UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS

ANA FLÁVIA SOUTO BARBOSA

CULTIVO DE *RHODOTORULA GLUTINIS* EM MANIPUEIRA PARA A PRODUÇÃO DE SUPLEMENTO VITAMÍNICO E PROTEICO

Vitória da Conquista, BA
2017

ANA FLÁVIA SOUTO BARBOSA

CULTIVO DE *RHODOTORULA GLUTINIS* EM MANIPUEIRA PARA A PRODUÇÃO DE SUPLEMENTO VITAMÍNICO E PROTEICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Giovanilton Ferreira da Silva

Instituto Federal da Bahia – UFBA

Co-orientadora: Profa. Dra. Patrícia Lopes Leal

Universidade Federal da Bahia – UFBA

Vitória da Conquista, BA
2017

Ao meu esposo Lucas Amorim Silveira que esteve sempre ao meu lado, me incentivando e me ajudando. Que pacientemente me acompanhava no laboratório e sempre torceu para que eu alcançasse os meus objetivos. A ele o meu melhor.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores que acreditaram em mim e que sempre me ajudaram nos momentos de dificuldade, sempre com muita paciência e disposição. Ao meu colega Carlos Augusto que foi mais que um colega, foi um amigo fiel que esteve comigo durante a pesquisa e colaborou muito para a obtenção dos resultados. Aos meus familiares que me apoiaram e me incentivaram especialmente o meu marido. Ao órgão de fomento FAPESB, pelo apoio financeiro.

Que nada nos limite, que nada nos defina, que nada nos sujeite. Que a liberdade seja nossa própria substância, já que viver é ser livre. (Simone de Beauvoir)

RESUMO

BARBOSA, Ana Flávia Souto. Manipueira para a produção de suplemento vitamínico e proteico. 23, de março de 2017. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2017.

A manipueira é o resíduo líquido gerado pela produção de farinha de mandioca, descartado indevidamente ele causa prejuízos ao meio ambiente, devido a presença do glicosídio linamarina que quando hidrolisado geraa ácido cianídrico que é tóxico. Apesar de ser tóxica a manipueira tem propriedades físico-químicas interessantes para o cultivo de microrganismos e já tem sido testado por vários autores. O betacaroteno é o carotenoide com maior bioconversibilidade em vitamina A, que possui atividades antioxidantes além de servir de corante na indústria alimentícia. A produção biotecnológica de carotenoides é interessante devido à preocupação atual com o uso de aditivos químicos em alimentos e cosméticos, dentre os microrganismos produtores de betacaroteno a levedura *Rhodotorula glutinis* possui as vantagens de ter uma alta taxa de crescimento e por produzir quantidades significativas de carotenoides. O trabalho teve por objetivo avaliar a viabilidade do uso da manipueira coletada nas casas de farinha de Vitória da Conquista - BA como substrato para a produção de betacaroteno. Seguindo um planejamento experimental fatorial 2^3, realizou-se fermentações em meio sintético e em manipueira e observou-se que as melhores condições para a produção tanto de biomassa quanto de betacaroteno foram em pH 7, 150 rpm e 37°C. através da análise de variância, verificou-se que as variáveis ph, agitação e temperatura, quando em conjunto, exercem mais influência sobre a produção de betacaroteno do que individualmente. A manipueira se apresentou como um substrato promissor para o cultivo de *Rhodotorula glutinis* e também para a produção de betacaroteno.

Palavras-chave: Manipueira, Betacaroteno, *Rhodotorula glutinis*, Planejamento Fatorial, Fermentação.

ABSTRACT

Cassava wastewater is the residue from the production of cassava flour. It causes damages to the environment when discarded improperly due to the produced hydrocyanic acid that is toxic. Cassava wastewater has interesting physicochemical properties for the fermentation of microorganisms. Betacarotene is the carotenoid with the highest biotransformation in vitamin A. It has antioxidant activities, besides to be used as dye in the food industry. The biotechnological production of carotenoids is interesting because of current concern about chemical additives in food and cosmetics. Among microorganisms that synthesize betacarotene, *Rhodotorula glutinis* has the advantages of having a high growth rate and producing significant amounts of carotenoids. The aim of this work was to evaluate the feasibility of manipueira, collected in flour houses of Vitória da Conquista - BA, as substrate for the biosynthesis of betacarotene. A factorial experimental design 2^3 was used. The best assay conditions were pH 7, agitation speed 150 rpm and temperature 37 °C. The cassava wastewater presented as a promising substrate for fermentation of *Rhodotorula glutinis* and also for production of betacarotene.

Key words: Cassava wastewater, Betacarotene, *Rhodotorula glutinis*, Factorial Design, Fermentation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1
2. JUSTIFICATIVA 2
3. OBJETIVOS 4
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 5
4.1. Manipueira 5
4.2 Carotenoides 7
4.3 Rhodotorula glutinis 11
4.4 Variáveis que alteram a produção de carotenoides por leveduras 12
5. METODOLOGIA 14
5.2 Microrganismo 14
5.3 Reativação da R. glutinis 14
5.4 Preparo do inóculo 15
5.5 Fermentações 15
5.2 Planejamento experimental fatorial 16
5.6 Extração do betacaroteno 18
5.7 Análise físico-química do substrato 19
5.7.1 Determinação de proteínas 19
5.7.2 Determinação de cinzas 20
5.7.3 Determinação de umidade 20
5.7.4 Determinação de açúcares redutores 21
5.7.5 Curva de calibração de açucares redutores 21
6. REFERÊNCIAS 22
7. Artigo: CULTIVO DE Rodothorula glutinis EM MANIPUEIRA PARA PRODUÇÃO DE SUPLEMENTO VITAMINICO E PROTEICO 30

1. INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* CRANTZ*)*, da família das Euforbiáceas, é uma espécie de origem latino-americana e sua produção está voltada principalmente para o consumo humano. Mais de 80 países produzem mandioca, sendo que o Brasil participa com mais de 15% da produção mundial, com cerca de 25 milhões de toneladas de raízes. (NEVES *et al*., 2014).

A manipueira é o resíduo líquido gerado nas indústrias de processamento de mandioca, sendo um dos resíduos mais prejudiciais ao ambiente, não só por possuir elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO), mas também por conter cianeto de hidrogênio, torna-se venenoso e é descartado na maioria das vezes de forma concentrada e em grande quantidade a céu aberto ou em cursos d'água, gerando danos ao meio ambiente (CAMILI, 2007; DE JESUS, 2016).

A disposição no ambiente de resíduos gerados em diversas atividades domésticas, comerciais e industriais tem resultado em frequentes relatos de problemas de poluição ambiental. Tais problemas, juntamente com a conscientização da população, levaram as autoridades a elaborar medidas efetivas para minimizar a poluição. Entre essas medidas, podem ser citadas as reduções da quantidade de resíduo geradas, a utilização de tecnologias que permitam gerar resíduos menos poluentes, o tratamento adequado dos resíduos antes da disposição no ambiente e o aproveitamento dos resíduos em outras atividades (PINTO, 2010). Uma forma interessante de aproveitamento do resíduo da mandioca é a sua utilização como substrato para a produção de biomoléculas a partir da fermentação por microrganismos, como por exemplo, carotenoides.

Os carotenoides são corantes naturais responsáveis pelas cores amarelas, laranja e vermelho, utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica, de cosméticos e ração. Além de seu amplo uso como corantes e no enriquecimento de alimentos, também são utilizados devido a sua atividade pró-vitamínica A e as propriedades que resultam em possíveis funções biológicas benéficas à saúde, tais como o fortalecimento do sistema imunológico e a diminuição do risco de doenças degenerativas (certos tipos de câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular e catarata) (NIIZU, 2003).

A possibilidade da produção de corantes naturais em escala industrial e o elevado valor dos produtos tornam a produção biotecnológica de carotenoides uma área de intenso estudo. Este tipo de produção vem se destacando devido a fatores tais como

possibilidade de utilização de substratos de baixo custo para a bioprodução; denominação de substâncias naturais; pequeno espaço para produção, não estando sujeita às condições ambientais como clima, estação do ano ou composição do solo, e controle das condições de cultivo (LIU *et al*., 2009).

Dentre os estudos realizados, destaca-se a produção de carotenoides pelos microrganismos *Rhodotorula*, *Phaffia rhodozyma*, *Sporobolomyces*, *Blakeslea trispora*, *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis*, sendo que os carotenoides naturais mais investigados são a astaxantina, β-caroteno, cantaxantina, toruleno e licopeno (VALDUGA *et al*., 2009).

Os carotenoides sintetizados por microrganismos têm sido continuamente estudados e seu potencial reconhecido. A principal razão para utilizar microrganismos para produzir carotenoides, relaciona-se à facilidade de aumentar a síntese desse composto pela manipulação ambiental e genética. Os custos de carotenoides produzidos por fermentação também podem ser minimizados pelo uso de subprodutos industriais de baixo custo como fonte de nutrientes (AKSU; EREN, 2005; MALDONADE 2008).

Assim, a produção biotecnológica de carotenoides é de crescente interesse, especialmente os de origem microbiana. Dentre estes microrganismos, a *Rhodotorula glutinis* é conveniente para a produção em grande escala por via fermentativa, devido à sua elevada taxa de crescimento e baixas necessidades nutricionais (WANG *et al*., 2008). Além disso, sendo o substrato um resíduo, reduz os custos do processo e a sua utilização se torna interessante como forma de biorremediação (DE JESUS, 2006).

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo estudar o processo de obtenção de carotenoides por fermentação utilizando a levedura *Rhodotorula glutinis* como biocatalisador do processo, empregando a manipueira (resíduo do processamento da mandioca) como meio de cultivo para o microrganismo; e avaliar a influência das diferentes condições de cultivo na produção de carotenoides.

2. JUSTIFICATIVA

O cultivo da mandioca se estende por todo o Brasil, seja como lavouras de subsistência ou como plantios para fins comerciais. Estima-se que a produção alcança 25 milhões de toneladas de raízes ao ano e que 60% seja destinada à industrialização (CORREIA & DEL BIANCHI., 2008).

A produção de mandioca da microrregião de Vitória da Conquista – Ba é de 428.500 toneladas. Considerando-se que o rendimento da manipueira é de 30%, com o processamento dessa produção seriam gerados 128.551 m^3 de manipueira, algo espantoso e que necessita de um destino ambientalmente seguro (NEVES *et al*., 2014).

Nas últimas décadas, verifica-se uma crescente preocupação com o gerenciamento de resíduos, qualquer que seja sua origem (urbana ou agrícola), justificada pela necessidade de redução do uso dos recursos naturais e pelo crescimento populacional (NEVES *et al*., 2014). Uma atenção especial tem sido voltada à minimização ou reuso de resíduos e ao estabelecimento de novos usos de produtos e subprodutos agropecuários (ROSA, 2011).

Uma forma interessante de utilização da manipueira é como substrato para produção de biomoléculas a partir da sua fermentação por microrganismos, como os carotenoides que são compostos valiosos com muitas aplicações, como por exemplo nas indústrias nutracêutica, cosmética e sobretudo alimentar. Estes pigmentos têm sido utilizados há muito tempo como corantes alimentares e, devido às suas fortes propriedades antioxidantes, têm uma ampla gama de funções relacionadas com a saúde (JASWIR *et al.*, 2011).

Sabe-se que o mercado global de carotenoides alcançou US$ 1,2 bilhão em 2010, de US 1,5 bilhão em 2014 e deverá atingir quase US $ 1,8 bilhão em 2019, com uma taxa composta de crescimento anual de 3,9%. Isso demonstra um forte interesse econômico neste tipo de produto (BCC RESEARCH, 2011).

A produção biotecnológica de carotenoides tem se destacado devido a fatores tais como: possibilidade de utilização de substratos de baixo custo para a bioprodução; denominação de substâncias naturais; pequeno espaço para produção, não estando sujeita às condições ambientais como clima, estação do ano ou composição do solo, e controle das condições de cultivo (LIU *et al.*, 2009).

