácido fosfórico e um corante chamado Azul Brilhante de Coomassie G-250 à solução contendo proteínas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante da forma aniônica (vermelha)

para a forma catiônica (azul), que absorve fortemente em 595 nm (BRADFORD, 1976).

#### 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 Sólidos Solúveis Totais

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).

#### 4.1.2.7. Massa Específica

A determinação da massa específica da manueira foi realizada pela medição da massa e do volume ocupado pela mesma. Foi colocado manueira em uma proveta de 100 mL, e pesou em balança. Ao completar os 100 mL a massa foi anotada. O cálculo da densidade é obtido pela Equação:

$$\rho = \frac{m}{V} \quad (3.2)$$

Onde:

$m$  = massa (g);

$V$  = volume (mL);

### 4.2. MICRORGANISMO

A levedura *Rhodotorula glutinis*, já foi adquirida da coleção da fundação André Tosello (Campinas, São Paulo, Brasil) e se encontra armazenada no Laboratório de Processos Biotecnológicos (LABIO) do Centro de Tecnologia

(CT) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Para crescimento e manutenção as colônias foram incubadas em placas de Petri com meio YMA (Yeast Malt Agar) composto por 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 3 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 3 g.L<sup>-1</sup> de extrato de malte, 5 g.L<sup>-1</sup> de bacto peptona e 20 g.L<sup>-1</sup> 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.

#### 4.3. CULTIVO EM MEIO SINTÉTICO (YM)

Para que se tivesse uma ideia do crescimento da levedura, um cultivo utilizando-se o meio sintético foi realizado. Células de *Rhodotorula glutinis* foram diluídas em água destilada estéril e inoculadas em frascos Erlenmeyer de 1000 mL, contendo 400 mL do meio sintético. Na Tabela 1 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 25º C e 150 rpm.

Tabela 1 - Componentes do meio de cultivo sintético para crescimento da levedura.

Componente	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
Glicose	40,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
Extrato de levedura	3,0

Fonte: Frengova et. al, 1994.

#### 4.4. PREPARO DO INÓCULO

Adicionou-se 5 mL de água destilada estéril a uma placa de Petri contendo a levedura *Rhodotorula glutinis*, 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. Após o inóculo, o frasco Erlenmeyer foi levado para a incubadora tipo “Shaker” a 25º C e 150 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  $1 \times 10^7$  células.  $\text{mL}^{-1}$ .

#### **4.5. CONDIÇÕES DE CULTURA**

Os experimentos foram realizados em Biorreator de 4000 mL, contendo 3000 mL do meio de cultura (manipueira) durante 84 horas. Durante o período de fermentação, alíquotas foram removidas periodicamente durante os intervalos de tempo de 0, 12, 24, 36, 60, 72, 84h, para determinar o crescimento da levedura (biomassa), da produção de lipídios e de carotenoides.

#### **4.6. BIOMASSA**

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. Converteu-se o valor da absorvância em concentração através de uma curva padrão de biomassa.

#### **4.7. AÇÚCARES REDUTORES**

Os açúcares redutores foram quantificados ao longo do cultivo, utilizando o reagente DNS, segundo metodologia proposta por MILLER (1959). Para a quantificação foram preparadas curvas padrões com lactose, glicose e galactose, a depender do tipo de açúcar presente no meio.

#### **4.8. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CAROTENOÍDES**

A extração dos carotenoides foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Cutzu et al. (2013), com modificações. A biomassa fresca foi coletada por centrifugação a 2260xg por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram congeladas a -20 °C por 24 horas. Para a ruptura celular, as células foram descongeladas e suspensas em 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) a 60 °C, foram adicionadas pérolas de vidro de 0,1 mm de diâmetro (Sigma-Aldrich, Brasil) e esta mistura foi colocada no vortex por 2 minutos, sendo em seguida incubada a 60 °C por 15 min. Para a extração e separação dos pigmentos foram adicionados em sequência 2 mL de acetona, 2 mL de éter de petróleo e 2 mL de NaCl 20 %, posteriormente colocando-se a amostra em vortex por um tempo total de 5 min.

Esta mistura foi centrifugada a 2260xg por 10 min e a fase superior de éter de petróleo, contendo os carotenoides extraídos, foi coletada e os carotenoides totais foram quantificados como equivalentes em  $\beta$ -caroteno em espectrofotômetro com leitura de comprimento de onda em 450 nm, seguindo-se a metodologia proposta por Rodriguez-Amaya e Kimura (2004).

#### **4.9. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE LIPÍDEOS**

Para a determinação de lipídeos a biomassa foi seca a 80 °C por 24 horas e macerada em almofariz e pistilo. Em seguida pesou-se 200 mg de amostra e foi realizada uma hidrólise acida para a ruptura celular utilizando ácido clorídrico 2 N e os lipídeos foram extraídos e quantificados seguindo-se metodologia preconizada por Bligh e Dyer (1959).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. ANÁLISES QUÍMICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO SUBSTRATO

A manipueira apresentou propriedades que favorecem o crescimento de microrganismos demonstrando ser um potencial substrato para a síntese de biomoléculas, entre elas, os carotenoides. Os seguintes resultados foram obtidos a partir das análises retratadas.

Tabela 2 - Análise do substrato.

ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	
Umidade (%)	93,54 ± 0,35 (%)
Proteínas (%)	1,58 ± 0,03 (%)
Açúcares redutores (g/L)	32,24 ± 0,66 (g/L)
Açúcares não redutores (g/L)	14,928 g/L
Açúcares totais (g/L)	47,18 g/L
Cinzas	1,00 ± 0,30 (%)
Sólidos solúveis totais (°Brix)	7,3 °Brix
pH	5,3
Massa específica	93,54 ± 0,35 (%)

Fonte: Autor (2022).

Analizando a distribuição obtida para umidade, e cinzas, percebe-se que Bezerra et al. (2014), obtêm para umidade e cinzas, respectivamente, 92,27% e 2,27, enquanto que Pinto (2013), alcança valores 92,44% e 2,08, e Cereda (2001) nota resultados de 92,77% e 2,93, que são bem próximos dos obtidos neste trabalho. Apesar das proximidades, pode se justificar os desvios das cinzas pelas condições climáticas ou pelo tipo de mandioca que originou a manipueira usada em cada estudo (BEZERRA et al., 2014).

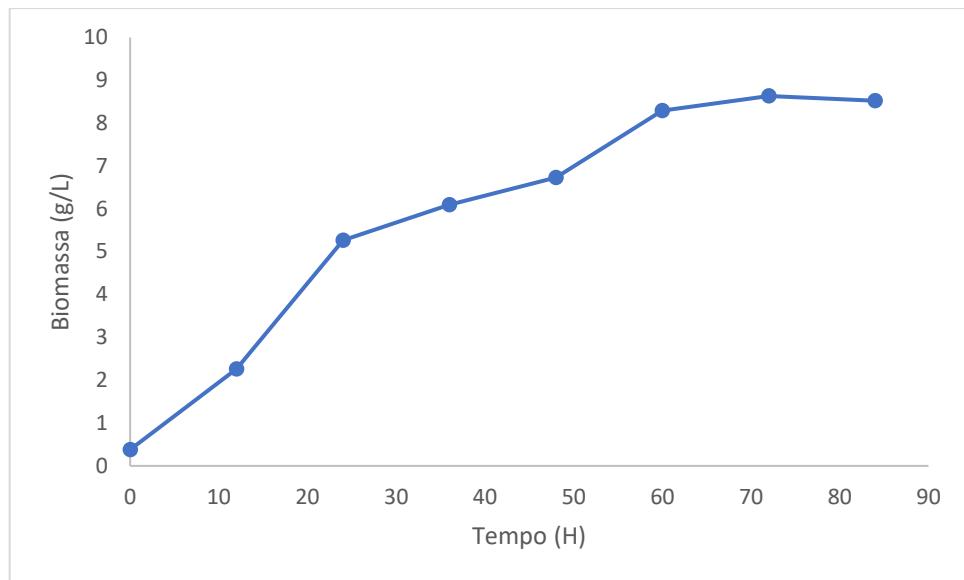
O pH influencia o crescimento da levedura e a produção de carotenoides (BEZERRA et al., 2014). Foi analisado o efeito do pH inicial do meio de cultura (2,5; 3,5; 4,5; 5,5; 6,5; 7,5 e 9,5) no crescimento e produção de carotenoides pela levedura *R. glutinis*, por Latha et al., (2005), que perceberam ao incubar o microrganismo num meio com glucose, à temperatura entre 29 a 32°C, e agitação de 200 rpm, a altos valores de pH (pH 9,5) a levedura atingiu o máximo de biomassa (9,8 g/L), enquanto a pH baixo (pH 5,5) atingiu o máximo de concentração de carotenoides (3,5 mg/L). Sendo assim, olhando o pH obtido, nota-se que há um portentoso potencial de produzir carotenoide, uma vez que se encontra num valor de 5,3.

Feltrin et al. (2000) ao analisarem as composições físico-químicas do melaço da cana de açúcar, relatam que para o crescimento de mircrorganismo, o substrato necessita atender às necessidades nutritivas e energéticas do mesmo, isto é, carbono, oxigênio, hidrogênio e nitrogênio, e com isso pode-se perceber que a manipueira possui tanto a fonte de carbono, quanto a de nitrogênio, a partir do que está explícito na tabela nos dados de açúcares totais, e proteína. No que diz respeito à proteína, na análise de Pinto (2013), obteve-se 1,19%, enquanto que neste trabalho tem-se 1,58%, evindenciando que na manipueira deste trabalho há mais proteína, e consequentemente, teria um viés biotecnológico mais positivo.

## 5.2. BIOMASSA

Nas figuras 1 e 2 têm-se os resultados para a biomassa produzida pela *Rhodotorula glutinis* e *Xantofilomices dendrorhous*, respectivamente, ao longo do tempo de cultivo.

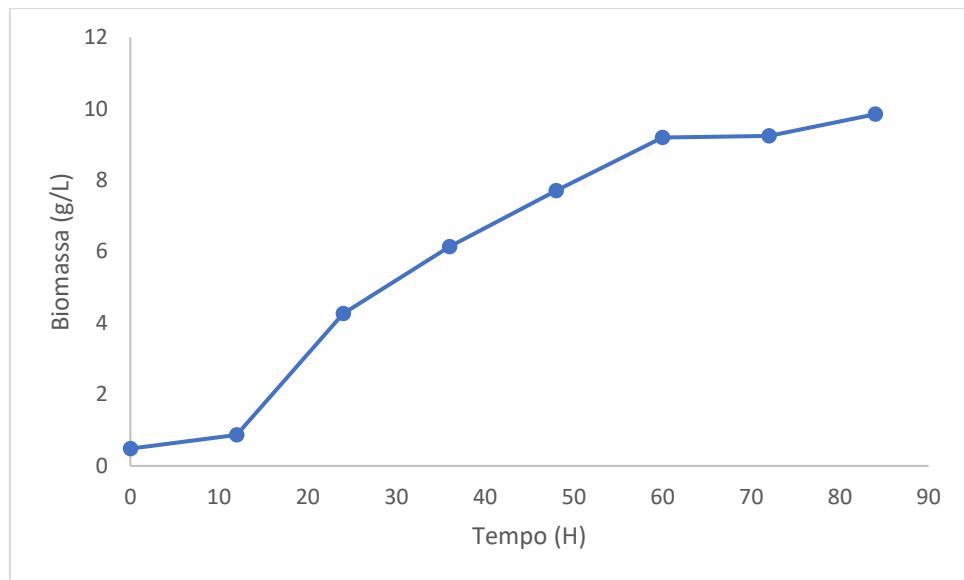
Figura 1 - Biomassa produzida pela *Rhodotorula glutinis* ao longo do tempo de cultivo.



Fonte: Autor (2022).

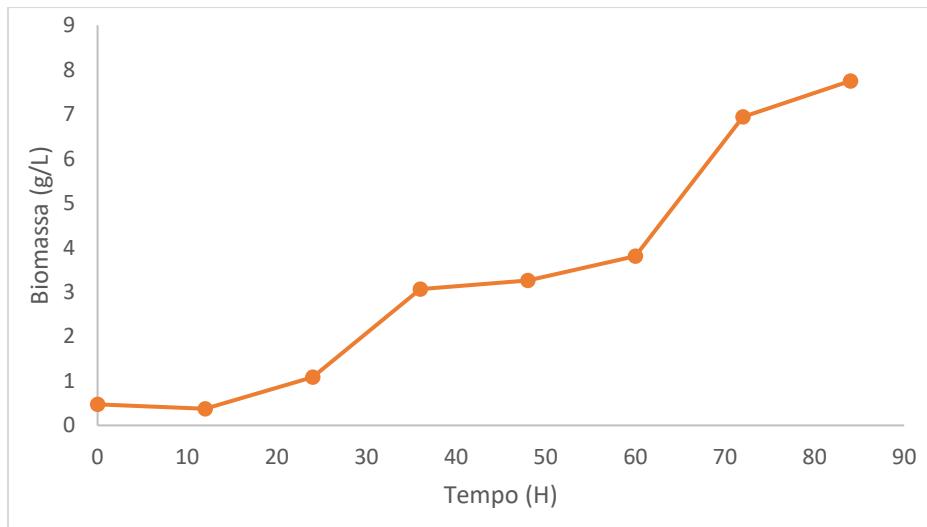
De acordo com a figura 1, o experimento obteve uma produção de biomassa de  $8,52 \text{ g.L}^{-1}$  em aproximadamente 84 horas de cultivo. Silva (2016) produziu  $6,95 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa em aproximadamente 120 horas de cultivo, usando como substrato manipueira e o microrganismo fora *Rhodotorula mucilaginosa*.

Figura 2 - Biomassa produzida pela *Xantofilomices dendrorhous* ao longo do tempo de cultivo.



Fonte: Autor (2022).

Figura 3 - Biomassa produzida pelo cultivo misto ao longo do tempo.



Fonte: Autor (2022).

De acordo com as figuras 1, 2 e 3, os experimentos obtiveram uma produção de biomassa de  $8,52 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $9,849 \text{ g.L}^{-1}$  e  $7,74 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente, em aproximadamente 84 horas de cultivo. Silva (2016) produziu  $6,95 \text{ g.L}^{-1}$  de

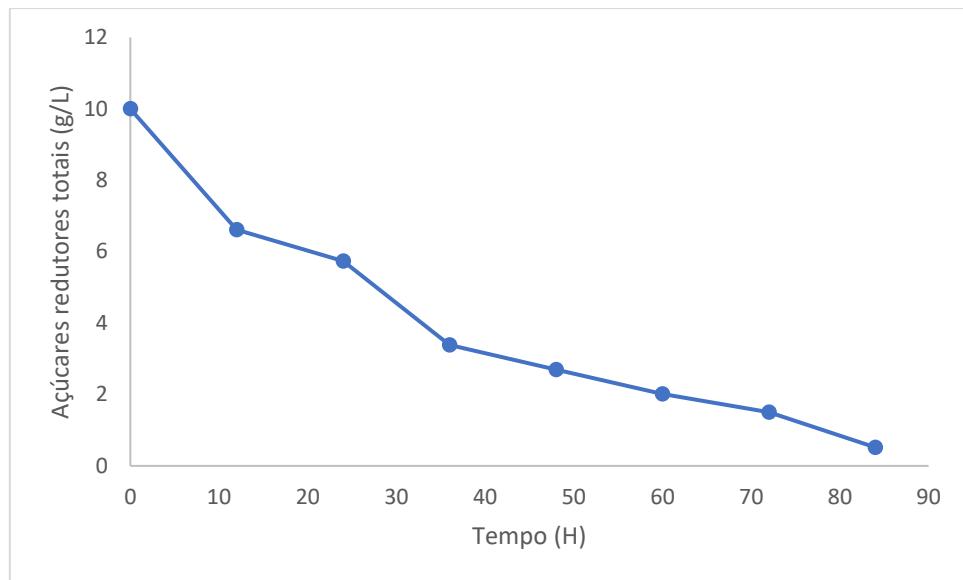
biomassa em aproximadamente 120 horas de cultivo, usando como substrato manipueira e o microrganismo *Rhodotorula mucilaginosa*.