A otimização de um processo fermentativo leva a maiores rendimentos no produto desejado e/ou aumento na sua produtividade, o que reflete diretamente nos custos de produção (PARK *et al*., 2005). Contudo, custos associados com a aquisição das matérias-primas podem inviabilizar economicamente uma rota produtiva. Diferentes autores vêm sinalizando que a produção de carotenoides em larga escala fermentativa é viável se coprodutos agroindustriais forem utilizados como fontes de nutrientes (AKSU

& EREN, 2005; PARK *et al*., 2005; TINOI *et al*., 2005 e MANTZOURIDOU *et al*., 2006).

Tendo em vista os fatores mencionados, a manipueira é um substrato interessante e de baixo custo para produção microbiológica de carotenoides. Este projeto visa, além de diminuir a produção de um resíduo que é poluente, produzir uma molécula de importância na indústria alimentícia e de interesse farmacológico, agregando valor à cultura da mandioca. Em suma, os potenciais nutricional e farmacêutico tornam os derivados da vitamina. A produção de derivados de vitamina A via rota microbiológica é um processo menos agressivo ao meio ambiente, uma vez que não utiliza reagentes com alto grau de insalubridade e solventes, assim, espera-se uma redução no impacto ambiental.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Esse trabalho objetivou estudar os parâmetros da produção microbiológica de betacaroteno (derivado da vitamina A) utilizando a levedura *Rodothorula glutinis* e como substrato, a manipueira produzida pelas casas de farinha da região de Vitória da Conquista – Bahia, a fim de otimizar o processo de produção.

Objetivos Específicos

(a) Determinar a partir de planejamento experimental as seguintes variáveis: temperatura, pH e velocidade de agitação da produção de betacaroteno em mesa rotatória usando a manipueira como substrato;

(b) Estudar a produção do betacaroteno em sistemas batelada simples capazes de aumentar o rendimento e a produtividade do processo visando uma produção em maior escala (experimentos em fermentadores);

(c) Avaliar a quantidade de betacaroteno produzido.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Manipueira

Nas últimas décadas verifica-se uma crescente preocupação com o gerenciamento de resíduos, qualquer que seja sua origem (urbana ou agrícola), justificada pela necessidade de redução do uso dos recursos naturais e pelo crescimento populacional (NEVES *et al*., 2014). Atenção especial tem sido voltada à minimização ou reuso de resíduos e ao estabelecimento de novos usos de produtos e subprodutos agropecuários (ROSA, 2011).

A mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) é uma planta perene, arbustiva, pertencente a família das Euforbiáceas, usada na alimentação humana e animal ou como matéria prima para diversas indústrias. O cultivo da mandioca se estende por todo o Brasil, seja como lavouras de subsistência ou como plantios para fins comerciais. A parte mais importante da planta é a raiz que é rica em fécula. Estima-se que a produção alcança 25 milhões de toneladas de raízes ao ano e que 60% seja destinada à industrialização (CAMILLI, 2005). Dos 20 a 25 milhões de toneladas de mandioca produzidas por ano no Brasil até 2008, apenas cerca de 2 milhões são destinadas a produção de amido, sendo à maior parte da produção destinada à fabricação de farinha (INOUE, 2008).

Do beneficiamento das raízes de mandioca para fabricação de farinha de mesa e fécula são gerados dois tipos de resíduo: os sólidos, compostos pelas partes lenhosas das raízes, pelas porções fibrosas retidas em peneiras e pelos bagaços da mandioca; e os líquidos, constituídos da água de lavagem das raízes e da água de prensagem da mandioca, esta última comumente denominada manipueira (INOUE *et al*., 2011). A manipueira é o liquido residual gerado na prensagem da massa de mandioca ralada, para a produção da farinha de mandioca, sendo um dos resíduos mais prejudiciais ao ambiente, não só por possuir elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO), como também pela alta concentração de ácido cianídrico, altos teores de potássio, magnésio, cálcio e fósforo (CAMILI, 2005).

Segundo da SILVA JÚNIOR (2012) a manipueira contém de 5 a 7 % de fécula, glicose, ácido cianídrico, bem como outras substâncias orgânicas (carboidratos, proteínas e lipídeos) e nutrientes minerais.

A produção de mandioca da microrregião de Vitória da Conquista – BA é de 428.500 toneladas. Considerando-se que o rendimento da manipueira é de 30%, com o processamento dessa produção seriam gerados 128.551 m^3 de manipueira, algo espantoso e que necessita de um destino ambientalmente seguro (NEVES *et al*., 2014). Sabe-se que essa é uma grande região produtora de farinha e que em 2009, apresentava quase 500 pequenas casas de farinha, que não se preocupavam com o destino dos resíduos do processamento (NEVES *et al*., 2014).

Vários mecanismos de gerenciamento deste resíduo e agregação de valor do mesmo têm sido estudado. Por exemplo, este resíduo pode destinar-se, no campo, à irrigação e fertilização, ao controle de ervas daninhas, bem como tem aplicação como substrato para diversos microrganismos (AQUARONI, 2001). VIEITES (1998) e DUARTE (2012) propuseram o uso da manipueira como fertilizantes, e outros estudos apontam a possibilidade de aplicação como herbicida (FIORETTO, 1985), inseticida (PONTE *et al*., 2001), nematicida (PONTE & FRANCO, 1981; SENA & PONTE, 1982) e surfactantes (OLIVEIRA., 2014). A utilização deste resíduo como substrato para o crescimento de microrganismos também foi testada, com exemplos na produção de células ricas em óleo (WOSIACKI, 1994), produção de proteína microbiana, aromas (DAMASCENO, 2001), além de biogás (BARANA, 2000).

LEONEL & CEREDA (1994) relataram, em seu trabalho intitulado "Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*", que era viável utilizar o resíduo da prensagem da mandioca para produzir bioprodutos, mesmo o resíduo recém coletado da indústria mostrou ser um bom substrato, não diferindo da produção de ácido cítrico utilizando meio sintético. Mais recentemente, de JESUS e colaboradores (2016), em seu estudo sobre a Produção de lipase utilizando manipueira como fonte alternativa de carbono, relataram que o *Bacillus subtilis* foi capaz de produzir a enzima lipase por meio de fermentação submersa utilizando como fonte de carbono, a manipueira tratada, não sendo necessária a adição de indutores enzimáticos.

A manipueira pode ser empregada como matéria-prima em processos industriais, por apresentar altas concentrações de carboidratos, nitrogênio e sais minerais (CORDEIRO, 2006). da SILVA e colaboradores (2016) afirmaram que o biodigestor é um método de tratamento de resíduos que propicia um desenvolvimento sustentável e

contínuo. Eles investigaram dez empresas processadoras de mandioca que utilizam a biodigestão dos resíduos da mandiocultura, demostrando que seu uso contribui para o desempenho econômico e ambiental quando aplicada a este tipo de indústria.

Em conformidade com CARDOSO (2005), a composição química da manipueira é rica em potássio, nitrogênio, magnésio, fósforo, cálcio e enxofre, além de ferro e micronutrientes em geral. A maior parte de carga orgânica presente ser composta de açúcares solúveis (CEREDA, 1996). A composição da manipueira permite o crescimento de microrganismos anaeróbios, pois estes toleram substratos contendo cianeto. Por outro lado, os microrganismos aeróbios são sensíveis ao cianeto porque afeta a formação de adenosina trifosfato (ATP), que atuam sobre a fosforilação oxidativa através da combinação com o citocromo oxidase, inibição do transporte de elétrons (CEREDA, 2000).

As características da raiz podem interferir na composição da manipueira dela extraída. Segundo DEL BIANCHI (1998), são vários os fatores que podem afetar a composição da mandioca, entre eles a época, o tipo de solo, a temperatura, a altitude, a umidade e a variedade cultivada.

As características físico-químicas da manipueira de Vitória da Conquista podem ser interessantes na produção de carotenoides, além o aproveitamento da manipueira, resíduo de toda a indústria da mandioca tem grande potencial tanto para o setor industrial quanto para cooperativas de pequenos produtores de farinhas. A utilização da manipueira de forma racional poderia diminuir os impactos ambientais causados pelo descarte inadequado da mesma.

4.2 Carotenoides

Os carotenoides são isoprenóides lipofílicos sintetizados por todos os organismos fotossintéticos (incluindo plantas, algas e cianobactérias), e também por algumas bactérias não-fotossintéticas e fungos. Duas classes de carotenoides são encontradas na natureza: os carotenos, tais como beta-caroteno, hidrocarbonetos lineares que podem ser ciclizados em uma ou ambas as extremidades da molécula; e os derivados oxigenados de carotenos, como luteína, violaxantina, neoxantina e zeaxantina, denominados xantofilas (BOTELLA-PAVÍA & RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2006).

Estes compostos são tetraterpenos constituídos por 40 átomos de carbono. A parte central da molécula contém um sistema alternado de ligações duplas e simples. São estas ligações duplas conjugadas que conferem aos pigmentos a sua cor que, dependendo da absorção, varia de amarelo a vermelho. O primeiro precursor específico na biossíntese dos terpenóides é o ácido mevalônico (FRENGOVA & BESHKOVA, 2009; YAHIA & ORNELA-PAZ, 2010).

A biossíntese dos carotenos inicia-se com um precursor primário, representado pelo acetato, que segue o processo da biogênese de esteróis até as unidades isoprenóides ativas: isopentenil-pirofosfato (C5), geranil pirofosfato (C10) e farnesil pirofosfato (C15), a partir daí, diversificam-se os carotenos produzidos (VILLELA *et al*., 1976). A primeira etapa da biossíntese do carotenoide envolve a formação de geranil pirofosfato e a sua conversão em fitoeno, através da ação da enzima fitoeno esterase. Esse primeiro caroteno não apresenta coloração. Através de uma série de desidrogenações, outros carotenos são formados (MALDONADE, 2003). As últimas etapas do caminho biossintético dos carotenoides, destacando a formação dos principais carotenoides em alimentos são apresentados na Figura 1.

Figura 1. Fluxograma dos estágios da biossíntese de carotenoides (SILVA, 2004).

Os carotenoides são compostos valiosos com muitas aplicações em indústrias nutracêutica, cosmética e sobretudo alimentar. Estes pigmentos têm sido utilizados há muito tempo como corantes alimentares e, devido às suas fortes propriedades antioxidantes, têm uma ampla gama de funções relacionadas com a saúde (JASWIR *et al*., 2011).

Os corantes têm sido intensivamente utilizados pelas empresas do setor alimentício para conferir, intensificar, restaurar ou alterar a coloração de alimentos e bebidas, com o propósito de atribuir uma aparência natural aos produtos industrializados, ou, tão somente, torná-los mais atrativos (CONSTANT, STRIGHETA & SANDI, 2002; ANVISA, 2014). A manutenção da cor natural do alimento se constitui num fator fundamental para o marketing do produto, em face da primeira avaliação do consumidor frente a um novo produto e, em consequência, o uso de corantes tem sido crescente na indústria de alimentos (SATO *et al*., 1992).

A importância da indústria de corantes decorre do fato de que um dos problemas que ocorre com os alimentos é a alteração de sua cor natural após a colheita, no armazenamento e, principalmente, no processamento, quando expostos a altas temperaturas, ou em presença de outros componentes e aditivos que alteram seu nível de acidez (SATO *et al*., 1992).

Os carotenoides mais úteis são obtidos por síntese química ou extraídos de plantas, e a maioria dos processos biotecnológicos utilizados para pigmentos são baseados no cultivo de microrganismos, tais como leveduras e microalgas. Entretanto, devido à preocupação com o uso de aditivos químicos em alimentos, houve um crescente interesse nos carotenoides obtidos naturalmente por processos biotecnológicos (DUFOSSÉ, 2009).