Cazetta e Celligoi (2005) cultivaram *R. mucilaginosa* em vinhaça e melaço de cana-de açúcar e produziram  $1,62 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa utilizando um meio com 10% de melaço, e  $7,05 \text{ g.L}^{-1}$  tendo como substrato a vinhaça bruta. Reyna-Martinez et. al (2015) obtiveram  $6,27 \text{ g.L}^{-1}$  e  $6,53 \text{ g.L}^{-1}$  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. Saenge et al. (2017) encontraram uma biomassa de  $8,05 \text{ g.L}^{-1}$  para *Rhodotorula glutinis* cultivado em efluente da fábrica de óleo de palma.

### **5.3. AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS**

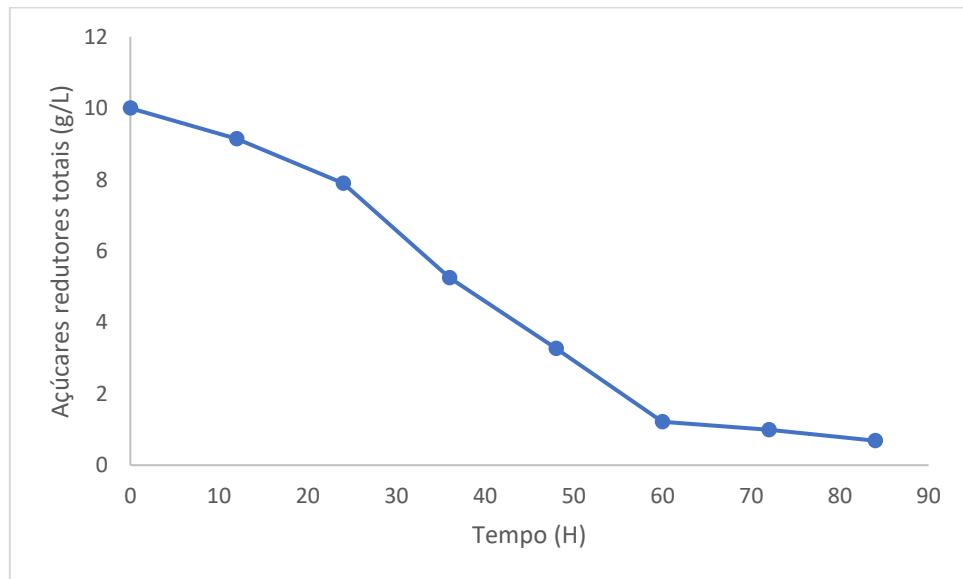
Os resultados para o consumo da fonte de carbono durante o cultivo encontram-se nas Figura 4, 5 e 6.

Figura 4 - Consumo de açúcares redutores (g.L-1 ) durante o cultivo de *Rhodotorula glutinis* em manipueira.



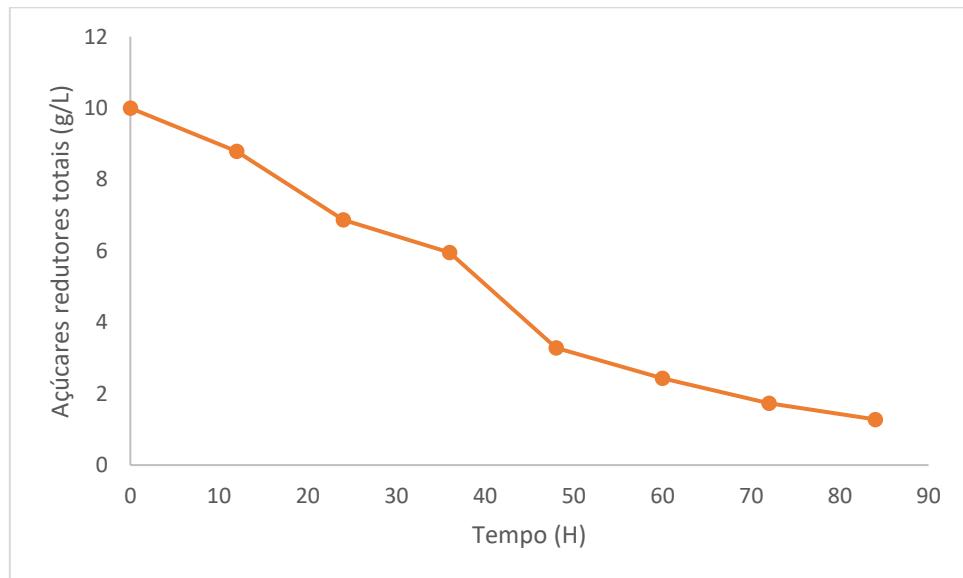
Fonte: Autor (2022).

Figura 5 - Consumo de açúcares redutores (g.L-1 ) durante o cultivo de *Xantofilomices dendrorhous* em manipueira



Fonte: Autor (2022).

Figura 6 - Consumo de açúcares redutores (g.L-1 ) durante o cultivo misto em manipueira



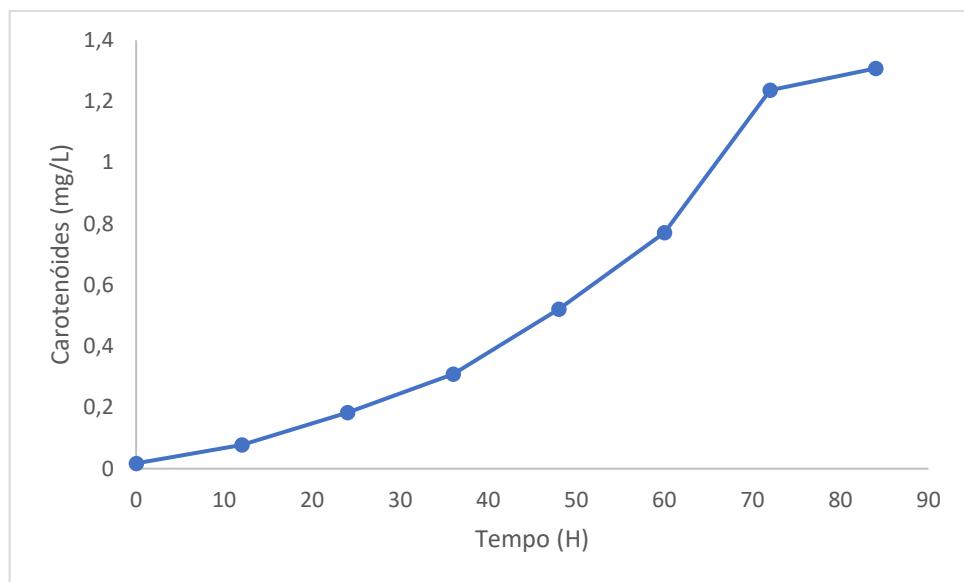
Fonte: Autor (2022).

De acordo com as figuras, obteve-se maior consumo da fonte de carbono em aproximadamente 82 horas de cultivo, quando se tem exatamente uma maior produção de biomassa. Tal fato concorda com a literatura, pois Silva (2016) relata o mesmo.

#### 5.4. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CAROTENOIDES E LIPÍDEOS

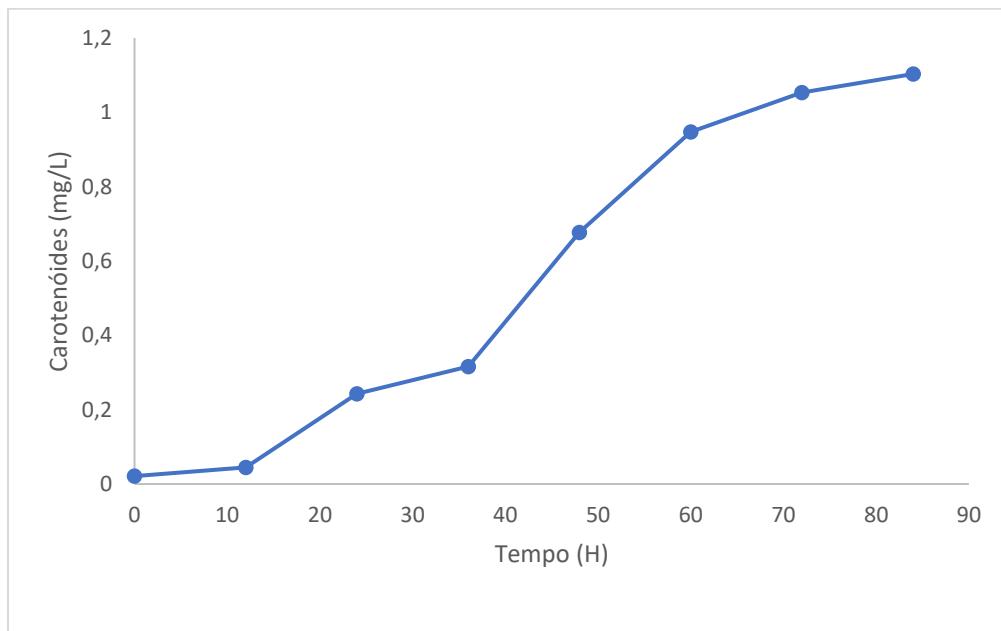
O resultado para a produção de carotenoides, durante o cultivo em manipueira, encontra-se nas figuras seguintes.

Figura 7 - Produção de carotenoides *Rhodotorula glutinis* no tempo.