Em especial, as indústrias alimentícias fazem uso de corantes artificiais, que, dependendo da concentração ingerida, pode acarretar diferentes reações adversas, a curto e em longo prazo, tais como reações alérgicas, ação mutagênica e carcinogênica, anemias e mortalidade de fetos entre outros (ANTUNES & ARAÚJO, 2000; VERÍSSIMO *et al*., 2008).

Além de colorir, os carotenoides possuem atividades biológicas importantes. Uma função universal dos carotenoides é a ação antioxidante. Os antioxidantes têm a capacidade de atenuar o efeito de espécies reativas de oxigênio (ROS), sem se tornar um

radical destrutivo protegendo o organismo ao nível celular (SANDMAN, 2014; FRANCO *et al*., 2014). Isto leva a inibição de doenças onde os radicais livres apresentam papel fundamental, como arteriosclerose, catarata, degeneração macular, esclerose múltipla, câncer, doenças degenerativas e cardiovasculares (MALDONADE *et al*., 2007; BHOSALE, 2004; AKSU & EREN, 2007).

A importância biológica destes pigmentos é devido ao fato de serem precursores de vitamina A. De fato, a atividade da provitamina A dos carotenoides tem sido conhecida há muito tempo (TANG & RUSSELL, 2009; RODRIGUEZ-AMAYA, 1997). Mais de 600 Carotenoides foram identificados. Entre eles, apenas três são mais importantes precursores de vitamina A em seres humanos: α-caroteno, β-Caroteno e p-criptoxantina (AIZAWA & INAKUMA, 2007; RAO & RAO, 2007; PARK *et al*., 2009; CARRILLO-LOPEZ *et al*., 2010).

A vitamina A foi a primeira vitamina a ser identificada (DAWSON, 2000). Também chamada de retinol, nutriente essencial ao organismo, desempenha importante papel em diversos processos vitais. Ela é um álcool (retinol) isoprenóide lipossolúvel e insaturado, pode ser encontrado na forma de carotenoides (DIMENSTEIN, 2011).

Dos carotenoides citados, o betacaroteno é o de maior bioconversibilidade em vitamina A, sendo fracionado no citoplasma das células da mucosa intestinal, em duas moléculas de retinoaldeído, que são reduzidas e esterificadas para formar ésteres de retinila. Na parte superior do intestino delgado, o éster é em grande parte hidrolizado liberando o álcool pela ação de uma hidrolase do suco pancreático na presença de sais biliares. Juntamente com os produtos da digestão da gordura, o retinol é emulsionado pelos sais biliares e pelos fosfolipídios, convertendo-se por fim em micelas, adequadas à absorção (CHAGAS *et al*., 2003).

A produção comercial atual de carotenoides a partir de microrganismos, sobretudo o β-caroteno, provém da alga *Dunaliella salina* ou do fungo *Blakeslea trispora* e concorre principalmente com a produção sintética por procedimentos químicos (ZHANG *et al*., 2016). Segundo SILVA (2004), a produção biotecnológica de carotenoides tem se destacado devido a fatores tais como: possibilidade de utilização de substratos de baixo custo para a bioprodução; denominação de substâncias naturais; pequeno espaço para produção, não estando sujeita às condições ambientais como clima, estação do ano ou composição do solo, e controle das condições de cultivo.

O mercado global de carotenoides alcançou US$ 1,2 bilhão em 2010, de US 1,5 bilhão em 2014 e deverá atingir quase US $ 1,8 bilhão em 2019, com uma taxa composta de crescimento anual de 3,9% (BCC RESEARCH, 2011).

4.3 *Rhodotorula glutinis*

Os carotenoides são produzidos principalmente por fungos filamentosos, leveduras e por algumas espécies de bactérias, algas e líquens. Entre as fontes microbianas de carotenoides as leveduras tais como *Phaffia rhodozyma* e *Rhodotorula glutinis* são de grande interesse comercial (AKSU & EREN, 2005).

A produção de carotenoides em leveduras é característica do gênero *Rhodotorula.* Estudos esclarecendo a biossíntese de carotenoides (SYMPSON *et al*., 1964), e mais especificamente a biossíntese de carotenoides em leveduras do gênero *Rhodotorula glutinis* (HAYMAN *et al*., 1974), fez com que o interesse nessa linhagem de leveduras aumentasse, pois seu uso industrial era restrito devido principalmente a falta de informação dos mecanismos de biossíntese.

Rhodotorula é uma levedura germinativa, assexuada que pertence ao phylum basidiomycota no primeiro subfilo divergido de *basidiomycota Pucciniomycotina*, na ordem de *Sporoidiobolales* (COELHO *et al*., 2011). O próprio gênero é considerado onipresente e pode ser encontrado em ambientes extremos, bem como em locais mais hospitaleiros. Exemplos de cenários extremos onde as espécies de *Rhodotorula* podem ser encontradas são o ar, os níveis mais profundos do mar, bem como amostras do Mar Morto, conhecido por sua extrema salinidade, nas profundezas do mar Báltico, em elevadas altitudes como Patagônia, o solo e a vegetação da Antártida (QUEROL & FLEET, 2006; WIRTH & GOLDANI, 2012). Estas leveduras são encontradas também nos alimentos modificando a sua coloração normal (WIRTH & GOLDANI, 2012; QUEROL & FLEET, 2006; EVANGELISTA, 2008).

A produção de derivados de vitamina A via rota microbiológica é um processo menos agressivo ao meio ambiente, uma vez que não utiliza reagentes com alto grau de insalubridade e solventes, assim, espera-se uma redução no impacto ambiental. Os microrganismos do gênero *Rhodotorula* são conhecidos por produzir quantidades consideráveis de carotenoides. Atualmente, este gênero tem sido estudado devido ao seu potencial para produção industrial, como corantes alimentares e antioxidantes (EVANGELISTA, 2008).

A levedura oferece vantagens sobre os outros gêneros em termos de taxa de crescimento elevada e uso de substratos de baixo custo. O seu crescimento pode ocorrer através da utilização de matéria-prima barata e de vasta disponibilidade, como caldo ou melaço de cana-de-açúcar, soro do leite, mosto de uva, farinha de feijão hidrolisada, extratos de soja e farinha de milho, salmoura de rabanete (SCHNEIDER *et al*., 2013).

4.4 Variáveis que alteram a produção de carotenoides por leveduras

4.4.1 pH inicial do meio

O pH influencia o crescimento da levedura e a produção de carotenoides. LA biossíntese de carotenoides naturalmente ocasiona mudanças do pH do meio de cultivo, como consequência do crescimento de leveduras. De modo geral, o pH do meio decresce nas primeiras 72 h de bioprodução, seguido de uma elevação durante a fase intensa de carotenogênese. A partir daí, o pH permanece constante indicando o final da bioprodução (LUO *et al*., 2013; LATHA *et al*., 2005).

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 e colaboradores (2005). Estes autores incubaram o microrganismo num meio com glucose, à temperatura entre 29 a 32ºC, e agitação de 200 rpm. Os autores verificaram que 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).

4.4.2 Temperatura

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes que influenciam o crescimento e o desenvolvimento dos microrganismos, causando alterações em muitas vias biossintéticas, inclusive na carotenogênese. O efeito exercido pela temperatura depende do microrganismo e do substrato utilizado. Segundo HAYMAN e colaboradores (1979), a temperatura exerce controle na concentração de enzimas envolvidas na produção de carotenoides e mudanças na concentração enzimática, definitivamente controla o nível de carotenoides nos microrganismos (VALDUGA, 2009; MAROVA, 2014).

AKSU & EREN (2007) estudaram o efeito da temperatura na produção de carotenoides da levedura *R. glutinis* desenvolvida em frascos agitados contendo meio com glucose a pH 6.0. O máximo de concentração de carotenoides foi obtido a 30ºC (63,4 mg/L) enquanto que a 25ºC e 35ºC a concentração de carotenoides foi menor. Resultados similares foram obtidos por BUZZINI & MARTINI (1999).

TINOI e colaboradores (2005) adotaram dois métodos de forma a investigar o efeito da concentração dos substratos, pH, temperatura, agitação e tempo de cultivo no crescimento e produção de carotenoides da levedura *R. glutinis* em meio que continha farinha hidrolisada de resíduos de feijão e batata doce. Através do método "One-factor-at-a-time" (FO) fizeram variar um dos fatores, mantendo todos os outros constantes. No estudo da temperatura, esta variou de 20 a 40 ºC sendo que o ótimo de concentração de biomassa (7 g/L) foi obtido entre 28-30 ºC bem como a máxima concentração de carotenoides (3 mg/L) foi obtida a essa mesma temperatura.

Além disso, a concentração relativa de cada carotenoide foi alterada pela temperatura de cultivo por *R. glutinis*. Quando a levedura foi cultivada em 5 °C, ocorreu a produção predominante de β-caroteno, enquanto que o cultivo a 25 °C levou à síntese de toruleno e torularrodina. O crescimento celular ótimo foi obtido a 30 °C. Nesta mesma temperatura, a máxima produção de carotenoides foi de 8388 μg/L e 31,9 g/L de biomassa (VALDUGA, 2009).

4.4.3 Agitação

Os microrganismos aeróbicos, cujo crescimento (metabolismo primário) é dependente do fornecimento de oxigênio, necessitam de definição das melhores condições de aeração e agitação para aumento de rendimento (VALDUGA, 2009). AKSU & EREN (2007) estudaram a taxa de aeração para 0; 1,2 e 2,4 vvm no crescimento e produção de carotenoides da levedura *R. glutinis*. Para a taxa de arejamento maior (2,4 vvm) obtiveram maior concentração de biomassa (5,4 g/L) e maior concentração de carotenoides (105,8 mg/L) comparativamente a um meio sem arejamento (anaeróbio).

Contudo, CUTZU e colaboradores (2013) estudaram o efeito da disponibilidade de oxigénio e a razão carbono/azoto (C/N) na produção de biomassa e β-caroteno pelo mutante *Rhodotorula glutinis* 400A15, em frascos agitados. Os autores concluíram que o aumento da disponibilidade de oxigénio diminuiu ou manteve a produtividade de β-

caroteno dependendo da razão C/N estudada, mas nunca aumentou. Estudos de CUTZU e colaboradores (2013) demonstram que não há uma tendência comum no efeito da disponibilidade em oxigénio sobre a produção microbiana de carotenoides, dependendo da estirpe de levedura utilizada.

5. METODOLOGIA

5.1 O substrato

Neste trabalho foi utilizado o substrato manipueira, coletado em uma casa de farinha localizada no bairro do Simão, Vitória da Conquista-BA. A manipueira foi coletada diretamente da prensa, acondicionada em garrafa pet e transportada para o laboratório onde passou pelo processo de autolavagem, afim de eliminar contaminantes e reduzir o cianeto. Após autoclavada, a manipueira foi congelada em freezer até o momento do uso.

5.2 Microrganismo

O microrganismo utilizado neste trabalho foi a levedura *Rhodotorula glutinis* cepa atcc 2186 adquirida da Fundação André Tosello, cultivada em meio ágar rampa, ativa e com biomassa. Este microrganismo foi selecionado por já ser estudado pelo grupo desde 2006 e se mostrar bom produtor de carotenoides em meios complexos.

5.3 Reativação da *R. glutinis*

O microrganismo foi reativado em meio YMA pela técnica de esgotamento em placa de petri e incubada em estufa em temperatura de 30°C. Após o crescimento as culturas foram mantidas sob refrigeração e sob manutenção a cada 30 dias.

Quadro 1: Composição do meio “Yeast Malt Agar” (YMA).

Dextrose	1% (m/v)
Extrato de levedura	0,3% (m/v)
Peptona	0,5% (m/v)
Extrato de malte	0,3% (m/v)
Agar	2% (m/v)
Água destilada	q.b.

5.4 Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo, uma colônia foi isolada da placa de Petri e colocada no meio líquido YM. O caldo inoculado foi mantido sob agitação *overnight*, em temperatura de 30°C. Após esse tempo, o número de células do inóculo foi padronizado. Este procedimento foi realizado de acordo com o Método Indireto de Medida do Crescimento por Turbidimetria, descrito por MASSAGUER (2005) no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 600 nm, até a Densidade ótica DO=1.

5.5 Fermentações

Foram utilizados Erlenmeyers com capacidade para 250 mL, contendo 100 mL do meio YM, cuja composição contém para cada litro de meio 3g de extrato de malte, 3g de extrato de levedura, 5g de peptona bacteriológica e 10g de dextrose. Transferiu-se 10% (v/v) do inóculo padronizado para os frascos contendo o meio de cultura com os pH ajustados para 5 e para 7. Os frascos foram levados aos incubadores agitados, com as temperaturas ajustadas para 25°C e 37°C, e a agitação ajustada para 100 rpm e 150 rpm, nos quais a curva de crescimento foi conduzida.

A cada quatro horas foi retirada uma alíquota do meio de cultura esta alíquota foi analisada em espectrofotômetro, por meio de leitura da densidade óptica (DO) de 600 nm a fim de acompanhar o crescimento do microrganismo.

5.2 Planejamento experimental fatorial

Com o objetivo de verificar quais as melhores condições operacionais de produção de carotenoides por *R. Glutinis* em manipueira foi realizado um planejamento experimental fatorial. A partir de dados da literatura, escolheram-se parâmetros que não apresentavam concenso de valores entre os diversos autores até o momento investigados. Assim, foram escolhidas temperatura, agitação e pH como variáveis independentes que mais influenciavam a produção de carotenoides. As concentrações de biomassa e de carotenoides foram as variáveis dependentes analisadas neste planejamento. De cada uma das variáveis foram escolhidos dois valores diferentes (níveis do planejamento fatorial 2^3) para se investigar, como pode ser visto na Tabela 2.

Para executar o planejamento fatorial é necessário realizar ensaios para todas as combinações possíveis entre os níveis de cada fator analisado (Tabela 3). Essas combinações são mais bem descritas em uma matriz de planejamento, em que os níveis são representados por coeficientes de contraste, ou seja, por sinais algébricos, (+) para os níveis superiores e (-) para os níveis inferiores.

O cálculo dos efeitos foi realizado com o auxílio do "software" STATISTICA 6.0. O estudo dos efeitos, pela verificação da significância dos fatores foi obtido através da análise do desvio padrão de cada efeito, empregando um teste t com 95% de confiança. A existência de um efeito de interação significativo indica que os efeitos principais devem ser interpretados conjuntamente.

Tabela 2: Parâmetros do planejamento fatorial 2^3.

VARIÁVEIS INDEPENDENTES	**NÍVEIS**	
	–1	**+1**
Temperatura (°C)	25	37
pH	5	7
Velocidade de agitação (rpm)	100	150

Tabela 3: Níveis do planejamento fatorial 2^3 para produção de carotenoides.

ENSAIO	FATORES		
	T	**Ag**	**pH**
1	-	-	-
2	-	-	+
3	-	+	-
4	-	+	+
5	+	-	-
6	+	-	+
7	+	+	-
8	+	+	+

O planejamento fatorial completo 2^3 com réplica foi empregado para identificar os fatores significativos. Isto resultou em oito diferentes condições experimentais que serviram para os cálculos dos efeitos principais e suas possíveis interações (COLEN, 2006). É importante ressaltar que foi necessário ter um conhecimento prévio do sistema em estudo para que fosse criteriosamente estabelecida a seleção de variáveis empregadas, bem como dos níveis em que estas foram ensaiadas, além da resposta utilizada no planejamento. Além disso, todos os experimentos foram sorteados de modo que a ordem de sua realização fosse aleatória.

A fim de avaliar o grau de interação entre as variáveis foi realizada uma análise de variância. A análise foi realizada com o pacote estatístico STATISTICA (StatSoft Inc.,Tulsa, Oklahoma., EUA). Os valores ótimos de variáveis selecionadas foram obtidos através da resolução da equação de regressão e também por análise dos gráficos de superfície de resposta da forma:

$$Y = \beta o + \sum k\, j = 1\ \beta jxj + \sum\sum i\ b\, j\ \beta ijxixj + \sum k\, j = 1\ \beta jjx\ 2\, j + \varepsilon$$

Em que:

- ✓ Y é a resposta prevista;
- ✓ βo, βj, βij e βjj constante coeficientes;
- ✓ xi e xj são as variáveis ou fatores independentes codificados;
- ✓ ε é o erro aleatório.

5.6 Extração do betacaroteno

Foram testados diferentes solventes orgânicos para a extração do betacaroteno. Seguiu-se a metodologia indicada por SEDMAK & WEERASINGHE (1990) com algumas modificações. Foram centrifugados 5mL do fermentado puro por10 min a 6.000 rpm afim de concentrar as células do fermentado. Posteriormente adicionou-se os solventes a serem testados e deixou-se por 8 horas com uso de banho de ultrassom na frequência de 25 khz por 60 min. Centrifugou-se novamente e se agitou até que a massa de células se tornasse branca, e o betacaroteno fluísse para o sobrenadante. O sobrenadante foi então recolhido e medido em espectrofotômetro em DO = 448 nm. Os solventes testados estão listados na Tabela 4.

Tabela 4: Solventes testados para extração do betacaroteno.

SOLVENTES TESTADOS
Éter de petróleo com acetona v\v
Etanol com acetona v\v
Acetona pura
Acetona com hexano v\v
Hexano puro
Hexano com éter de petróleo v\v
Éter de petróleo puro

Após a observação de qual dos solventes obteve o melhor rendimento de extração, repetiu-se a metodologia para todas as amostras inclusive as que foram fermentadas em meio contendo o substrato.

5.6.1 Curva de calibração do betacaroteno

Para a construção da curva de calibração de betacaroteno, utilizou-se Betacaroteno da Sigma-Aldrich (corantes e reagentes). Preparou-se uma solução de betacaroteno em acetona e éter de petróleo na proporção 1:1 (v/v). Seguiu-se a preparação de várias diluições com concentrações conhecidas. Realizou a leitura em espectrofotômetro, à 445nm. Com os valores de absorbâncias obtidas através da leitura, foi construído um gráfico de concentração por absorbância, obtendo uma correlação linear, através do Microsoft Excel. Que gerou a equação da reta e o R^2. Através da equação da reta, foi possível quantificar os carotenoides produzidos durante a fermentação.

5.7 Análise físico-química do substrato

5.7.1 Determinação de proteínas

A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método de Kjedahl segundo a metodologia do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2008), com correção para nitrogênio não proteico, na qual consiste em:

- Pesar aproximadamente 0,5 g da amostra em papel vegetal (isento de nitrogênio);
- Transferir para o balão digestor de Kjedahl, em seguida acrescentar mistura catalítica e 10 mL de ácido sulfúrico concentrado;
- Mineralizar até que se obtenha um líquido claro;
- Esfriar até temperatura ambiente, adicionar ao balão digestor cerca de 5 mL de água destilada, cuidadosamente, sob água corrente ou transferir o líquido mineralizado, quantitativamente, para um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume;
- Proceder a destilação utilizando o volume total digerido ou alíquota (10 mL) do volume de 100 mL (balão volumétrico), dependendo da técnica utilizada. O sal

formado, borato de amônio, após processo de destilação titula-se com solução padrão de HCl 0,1N, com fator conhecido, através da fatoração tris, até ponto de viragem do indicador.

Para converter o nitrogênio medido para proteína bastou multiplicar o conteúdo de nitrogênio pelo fator arbitrário, que representa o fator médio do material em estudo, que é 6,25 para alimentos em geral e 6,38 para proteínas lácteas. Portanto, a quantificação de proteínas da amostra, foi determinada pelo seguinte calculo:

$$\textit{Proteína Bruta} = \textit{conteúdo total de nitrogênio (Kjeldahl)} \times \textit{fator}.$$

Os resultados foram expressos em porcentagem (m/m).

5.7.2 Determinação de cinzas

As cinzas foram determinadas segundo metodologia 018/IV Resíduo por incineração – Cinzas com modificações do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2008), e os resultados foram expressos em porcentagem (p/p). Pesou-se 10g da amostra em uma cápsula, previamente aquecida em mufla a 550°C, resfriou-se em dessecador até a temperatura ambiente e pesou-se. Repetiram-se as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante.

5.7.3 Determinação de umidade

A determinação de umidade foi feita pelo método de Perda por dessecação (umidade) – Secagem direta em estufa a 105ºC 012/IV do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2008), e consistiu em pesar de 2 a 10g da amostra em cápsula de porcelana ou de metal, previamente tarada, e aquecê-la durante 3 horas. Posteriormente a amostra foi resfriada em dessecador até a temperatura ambiente. Foi pesada e repetida a operação de aquecimento e resfriamento até a obtenção de valores de peso constante, e os resultados foram expressos em porcentagem (m/m).

5.7.4 Determinação de açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método o Ácido 3,5-Dinitrosalicílico segundo o INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2008). Este método se baseia na redução do ácido 3,5 dinitro-salicílico a ácido 3-amino-5- nitrosalicílico, ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar é oxidado a grupo carboxílico com o desenvolvimento de coloração avermelhada, medida espectofotometricamente em 600 nm. Foi feita uma análise da quantidade de açúcares redutores do substrato antes da inoculação do microrganismo e após a inoculação a cada quatro horas, a fim de obter uma curva do consumo de açúcares pela levedura.

5.7.5 Curva de calibração de açucares redutores

A partir de uma solução padrão de glicose foram preparadas soluções diluídas com concentrações conhecidas. Após o preparo das soluções 1 mL de cada solução foi adicionada em um tubo de ensaio, então adicionou-se 1 mL do reagente de DNS. Os tubos foram agitados e aquecidos em banho-maria a 100°C (em ebulição) por 5 minutos. Os tubos foram resfriados em banho com gelo por 5 minutos; adicionou-se 16 mL da solução de tartarato duplo de sódio e potássio homogeneizados e então se realizou a análise destes por absorbância em espectrofotômetro 600 nm. O branco consistiu em substituir o volume de solução de glicose por água. Com as leituras de absorbância a 600nm para as várias concentrações preparadas, foi possível construir uma curva de calibração de concentração de açúcar redutor (AR) 25 por absorbância, obtendo-se uma correlação linear através do programa Microsoft Excel foi gerada uma equação da reta utilizada para a determinação da concentração de açúcar redutor nos melaços, caldo de cana e meio sintético durante a fermentação. A equação gerada pela curva é a seguinte: $y = 0{,}0785x + 0{,}015$ com $R^2 = 0{,}9929$.

6. REFERÊNCIAS

AIZAWA, K.; INAKUMA, T.. Quantitation of carotenoids in commonly consumed vegetables in Japan. **Food science and technology research**, v. 13, n. 3, p. 247-252, 2007.

AKSU, Z.; EREN, A. T.. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2985-2991, 2005.

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.

ANTUNES, L.M.G.; ARAÚJO, M.C.P.. Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. **Rev. Nutr.**, v. 13, n. 2, p. 81-88, 2000.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Resolução nº. 44/77 de 1977 (DOU–01/02/78). Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: FEV. 2017.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; NETTO, W.S.; DE ALMEIDA LIMA, U.. **Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos.** Edgard Blucher, 2001.

BARANA, A.C.; CEREDA, M.P.. Cassava wastewater (manipueira) treatment using a two-phase anaerobic biodigestor. **Food Science and Technology** (Campinas), v. 20, n. 2, p. 183-186, 2000.