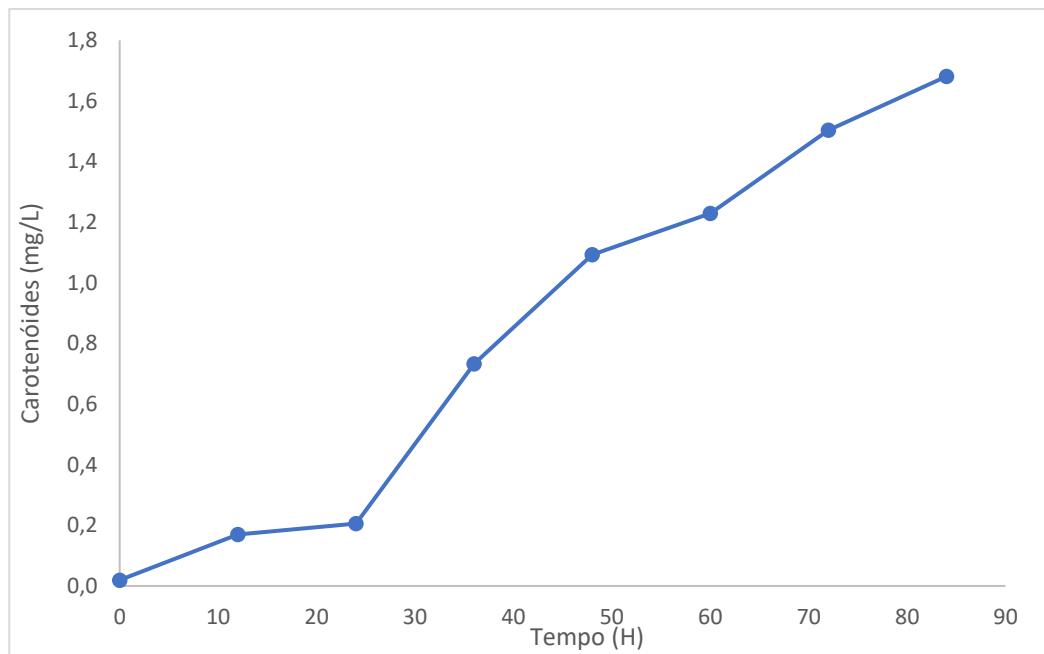
Fonte: Autor (2022).

Figura 8 - Produção de carotenoides pela *Xantofiliomices dendrorhous* no tempo.



Fonte: Autor (2022).

Figura 9 - Produção de carotenoides pelo cultivo misto no tempo.



Fonte: Autor (2022).

Quando o cultivo foi realizado com a *Rhodotorula glutinis*, a produção máxima de carotenoide do presente trabalho foi de 1,30 mg/L e a lipídica foi de 0,81 g/L, enquanto que com a *Xantofilomices dendrorhous* foi de 1,10 mg/L e a lipídica de 4,20 g/L, além disso, no cultivo misto obteve-se a produção máxima de carotenoide do presente trabalho foi de 1,68 mg/L e a lipídica foi de 5,86 g/L. Com isso, pode-se dizer que houve maior produção em relação ao que fora apresentado por Da Silva et al. (2020), o qual analisou alguns substratos para a produção, obtendo 0,54 g de lipídios/L e 0,49 mg/L de carotenoides, utilizando-se a *R. muscilaginosa* e tendo como substrato a fibra do sisal, bem como Ribeiro et al. (2019) que fizeram os cultivos usando diferentes microrganismos e substratos, e tiveram como resultado 0,98 mg/L de carotenoides e 1,34 g/L de lipídeos usando a levedura *R. glutinis* cultivada na manipueira. Cazetta e Celligoi (2005) fazem cultivo de *R. muscilaginosa* em vinhaça bruta produzindo 0,62 g de lipídios por litro de substrato, já no melaço de cana-de-açúcar, conseguiram 0,6 g/L.

Analizando a exposição de Lopes et al. (2017), estes investigam diferentes metodologias para ruptura celular na extração de carotenoides, adquirindo 93,2 mg/g de carotenoides, usando ácido acético na ruptura,

enquanto que nos cultivos realizados nesse trabalho se tem 111,6 mg/g, quando em *Rhodotorula glutinis*, 112,04 mg/g, quando em *Xantofilomices dendrorhous* e 238,04 mg/g, quando cultivo misto. Gervasi et al. (2020) investigando o cultivo com *Xantofilomices dendrorhous* no soro do leite como meio de cultura e a influência da luz na produção de carotenoide, obtêm 51 mg/g.

## 6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, verifica-se que a manipueira é um substrato promissor para ser usado na rota biotecnológica, seja na produção de biomassa, ou de carotenoides, tendo em vista que suas características fisico-químicas lhes proporciona um aporte suficiente para promover tais resultados. Além disso, observando e relacionando as características estudadas neste trabalho com outras da literatura, é mostrado que a manipueira usada possui propriedades que lhe qualifica, e a colocaria com uma maior eficiência. Ademais, a manipueira configura-se como um substrato potencial para o cultivo da levedura *R. glutinis*, a qual ao ser analisada obteve um bom rendimento na conversão, ao comparar com outros trabalhos, em função do rendimento de conversão da fonte de carbono em biomassa, lipídios e carotenoides.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKSU, Z.; EREN, A. T. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. **Biochemical engineering journal**, v. 35, n. 2, p. 107–113, 2007.
- ANDREWES, A. G., STARR, M. P. (3R, 3'R) - astaxantina da levedura *Phaffia rhodozyma*. **Journal Phytochemistry**, Califórnia, EUA, v. 15 , n. 6, p. 1009 - 1011, 2001.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. Washington D.C.: AOAC, 1018 p, 2000
- BARBATO, J. **Estudo da obtenção de carotenoides por fermentação empregando a levedura Rhodotorula sp em melaço e caldo de cana-de-açúcar como meio de cultura**. 2014. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2014.
- BARRETO, M. T. L., MAGALHÃES, A. G., ROLIM, M. M., PEDROSA, E. M. R., DUARTE, A. S., TAVARES, U. E. Desenvolvimento e acúmulo de macronutrientes em plantas de milho biofertilizadas com manipueira. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, p. 487-494, 2014.
- BENTO, C. V., DE ALMEIDA, J. B. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1º Parte - As Leveduras. **Revista Analytica**, v. 25, p. 36-42, 2006.
- BERERA, R. et al. The light-harvesting function of carotenoids in the cyanobacterial stress-inducible IsiA complex. **Chemical Physics**, v. 373, n. 1–2, p. 65–70, 2010.
- BEZERRA, J. I. G., RIBEIRO, P. H. C., HENNEG, V., SILVA, A., LOPES, H. A. P., URBANO, S. A. **PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA CARNE DE OVINOS ALIMENTADOS COM MANIPUEIRA**. 2017. Dissertaçāo (Pós Graduação em Biociências). Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2014.
- BLIGH, E. G., DYER, W. J. A. Rapid method of total lipid extraction and purification, Can. **J. Physiol**, v. 37, p. 911–917, (1959).