BARBATO, J.. Estudo da obtenção de carotenoide por fermentação empregando a levedura *Rhodotorula* sp. em melaço e caldo de cana-de-açúcar como meio de cultura. Trabalho de Conclusão de Curso. **Universidade Tecnológica Federal do Paraná**. 2014.

BHOSALE, P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 4, p. 351-361, 2004.

BOTELLA-PAVÍA, P.; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M.. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. **Physiologia Plantarum**, v. 126, n. 3, p. 369-381, 2006.

BUTINAR, L.; SANTOS, S.; SPENCER-MARTINS, I.; OREN, A.; GUNDE-CIMERMAN, N.. Yeast diversity in hypersaline habitats. **FEMS Microbiology Letters**, v. 244, n. 2, p. 229-234, 2005.

BUZZINI, P.; MARTINI, A.. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. **Bioresource Technology**, v. 71, n. 1, p. 41-44, 2000.

CARDOSO, E.. Uso de manipueira como biofertilizante no cultivo do milho: avaliação do efeito no solo, nas águas subterrâneas e na produtividade do milho. Criciúma, SC: Programa de Pós-gradução em Ciências Ambientais, **Universidade do Extremo Sul Catarinense**, 2005.

CAROTENOID MARKERT BY VALUES. In: **The global market for carotenoids.** Disponível em: <http://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/carotenoids-global-market-report-fod025e.html>. Acesso em: FEV. 2017.

CARRILLO-LOPEZ A.; YAHIA, E.M.; RAMIREZ-PADILLA, G.K.. Bioconversion of Carotenoids in Five Fruits and Vegetables to Vitamin A Measured by Retinol Accumulation in Rat Livers. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 5, n. 2, p. 215-221, 2010.

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

CEREDA, M.P.; HENRIQUE, C.M.; OLIVEIRA, M.A.; FERRAZ, M.V.; VICENTINI, N.. Characterization of edible films of cassava starch by electron microscopy. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, p. 91-95, 2000.

CEREDA, M.P.; MATTOS, M.C.Y.. Linamarin: the toxic compound of cassava. **Journal of venomous animals and toxins**, v. 2, n. 1, p. 06-12, 1996.

CHAGAS, M.H.C.; FLORES, F.; CAMPOS, F.A.C.S.; SANTANA, R.A.; LINS, E.C.B.. Vitamin A Teratogenicity. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 3, n. 3, p. 247-252, 2003.

COELHO, A.R.; DE ANDRADE NÓBREGA, G.M.; PAGNOCCA, F.C.; HOFFMANN, F.L.; HARADA, K.I.; HIROOKA, E.Y.. Avaliação do potencial antagônico de leveduras, visando biocontrole de deterioração por *Penicillium expansum*. **Semina: Ciências Agrárias**, p. 1879-1892, 2011.

CONSTANT, P.B.L.; STRINGHETA, P.C.; SANDI, D.. Corantes alimentícios. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 203-220, 2002.

CORDEIRO, G.Q. Tratamento de manipueira em reator anaeróbio Compartimentado. São José do Rio Preto. 91p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Campus de São José do Rio Preto, **Universidade Estadual Paulista**, 2006.

CUTZU, R.; COI, A.; ROSSO, F.; BARDI, L.; CIANI, M.; BUDRONI, M.; ZARA, G.; ZARA, S.; MANNAZZU, I.. From crude glycerol to carotenoids by using a *Rhodotorula glutinis* mutant. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 6, p. 1009-1017, 2013.

DA SILVA JÚNIOR, J.J.; COELHO, E.F.; DO VALE SANT'ANA, J.A.; JÚNIOR, E.B.S.; PAMPONET, A.J.M. Uso da manipueira na bananeira 'terra maranhão' e seus efeitos no solo e na produtividade. **Irriga**, v. 17, n. 3, p. 353, 2012.

DA SILVA, A.R.; CIRANI, C.B.S.; SERRA, F.A.R.. Desempenho Econômico e Ambiental: Práticas de Ecoinovação em Biodigestores em Empresas Processadoras de Mandioca. **Revista de Gestão Ambiental e Sustentabilidade-Ge AS**, v. 5, n. 3, p. 72-86, 2016.

DAMASCENO, S.; CEREDA, M.P.; PASTORE, G.M.; OLIVEIRA, J.G. Compostos de aroma por *Geotrichum fragans* cultivado em manipueira. Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. São Paulo: **Fundação Cargill**, v. 4, p. 96-106, 2001.

DAVOLI, P.; MIERAU, V.; WEBER, R.W.S. Carotenoids and fatty acids in red yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 392-397, 2004.

DE JESUS, M.V.; DE OLIVEIRA, T.S.; FERREIRA, R.D.M.; DE LIMA, A.M.; DA SILVA RODRIGUES, J.R.; SILVA, C.F.; SOUZA, R.R.. Produção de lipase utilizando manipueira como fonte alternativa de carbono. **Scientia Plena**, v. 12, n. 5, 2016.

DEL BIANCHI, V.L.. Balanço de massa e de energia do processamento de farinha de mandioca em uma empresa de médio porte do Estado de São Paulo. Botucatu: **UNESP/Faculdade de Ciências Agronômicas**. 118p. (Tese de Doutorado). 1998.

DIMENSTEIN, R.; LIRA, L.; MEDEIROS, A.C.; CUNHA, L. R; STAMFORD, T.L.. Efeito da suplementação com vitamina E sobre a concentração de alfa-tocoferol no colostro humano. **Rev. Panam. Salud. Publica**, v. 29, p. 399-403, 2011.

DUARTE, A.D.S.; SILVA, Ê.F.D.F.; ROLIM, M.M.; 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**, v. 16, n. 3, p. 262-268, 2012.

DUFOSSÉ, L. Microbial and microalgal carotenoids as colourants and supplements. In: **Carotenoids**. Birkhäuser Basel, p. 83-98, 2009.

EVANGELISTA, S.R. Avaliação da microbiota presente no processamento úmido do café e do uso de culturas iniciadoras no processamento natural e semi-seco. 183 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - **Universidade Federal de Lavras**, Lavras, 2014.

FEOFILOVA, E.P. Fungal carotenoids: biological functions and practical use. **Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia**, v. 30, n. 2, p. 181-195, 1993.

FIORETTO, R.A.. Manipueira na fertirrigação: efeito sobre a germinação e produção de algodão (*Gossypium hirsutum* var hirsutum, L, e milho (*Zoa mays*. L.) **Semina: Ciências Agrárias**, v. 8, n. 1, p. 17-20, 1987.

FRANCO, G.; CARTAGENA, J.R.; GUILLERMO CORREA, L.; ROJANO, B.; PIEDRAHITA, A.M.. Actividad antioxidante del jugo de *Passiflora edulis* Sims (Gulupa) durante la poscosecha. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 19, n. 3, p. 154-166, 2014.

FRENGOVA, G.I.; BESHKOVA, D.M.. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 163, 2009.

FRENGOVA, G.I.; SIMOVA, E.D.; BESHKOVA, D.M. Effect of temperature changes on the production of yeast pigments co-cultivated with lacto-acid bacteria in whey ultrafiltrate. **Biotechnology letters**, v. 17, n. 9, p. 1001-1006, 1995.

HAYMAN, E.P.; YOKOYAMA, H.; CHICHESTER, C.O.; SIMPSON, K.L.. Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. **Journal of bacteriology**, v. 120, n. 3, p. 1339-1343, 1974.

INOUE, K.R.A.. Produção de biogás, caracterização e aproveitamento agrícola do biofertilizante obtido na digestão da manipueira. 92 f. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, **Universidade Federal de Viçosa**, 2008.

INOUE, K.R.A.; SOUZA, C.F.; MATOS, A.T.; SANTOS, N.T.; FERREIRA, W.P.M.. Concentração de nutrientes em plantas de milho, adubadas com

biofertilizantes, obtidos na digestão anaeróbia da manipueira. **Revista Engenharia na Agricultura**, v. 19, n. 3, p. 236-243, 2011.

JASWIR, I.; A MONSUR, H.. Anti-inflammatory compounds of macro algae origin: A review. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 33, p. 7146-7154, 2011.

JOHNSON, E.A.; LEWIS, M.J.. Astaxanthin formation by the yeast **Phaffia rhodozyma**. **J. gen. Microbiol**, v. 115, p. 173-183, 1979.

LAMERS, P.P.; JANSSEN, M.; DE VOS, R.C.; BINO, R.J.; WIJFFELS, R.H.. Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. **Trends in biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 631-638, 2008.

LATHA, B.V.; JEEVARATNAM, K.; MURALI, H.S.; MANJA, K.S.. Influence of growth factors on carotenoid pigmentation of *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY from natural source. **Indian J Biotechnol,** v. 4, p. 353–357, 2005.

LEONEL, S.; RODRIGUES, J.D.; CEREDA, E.. Ação de fitorreguladores e ácido bórico em estacas de lichia (*Litchi chinensis* Sonn.). **Científica**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 105-110, 1994.

LUO, Z.; ZHANG, J.; LI, J.; YANG, C.; WANG, T.; OUYANG, B.; LI, H.; GIOVANNONI, J.; YE, Z.. A STAY-GREEN protein SlSGR1 regulates lycopene and ß-carotene accumulation by interacting directly with SlPSY1 during ripening processes in tomato. **New Phytologist**, v. 198, n. 2, p. 442-452, 2013.

MALDONADE, I.R.. Produção de carotenoides por leveduras. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos, **Faculdade de Engenharia de Alimentos (UNICAMP)**, Campinas, 2003.

MARÓSTICA JR., M.R.; PASTORE, G.M.. Biotransformation of citronellol in rose-oxide using cassava wastewater as a medium. **Food Science and Technology** (Campinas), v. 26, n. 3, p. 690-696, 2006.

MAROVA, I.; CARNECKA, M.; HALIENOVA, A.; CERTIK, M.; DVORAKOVA, T.; HARONIKOVA, A.. Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. **Journal of Environmental Management**, v. 95, p. S338-S342, 2012.

MARTÍNEZ, C.; GERTOSIO, C.; LABBE, A.; PÉREZ, R.; GANGA, M.A.. Production of *Rhodotorula glutinis*: a yeast that secretes alpha-L-arabinofuranosidase. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 0-0, 2006.

MASSAGUER, P.R.. Microbiologia dos processos Alimentares. 4 ed. São Paulo: **Varela**, 2005.

NEVES, O.S.C.; SOUZA, A.S.; COSTA, M.A.; DE ALMEIDA SOUSA, L.; VIANA, A.E.S.; NEVES, V.B.F.. Persistência do cianeto e estabilização do pH em manipueira. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 8, n. 1, 2014.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M.. Biosurfatantes a partir de resíduos agroindustriais. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 6, p. 63-67, 2003.

OLIVEIRA, J.G.. Utilização de melaço, manipueira e soro de queijo como substratos para produção de biossurfactante por *Bacillus Pumilus* e sua aplicação em biorremediação de solo. 98 f. Tese (doutorado) - **Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho**, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2014.

PARK, S.; RUOFF, R.S.. Chemical methods for the production of graphenes. **Nature nanotechnology**, v. 4, n. 4, p. 217-224, 2009.

PETERSON, W.J. ;, EVANS, W.R.; LECCE, E.; BELL, T.A.; ETCHELLS, J.L.. Quantitative determination of the carotenoids in yeasts of the genus *Rhodotorula*. **Journal of bacteriology**, v. 75, n. 5, p. 586, 1958.

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, 2013.

PONTE, J.J.; CEREDA, M.P.. Uso da manipueira como insumo agrícola: defensivo e fertilizante. Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. Campinas: **Fundação Cargill**, p. 80-95, 2001.

PONTE, J.J.; FRANCO, A.. Manipueira, um nematicida não convencional de comprovada potencialidade. **Publicação da Sociedade Brasileira de Nematologia**, v. 5, 1981.

QUEROL, A.; FLEET, G.. Yeasts in food and beverages. **Springer-Verlag**, Berlin, Germany, 2006.

RAO, A.V.; RAO, L.G.. Carotenoids and human health. **Pharmacological research**, v. 55, n. 3, p. 207-216, 2007.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.. Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed and stored foods. **Arlington**,VA: John Snow Incorporated/OMNI Project, 1997.

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 Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 210-218, 2011.

SÁNCHEZ-CONTRERAS, A.; JIMÉNEZ, M.; SANCHEZ, S. Bioconversion of lutein to products with aroma. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 54, n. 4, p. 528-534, 2000.

SANDMANN, G.. Carotenoids of biotechnological importance. In: **Biotechnology of Isoprenoids.** Springer International Publishing, p. 449-467, 2014.

SANTOS, J. R. Utilização de glicerol como fonte de carbono para obtenção de carotenoides de *Rhodotorula glutinis*. Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia Química, **Universidade Federal do Ceará**, 2010.

SATO, G.S.; CHABARIBERY, D.; MAIA, M.L.; DE CARVALHO, F.C.; NEGRI NETO, A.; Marques, S.A.. Tendência de Mercado para corantes na indústria de alimentos. In: **I CONGRESSO BRASILEIRO DE CORANTES NATURAIS**. p. 39, 1992.

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

SEDMAK, J.J.; WEERASINGHE, D.K.; JOLLY, S.O.. Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnology techniques**, v. 4, n. 2, p. 107-112, 1990.

SENA, E.S.; PONTE, J.J.. A manipueira no controle da meloidoginose da cenoura. **Nematologia Brasileira**, v. 6, p. 95-8, 1982.

SIMPSON, K.L.; NAKAYAMA, T.O.M.; CHICHESTER, C.O.. Biosynthesis of yeast carotenoids. **Journal of Bacteriology**, v. 88, n. 6, p. 1688-1694, 1964.

SQUINA, F.M.. Estudos com carotenoides de leveduras do genero *Rhodotorula*: desenvolvimento de metodo analitico, influencia de inibidores e cultivo em meio alternativo a base de caldo de cana-de-açucar. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, **Universidade Estadual de Campinas**, 2001.

SQUINA, F.M.; MERCADANTE, A.Z.. HPLC analysis of carotenoids from five Rhodotorula strains. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 3, p. 309-318, 2003.

TANG, G.; QIN, J.; DOLNIKOWSKI, G.G.; RUSSELL, R.M.; GRUSAK, M.A.. Golden Rice is an effective source of vitamin A. **The American journal of clinical nutrition**, v. 89, n. 6, p. 1776-1783, 2009.

TINOI, J.; RAKARIYATHAM, N.; DEMING, R. L. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 7, p. 2551-2557, 2005.

VERÍSSIMO, S.A.; OLIVEIRA, E.L.D.; LADCHUMANANANDASIVAM, R.; AQUINO, M.S.D.; ALEXANDRE, M.E.D.O.. Aproveitamento do corante natural (Bixa orellana) no tingimento de fibra celulósica. **Tecnol. & Ciên. Agropec.**, v. 2, n. 1, p. 35-39, 2008.

VIEITES, R.L.. Efeitos da adubação com manipueira sobre o rendimento e qualidade dos frutos de tomate. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 8, p. 1239-1243, 1998.

VILLELA, G.G.. Pigmentos animais: zoocromos. **Academia Brasileira de Ciências**, 1976.

WIRTH, F.; GOLDANI, L.Z.. Epidemiology of Rhodotorula: an emerging pathogen. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2012, 2012.

WOSIACKI, G.; FIORETTO, A.M.C.; CEREDA, M.P.; CEREDA, M.. Utilização da manipueira para produção de biomassa oleaginosa. *In.*: CEREDA, M.P.. Resíduos da industrialização da mandioca. São Paulo: **Paulicéia**, p. 151-161, 1994.

YAHIA, E.M.; ORNELAS-PAZ, J.J.. Chemistry, stability and biological actions of carotenoids. **Fruit and vegetable phytochemicals**, p. 177-222, 2010.

ZENEBON, O.; PASCUET, N.S.; TIGLEA, P.. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: **Instituto Adolfo Lutz**, p. 1020, 2008.

ZHANG, Y.; NAVARRO, E.; CÁNOVAS-MÁRQUEZ, J.T.; ALMAGRO, L.; CHEN, H.; CHEN, Y.Q.; ZHANG, H.; TORRES-MARTÍNEZ, S.; CHEN, W.; GARRE, V.. A new regulatory mechanism controlling carotenogenesis in the fungus *Mucor circinelloides* as a target to generate ß-carotene over-producing strains by genetic engineering. **Microbial cell factories**, v. 15, n. 1, p. 99, 2016.

7. Artigo: CULTIVO DE *Rodothorula glutinis* EM MANIPUEIRA PARA PRODUÇÃO DE SUPLEMENTO VITAMINICO E PROTEICO

CULTIVO DE *Rodothorula glutinis* PARA PRODUÇÃO DE SUPLEMENTO VITAMINICO E PROTEICO

RESUMO

A manipueira é o resíduo líquido gerado pela produção de farinha de mandioca, descartado indevidamente ele causa prejuízos ao meio ambiente, devido a presença do glicosídio linamarina que quando hidrolisado gera ácido cianídrico que é tóxico. O trabalho teve por objetivo avaliar a viabilidade do uso da manipueira coletada nas casas de farinha de Vitória da Conquista - BA como substrato para a produção de betacaroteno por leveduras *Rhodotorula glutinis*. O betacaroteno é um carotenoide e possui grande importância para a indústria de corantes e aditivos alimentares. Seguindo um planejamento experimental fatorial 2^3, realizou-se fermentações em meio sintético e em manipueira e observou-se que as melhores condições para a produção tanto de biomassa quanto de betacaroteno foram em pH 7, 150 rpm e 37°C. Através da análise de variância, verificou-se que as variáveis ph, agitação e temperatura, quando em conjunto, exercem mais influência sobre a produção de betacaroteno do que individualmente. A manipueira se apresentou como um substrato promissor para o cultivo de Rhodotorula glutinis e também para a produção de betacaroteno.

Palavras-chave: Manipueira, Betacaroteno, *Rhotorula glutinis*, Planejamento fatorial, Fermentação.

1. INTRODUÇÃO

Carotenoides são substâncias químicas tetraterpênicas relacionadas ao caroteno, compreendendo pigmentos amplamente difundidos na natureza, são usados como corantes alimentícios e em suplementos nutricionais. No Brasil, a indústria de alimentos representa cerca de 4 % do PIB e 30 % do total das exportações e o mercado global de carotenoides alcançou US 1,5 bilhão em 2014 e deverá atingir quase US $ 1,8 bilhão em 2019, com uma taxa composta de crescimento anual de 3,9% [1]. A importância biológica destes pigmentos é devido ao fato de serem precursores de vitamina A. Dos

carotenoides citados, o betacaroteno é o de maior bioconversibilidade em vitamina A [4].

Atualmente, os carotenoides utilizados industrialmente são obtidos por via química ou extração de plantas e/ou algas, mas devido à preocupação com o uso de aditivos químicos em alimentos, há interesse nos carotenoides obtidos naturalmente por processos biotecnológicos. Embora os corantes sejam considerados essenciais à indústria de alimentos, podendo ser obtidos através de fontes naturais, este campo ainda não é bem explorado, em particular os produzidos por microrganismos [5,6].

Muitos microrganismos já foram reportados como potenciais bioprodutores de carotenoides, dentre eles microrganismos do gênero *Rhodotorula* são conhecidos por produzir quantidades consideráveis de carotenoides. A levedura *Rhodotorula* oferece vantagens sobre os outros gêneros em termos de taxa de crescimento elevada e uso de substratos de baixo custo [7,8].

Um dos obstáculos para maior a produção de carotenoides por processos biotecnológicos se deve à onerosidade das matérias primas utilizadas, contudo muitos trabalhos vem sugerindo o uso alternativo de substratos de baixo custo e resíduos como soro de queijo [9, 10], mosto de uva [11], derivados do processamento da cana-de-açúcar [12,10], do processamento de milho [10]; e da produção de biodiesel [13], mostram que é possível reduzir os custos de produção e a emissão destes subprodutos industriais e agroindustriais no meio ambiente, pois são ricos em açúcares e matéria orgânica.

A manipueira é o liquido residual gerado na prensagem da massa de mandioca ralada, para a produção da farinha de mandioca, sendo um dos resíduos mais prejudiciais ao ambiente. A produção de mandioca da microrregião de Vitória da Conquista – Ba é de 428.500 toneladas. Considerando-se que o rendimento da manipueira é de 30%, com o processamento dessa produção seriam gerados 128.551 m^3 de manipueira, algo espantoso e que necessita de um destino ambientalmente seguro e de possibilidades de reuso[14]. A produção de betacaroteno através da fermentação da manipueira utilizando a levedura *Rhodotorula glutinis* pode ser uma alternativa viável, tanto para diminuir os custos da produção dos bioprodutos quanto para diminuir 0impactos ambientais causados pela manipueira. O objetivo deste estudo foi estudar os

parâmetros envolvidos no processo de obtenção de betacaroteno utilizando manipueira como substrato, afim de otimizar o processo.

2 METODOLOGIA

2.1 O substrato

Neste trabalho foi utilizado o substrato manipueira, coletado em uma casa de farinha localizada no bairro do Simão, Vitória da Conquista-BA. A manipueira foi coletada diretamente da prensa, acondicionada em garrafa pet e transportada para o laboratório onde passou pelo processo de autolavagem, afim de eliminar contaminantes e reduzir o cianeto. Após autoclavada, a manipueira foi congelada em freezer até o momento do uso.

2.2 Crescimento do microrganismo

O microrganismo utilizado no presente estudo foi a *Rhodotorula glutinis* cepa atcc 2186 fornecida pela Fundação André Tosello – Campina, SP, o mesmo foi reativado conforme instruções do fornecedor em meio YMA e mantidas sob refrigeração e sob manutenção a cada 30 dias.

A fim de avaliar o crescimento e produção de betacaroteno pela levedura em diferentes condições foi feito um planejamento experimental prévio, no qual se determinou valores para três variáveis a serem testadas: pH, agitação e temperatura. Os valores observados podem ser vistos na tabela 1. Foram feitas curvas de crescimento do microrganismo em meio YM durante 72 horas afim de acompanhar o seu crescimento e consumo de açucares redutores.

TABELA 1 – Condições estabelecidas no Planejamento Experimental .

pH	5,0 e 7,0
agitação	100 rpm e 150 rpm
temperatura	25°C e 37°C

Para o preparo do inóculo, uma colônia foi isolada da placa de petri e tranferida para o meio líquido. O caldo inoculado foi mantido sob agitação overnight em temperatura de 30°C. Após esse período o número de células do inóculo foi padronizado por meio de leitura da densidade óptica (DO) no espectrofotômetro a 600nm até a DO=1.

Foi transferido 10% (v/v) do inóculo padronizado para o frasco contendo os meios de cultura com os valores de pH ajustados nos quais a curva de crescimento foi conduzida, onde a cada quatro horas foi retirada uma alíquota do meio de cultura e medida a densidade óptica afim de acompanhar o crescimento do microrganismo.

2.3 Extração e quantificação do betacaroteno

Foram testados diferentes solventes orgânicos para a extração do betacaroteno (tabela 2). Seguiu-se a metodologia descrita em literatura [15] com algumas modificações. Foram centrifugados 5 ml do fermentado puro por 10 min a 6.000 rpm a fim de concentrar as células do fermentado. Posteriormente adicionou-se o solvente e deixou por 8 horas com uso de banho de ultrassom na frequência de 25khz por 60 min. Centrifugou-se novamente e agitou-se até que a massa de células se tornasse branca, e o betacaroteno extravasasse para o sobrenadante. O sobrenadante foi então recolhido e medido em espectrofotômetro em DO = 448nm.