BRADFORD, Marion M. Um método rápido e sensível para a quantitação de quantidades de microgramas de proteína utilizando o princípio da ligação proteína-corante. **Bioquímica analítica**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CAETANO, M. L. **AVALIAÇÃO DE ETE DA INDÚSTRIA DE PROCESSAMENTO DE MANDIOCA E DE MILHO ALIMENTOS CAETANO S/A LOCALIZADA NA UGRHI 17.** 2016. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Gerenciamento de Recursos Hídricos e Planejamento ambiental em Bacias Hidrográficas) Universidade Estadual de São Paulo – UNIESP, 2016.

CATANEO, C. B., CALIARI, V., GONZAGA, L. V., KUSKOSKI, E. M., FETT, R. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, Brasil, v. 29, n. 1, p. 93-101, 2008.

CEREDA, M. P. (2001). Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. São Paulo: Fundação Cargill, 4.

COSTA, I. MARTELLI, H. L., DA SILVA, I. M., POMEROY, D. Production of  $\beta$ -carotene by a Rhodotorula strain. **Biotechnology letters**, v. 9, n. 5, p. 373-375, 1987.

COSTA, S. G., NITSHKE, M., LÉPINE, F., DÉZIEL, E., CONTIERO, J. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa L2-1 from cassava wastewater. **Process Biochemistry**, Québec, Canadá, v. 45, n. 9, p. 1511-1516, 2010.

DA SILVA, J., DA SILVA, F. L. H., RIBEIRO, J. E. S., DE MELO, D. J. N., SANTOS, F. A., MEDEIROS, L. L Effect of supplementation, temperature and pH on carotenoids and lipids production by Rhodotorula mucilaginosa on sisal bagasse hydrolyzate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 30, p. 101847, 2020.

DUARTE, A. S., SILVA, E. F. D. F. ROLIM, M. M. FERREIRA, R. F. D. MALHEIROS, S. M. ALBUQUERQUE, F. D. S. Uso de diferentes doses de manipueira na cultura da alface em substituição à adubação mineral. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Campina Grande, PB, v. 16, n. 3, p. 262-267, 2012.

FEDERICI, F., FAVA, F., KALOGERAKIS, N., MANTZAVINOS, D. Valorização de subprodutos agro - industriais, efluentes e resíduos: conceito, oportunidades e o caso das águas residuais dos lagares. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology**, v. 84, n. 6, pág. 895-900, 2009.

FELTRIN, V. P., SANT'ANNA, E. S., PORTO, A., TORRES, R. C. Produção de *Lactobacillus plantarum* em melaço de cana-de-açúcar. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 43, n. 1, p. 0-0, 2000.

GERVASI, T., SANTINI, A., BENAMEUR, Q., DUGO, G., GERVAZI, C., PELIZZERI, V., CICERO, N. Valorização de matérias-primas da indústria agrícola para produção de astaxantina e  $\beta$ -caroteno por *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Pesquisa de produtos naturais**, v. 32, n. 13, p. 1554-1561, 2018

GOLUBEV, W. I. Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). **Yeast**, Russia v. 11, n. 2, p. 101-110, 1995.

KOBAYASHI, M., KAKIZONO, T., NAGAI, S. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 867-873, 1993.

LATHA, B. V. et al. Influence of growth factors on carotenoid pigmentation of *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY from natural source. **Indian J Biotechnol**, v.4, p. 355-357, 2005.

LAUFENBERG, G., KUNZ, B., NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource technology**, Finlândia, v. 87, n. 2, p. 167-198, 2003.

LOPES, N.A., REMEDI, R.D., SÁ, C.S., BURKET, C.A.V., BURKET, J.F.M. Different cell disruption methods for obtaining carotenoids by *Sporodiobolus pararoseus* and *Rhodotorula mucilaginosa*. **Food Sci. Biotechnol**, v. 26, 759-766, 2017.

- MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D., FERNANDEZ-SEVILLA, J. M., FERNANDEZ, F. A., GARCIA, M. C., GRIMA, E. M. Supercritical fluid extraction of carotenoids from *Scenedesmus almeriensis*. **Food Chemistry**, v. 123, n. 3, p. 928-935, 2010.
- MAKRIS, D. P.; BOSKOU, G.; ANDRIKOPOULOS, N. K. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 2, p. 125-132, 2007.
- MALDONADE, I. R.; SCAMPARINI, A. R. P.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region, Brazil. **Brazilian journal of microbiology**, v. 38, p. 65–70, 2007.
- MALISORN, C.; SUNTOURNSUK, W. Improved  $\beta$ -carotene production of *Rhodotorula glutinis* in fermented radish brine by continuous cultivation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, n. 1, p. 27–32, 2009.
- MIKI, W., UTSUMI, K., KONOSU, S., YAMAGUCHI, K., KORNOTO, K., KOMURA, H., MINAKATA, H., KAMATANI, Y., BRITTON, G. Biological functions and activities of animal carotenoids. **Pure Applied Chemistry**, Japão, v. 63, n. 1, p. 141-146, 1991.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analitical Chemistry**, v.31, p.426 – 428, 1959.
- MILLER, M.W., YONEYAMA, M., SONEDA, M. Phaffia, um novo gênero de levedura na Deuteromycotina (Blastomycetes). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Califórnia, EUA v. 26, n. 2, pág. 286-291, 1976.
- MOREIRA, N. X., CURI, R., MANCINI FILHO, J. Ácidos graxos: uma revisão. **Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr**, p. 105-123, 2002.
- NOVELLO, D., FRANCESCHINI, P., QUINTILIANO, D. A. A importância dos ácidos graxos  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 para a prevenção de doenças e na saúde humana. **Revista Salus**, v. 2, n. 1, 2008.

Pinto, P. H. M., Camili, E. A., Cabelo, C. Processo de flotação no tratamento da manipueira originada da fabricação de farinha de mandioca. **RETEC-Revista de Tecnologias**, v.3, n.1, p. 53-62, 2010.

RAO, A. R. et al. In vivo bioavailability and antioxidant activity of carotenoids from microalgal biomass - A repeated dose study. **Food research international**, v. 54, n. 1, p. 711 - 717, 2013.

RIBAS, M. M. F. CEREDA, M. P.; VILLAS BÔAS, R. L. Use of cassava wastewater treated anaerobically with alkaline agents as fertilizer for maize (*Zea mays L.*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, PR, v. 53, n. 1, p. 55-62, 2010.

RIBEIRO, J. E. S., DA SILVA, S. A. M., MARTINI, M., SORCE, C., ANDREUCCI, A., DE MELO, D. J. N., DA SILVA , F. L. H. Cultivo de *glutinis* de *Rodotorula* em águas residuais de mandioca para a geração de carotenoides e ácidos graxos. **Biocatálise e Biotecnologia Agrícola**, v. 22, p. 101419, 2019.

ROSA, M. F., SOUZA FILHO, M. S. M., FIGUEIREDO, M. C. B., MORAIS, J. P. S., SANTAELLA, S. T., LEITÃO, R. C. Valorização de resíduos da agroindústria. **II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais-II SIGERA**. Foz do Iguaçu, PR, v. 1, p. 98-105, 2011.

SAENGE C., CHEIRSILP B., SUKSAROGE T, T., BOURTOOM T. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids, **Process Biochem**, v. 46, p. 210–218, 2011.

SAWANGKEAW, R., NGAMPRASERTSITH, S. Uma revisão das biomassas à base de lipídios como matéria-prima para a produção de biocombustíveis. **Revisões de energia renovável e sustentável** , v. 25, p. 97-108, 2013.

SCHMIDT, I., SCHEWE, H., GASSEL, S., JIN, C., BUCKINGHAM, J., HUMBERLIN, M., SCHRADER, J. Produção biotecnológica de astaxantina com *Phaffia rhodozyma* / *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Microbiologia aplicada e biotecnologia**, Alemanha, v. 89, n. 3, pág. 555-571, 2011.

- SILVA, J. D. **Obtenção de lipídios por processo biotecnológico utilizando a manipueira como substrato.** Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba - João Pessoa, Paraíba, 2016.
- SILVA, M. M. C. D., RODRIGUES, M. T., BRANCO, R. H., RODRIGUES, C. A. F., SARMENTO, J. L. R., QUEIROZ, A. C. D., SILVA, S. P. D. Suplementação de lipídios em dietas para cabras em lactação: consumo e eficiência de utilização de nutrientes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 1, p. 257-267, 2007.
- SQUINA, F. M. **Estudos com carotenoides de leveduras do gênero Rhodotorula: desenvolvimento de método analítico, influência de inibidores e cultivo em meio alternativo a base de caldo de cana-de-açúcar.** 2001. Dissertação (mestrado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2001.
- TINOCO, S. M. B., SICHLERI, R., MOURA, A. S., SANTOS, F. D. S., CARMO, M. D. G. T. D. Importância dos ácidos graxos essenciais e os efeitos dos ácidos graxos trans do leite materno para o desenvolvimento fetal e neonatal. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 3, p. 525-534, 2007.
- URNAU, L., TIGGEMANN, L., COLET, R., STEFFENS, C., VALDUGA, E. BIOPRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR *Xanthophyllomyces dendrorhous* Y-10921 EM FRASCOS AGITADOS VARIANDO COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES OPERACIONAIS. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 1372-1377, 2015.
- VISSE, H., SANDMANN, G., VERDOES, J. C. *Xanthophylls* in fungi. In: Processos e produtos microbianos. **Microbial Processes and Products. Methods in Biotechnology**, Humana Press, Totowa, Nova Jersey, v. 18, p. 257-272, 2005.
- YOON, S. H.; RHEE, Joon Shick. Lipid from yeast fermentation: effects of cultural conditions on lipid production and its characteristics of *Rhodotorula glutinis*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 60, n. 7, p. 1281-1286, 1983.

YUAN, J. et al. Potential health-promoting effects of astaxanthin: a high-value carotenoid mostly from microalgae. **Molecular nutrition & food research**, v. 55, n. 1, p. 150– 165, 2011.