Após a observação de qual dos solventes proporcionou o melhor rendimento de extração, repetiu-se a metodologia para todas as amostras inclusive as que foram fermentadas em meio contendo o substrato.

TABELA 2 – Solventes testados afim de avaliar qual o melhor para no processo de extração do betacaroteno.

SOLVENTES TESTADOS
Éter de petróleo com acetona v\v
Etanol com acetona v\v
Acetona pura
Acetona com hexano v\v
Hexano puro
Hexano com éter de petróleo v\v
Éter de petróleo puro

2.3 Análise físico-química do substrato

2.3.1 Determinação de proteínas

A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método de Kjeldahl [16] com correção para nitrogênio não proteico. O método Kjeldahl é baseado na determinação do nitrogênio total (nitrogênio inorgânico e orgânico) contido no meio fermentativo e por meio de um fator de correção é transformado em proteína bruta. Este fator de correção está associado ao fato das proteínas terem % de nitrogênio quase constante, em torno de 16%.

2.3.2 Determinação de cinzas

As cinzas foram determinadas segundo metodologia 018/IV Resíduo por incineração – Cinzas com modificações e os resultados foram expressos em porcentagem (p/p). Pesou-se 10g da amostra em uma cápsula, previamente aquecida em mufla a 550°C, resfriou-se em dessecador até a temperatura ambiente e pesou-se. Repetiu-se as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante [16]

2.3.3 Determinação de Umidade

A determinação de umidade foi feita pelo método de Perda por dessecação (umidade) – Secagem direta em estufa a 105ºC 012/IV [16] consiste em – Pesar de 2 a 10 g da amostra em cápsula de porcelana ou de metal, previamente tarada. Aquecer durante 3 horas. Resfriar em dessecador até a temperatura ambiente. Pesar e repetir a operação de aquecimento e resfriamento até peso constante. Os resultados foram expressos em porcentagem (p/p).

2.3.4 Determinação de açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores foi feita pelo método o Ácido 3,5-Dinitrosalicílico. Este método se baseia na redução do ácido 3,5 dinitro-salicílico a ácido 3-amino-5- nitrosalicílico, ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar é oxidado a grupo carboxílico com o desenvolvimento de coloração avermelhada, medida espectofotometricamente em 600 nm. Foi feita uma análise da quantidade de açucares redutores do substrato antes da inoculação do microrganismo e após a inoculação a cada quatro horas, afim de obter uma curva do consumo de açucares pela levedura [16].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise Físico-química 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.

A composição química da manipueira, como qualquer subproduto agroindustrial, é variável, ela depende da variedade da mandioca utilizada, que por sua vez está correlacionada com as condições climáticas e de solo do local onde é cultivada. A tabela 3 mostra a composição físico-química da manipueira usada neste trabalho e de outros autores. Cereda (2001) observou resultados semelhantes aos obtidos na amostra analisada neste estudo, exceto para análise de cinzas [17]. Pinto, 2013 encontrou

também resultados diferentes ao teor de cinzas mostrando a natureza variável de resíduos agroindustriais [18].

TABELA 3 – Composição físico-química da manipueira coletada no município de Vitória da Conquista/Ba, comparada a valores obtidos em outros estudos.

COMPONENTES	VALORES AMOSTRADOS	CEREDA (2001)	PINTO (2013)
Umidade (%)	92,27	92,77	94,31
Açúcares Totais (%)	2,26	2,93	2,08
Cinzas (%)	2,27	0,54	0,73
Proteína (%)	1,77	1,22	1,19

As diferenças entre os valores de cinzas encontrados neste trabalho e os valores observados por outros autores (Tabela 3), são comuns ao tipo de amostra como já foi mencionado e dependem de condições climáticas e de variedade da mandioca. Por exemplo, em outros trabalhos desenvolvidos [19,20], a manipueira foi obtida do processo industrial de fabricação de farinha de mandioca e o resíduo passa por uma fermentação natural que o torna mais ácido que a manipueira deste trabalho.

O maior teor de cinzas encontrado na manipueira de Vitória da Conquista pode ser interessante para a produção industrial, uma vez que estas cinzas são resíduos inorgânicos e seus principais constituintes, K, Na, Ca, Mg são importantes nos processos biológicos. Outros estudos sobre a composição da manipueira obtida no município de Vitória da Conquista - Bahia verificaram que este resíduo possuía significativa quantidade de minerais, correspondendo a uma fonte de micronutrientes necessários ao cultivo de microrganismos [14].

3.2 Planejamento fatorial experimental do cultivo de *R. glutinis* para produção de biomassa

Os maiores valores de produção de biomassa foram obtidos quando a velocidade de agitação estava em seu nível maior (exemplo: experimento 4), porém o segundo maior valor de produção de biomassa corresponde a um experimento no qual a temperatura estava em seu maior nível e a agitação estava em seu menor nível (experimento 6). As variáveis que influenciam o desempenho do cultivo de *R. glutinis* usando manipueira como fonte de carbono para produção de carotenoide são muitas, os resultados encontrados no presente estudo indicaram uma possível interação de fatores. Também é possível observar a influência do pH no crescimento do microrganismo. Maiores valores de pH levaram a maiores produções de biomassa (Tabela 4).

Como cada cepa tem um valor ótimo de pH no qual deve ser cultivada, a maior produção de biomassa no pH 7,0 indicou que a capacidade tamponante intracelular conseguiu manter as atividades enzimáticas dentro da célula não sendo afetada pelo pH externo. A Figura1 apresenta os valores de concentração de biomassa em relação a agitação e a temperatura. Observa-se que quanto maior a agitação maior a produtividade, bem como a temperatura. Pode-se observar que a maior produção de biomassa ocorreu nos maiores níveis de agitação e temperatura. Ou seja, quando temperatura era maior, maior produção era observada, mas a agitação estava em seu nível inferior.

A produção de biomassa é uma importante resposta a ser analisada com a resposta produção de carotenoides. Os carotenoides (metabólitos primários) são biomoléculas produzidas dentro da *R. glutinis*, assim, um aumento da biomassa seria esperado um aumento na produção de carotenoides. Entretanto, as diferentes condições operacionais aqui estudadas poderiam gerar concentrações diferentes de nutrientes no meio (processo descontínuo) e assim, obter rendimentos diferentes de carotenoides no meio de cultivo. As variáveis do planejamento experimental são fatores que afetam a quantidade de carotenoides produzidos durante a fermentação submersa e seus resultados são mostrados na tabela 4. Esses resultados foram utilizados para o cálculo das estimativas dos efeitos de cada variável, ou seja, da importância que os fatores têm sob cada ensaio.

TABELA 4 – Resultados do planejamento experimental tendo como resposta concentração celular.

ENSAIO	FATORES			
	T (°C)	**Agitação (rpm)**	**pH**	**Biomassa (g/L)**
1	–	–	–	0,719
2	–	–	+	0,696
3	–	+	–	2,039
4	–	+	+	3,018
5	+	–	–	2,586
6	+	–	+	2,418
7	+	+	–	-
8	+	+	+	0,765
9	–	–	–	0,653
10	–	–	+	0,759
11	–	+	–	2,338
12	–	+	+	2,205
13	+	–	–	2,521
14	+	–	+	2,281
15	+	+	–	0,728
16	+	+	+	0,716

Sendo a *R. glutinis* um microrganismo mesófilo, espera-se que sua utilização industrial seja na faixa de 25 a 37 °C. Assim, seu coeficiente de manutenção deverá estar em um valor ótimo nesta faixa de temperatura, e além disso, esperava-se que com o aumento da temperatura todas as atividades aumentassem de velocidade, ou seja, maior temperatura, maior crescimento de biomassa. Portanto, investigou-se essa faixa de temperatura de modo que fosse confiável que a variação de temperatura não resultasse em alterações no metabolismo basal da célula. Os resultados obtidos para o estudo da agitação mostraram que as maiores velocidades ajudaram no aumento de transferência de calor e massa no meio de cultivo. O maior crescimento da biomassa em

velocidades de agitação maiores indicou que este fator auxiliou na manutenção das células em suspensão sendo essencial para melhorar as condições de crescimento de microrganismo.

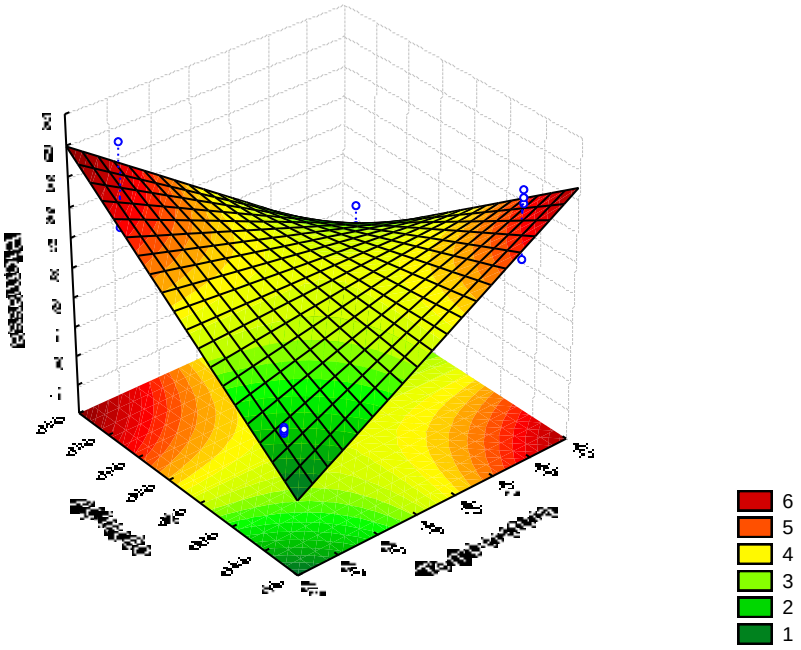

Figura 1 – Análise da produção de biomassa: relação agitação e temperatura.

A Figura 2 mostra a produção de biomassa em relação as variáveis temperatura e pH. Pode-se observar que a produção de biomassa ocorreu quando a temperatura foi maior e quando o pH foi maior. Estudos divergem em relação a um pH ótimo de meio para a levedura *R. glutinis* [21, 22], seja devido ao meio utilizado ou seja devido as condições da produção, mas todos os estudos têm mostrado que em pH extremos independente do meio de cultivo *R. glutinis* não apresentou desenvolvimento apreciável.

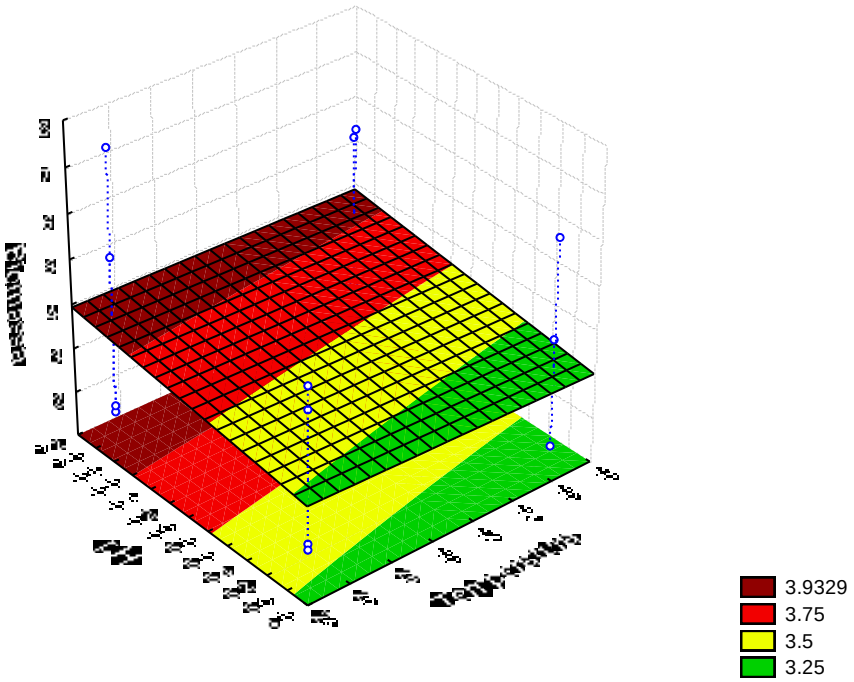

Figura 2 – Análise da produção de biomassa: relação pH e temperatura.

Com relação a temperatura, Uenojo *et al.* (2007), demonstraram que a levedura *R. glutinis* apresentou-se sensível ao fator temperatura em relação ao crescimento celular. Das temperaturas testadas (9 níveis), a faixa ótima de crescimento foi de 28 a 30ºC, comportamento típico do gênero, faixa de temperatura observada neste trabalho, onde a levedura cresceu melhor em temperatura de 37°C [23]. Aksu e Eren (2007) observaram em seus estudos que taxa de crescimento específico da levedura aumentou com a elevação da temperatura de 25 para 30ºC, de aproximadamente 0,175 para 0,238h^{-1} entretanto, o crescimento diminuiu em temperaturas maiores. Esses autores fizeram seus estudos em valores de pH e agitação fixos, assim esses estudos indicaram que um estudo planejado dessas variáveis deveria ser realizado para a obtenção de valores ótimos em conjunto de forma a fornecer um crescimento ótimo de biomassa [9].

A Figura 3 mostra a produção de biomassa em relação a velocidade de agitação e valores de pH. Pode-se observar que a produção de biomassa foi maior quando a agitação e o pH estavam em seus maiores níveis. Outro estudo verificou que com a elevação do pH de 3,0 para 7,0 houve um aumento nas taxas de crescimento concordando com os dados obtidos neste trabalho [9]. Este resultado é contrário ao encontrado por outros no qual a levedura *R. glutinis* apresentou um pH ótimo para o crescimento de 5,91 [24]. Diferentemente do encontrado neste estudo onde o pH 7 se

mostrou ideal para a produção de biomassa e também de betacaroteno, como será mostrado a seguir, Latha *et al*. (2005) verificaram que 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) seu crescimento foi mínimo [25].

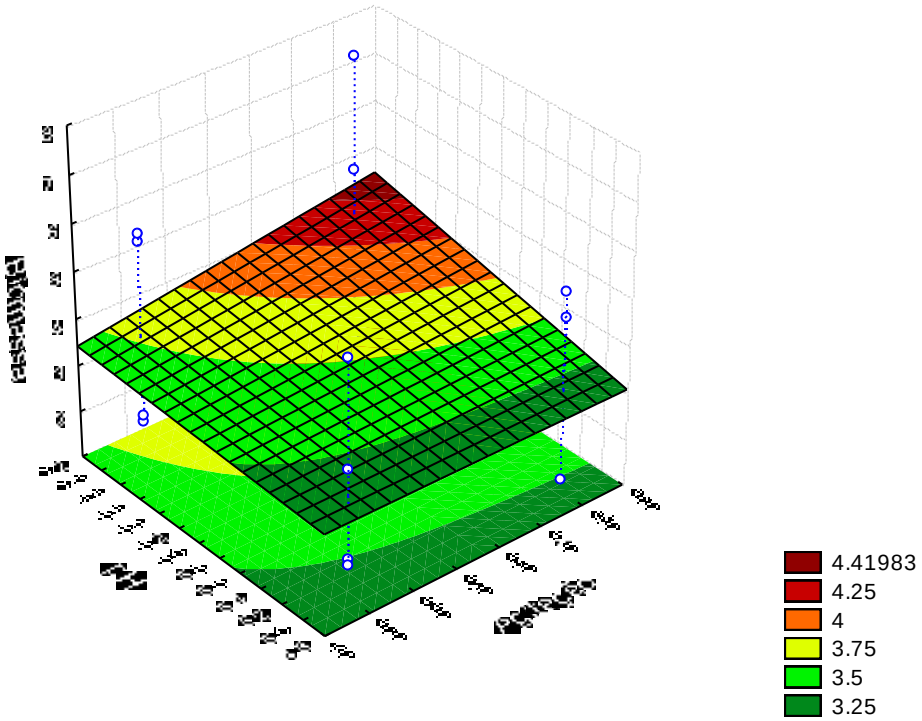

Figura 3 – Análise da produção de biomassa: relação pH e agitação.

A Tabela 5 aponta claramente que alguns efeitos são mais significativos que outros. Assim, os valores determinados para esses fatores menos significativos podem ser atribuídos às flutuações aleatórias do processo, isto é, ao "ruído" embutido nos valores das respostas (princípio da esparsidade dos efeitos). A análise de variância (ANOVA) apontou que, das variáveis individuais, a que mais exerce influência sobre a produção tanto de biomassa quanto de betacaroteno é a temperatura e a velocidade de agitação, contudo quando observadas em conjunto conforme pode ser observado no gráfico de Pareto (Figura 4).

Figura 4 - Gráfico de Pareto com os valores de significância de cada um dos efeitos estudados e o nível de significância destes efeitos quando colocados em conjunto para produção de Biomassa.

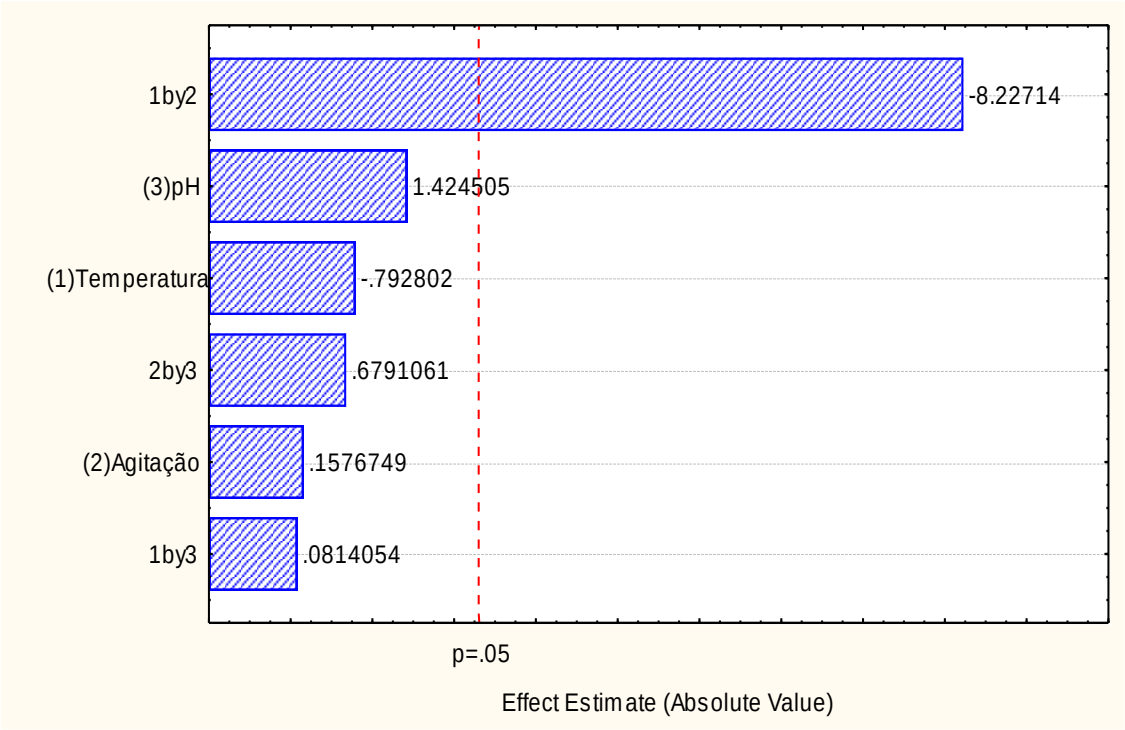

TABELA 5 – Análise de variância para produção de biomassa.

	SS	*df*	*MS*	*F*	*p*
(1)Temperatura	0,50101	1	0,50101	0,62854	0,450762
(2)Agitação	0,01982	1	0,01982	0,02486	0,878620
(3)pH	1,61751	1	1,61751	2,02922	0,192118
1 by 2	53,95322	1	53,95322	67,68578	0,000036
1 by 3	0,00528	1	0,00528	0,00663	0,937119
2 by 3	0,36762	1	0,36762	0,46119	0,516233
Error	6,37690	8	0,79711		
Total SS	61,90916	14			

A presença de interações de fatores num planejamento (tabela 5) mostra que a temperatura e velocidade de agitação não podem ser analisados separadamente. O diagrama de Pareto mostra que o efeito do pH é mais importante no seu nível positivo e que com a temperatura no seu nível negativo, entretanto esses efeitos não se mostraram significativos com 95% de intervalo de confiança. Os efeitos da temperatura, velocidade de agitação e pH não foram significativos individualmente com 95% de intervalo de confiança.

Entretanto quando o intervalo de confiança foi para 75%, além do efeito de interação temperatura/Agitação, o efeito do pH também se mostrou significativo. Isso sugere que o pH deve ser sempre mantido alto como um fator de segurança para uma melhor produção de biomassa. Quando trabalhando em velocidades de agitação altas, o sistema reacional não precisa de um controle minucioso do pH para aumentar o rendimento de biomassa, ou seja, pH em nível alto é mais sensível a variação de temperatura e velocidade de agitação do que pH em nível baixo.

O modelo para todas as variáveis analisadas foi considerado satisfatório, pois os gráficos dos resíduos contra as respostas têm uma aparência aleatória e os gráficos normais dos resíduos têm uma aparência mais ou menos retilínea. A equação 01 mostra o modelo obtido para a produção de biomassa com 95% de intervalo de confiança.

$$Biomassa = \underset{(\pm 0{,}2353)}{3{,}5057} - \underset{(\pm 0{,}4706)}{3{,}8713} \times Temperatura \times Agitação + \underset{(\pm 0{,}4706)}{0{,}6703} \times pH \qquad (01)$$

Observou-se, através da quantificação da biomassa que as condições em que o microrganismo mais cresce são pH 7, velocidade de agitação de 150 rpm e temperatura de 37C°. Entretanto, o crescimento microbiano está relacionado a produção de biomassa e maior produção de biomassa não necessariamente significa maior produção de carotenoide.

Observou-se através da curva de crescimento da levedura que a fase exponencial, se deu até as 72 horas. A fase exponencial é onde a levedura apresenta crescimento celular, nela são produzidos os produtos do metabolismo primário, dentre estes estão a maioria dos produtos de fermentação. Desta forma é de interesse industrial a ampliação desta fase, com o objetivo de aumentar a produtividade. A fase *lag* é a fase de adaptação do microrganismo ao meio, ela precede a fase exponencial neste período pode não ocorrer multiplicação celular, fases de latência extensas não são interessantes

industrialmente. Mantivemos o microrganismo na fase exponencial, uma vez que, após esta fase começa a fase de latência. Nesta fase a taxa de morte se iguala à taxa de crescimento e são produzidos metabólitos secundários, além da falta de que vão levar a morte de células que levará a cultura para a fase seguinte que é a de declínio (AQUARONI, 2001).

3.3 Planejamento fatorial experimental do cultivo de *R. glutinis* para produção de carotenoide

Os dados obtidos para a produção de carotenoide mostraram que a condição em que mais se produziu betacaroteno foi quando a temperatura estava em seu menor nível e a agitação e ph estavam em seu maior nível (Tabela 6).

.

TABELA 6 – Resultados do planejamento experimental tendo como resposta concentração de carotenoides.

ENSAIO	FATORES			
	T	**Agitação**	**pH**	**Carotenoide $\times 10^3$ (g/L)**
1	–	–	–	3,66
2	–	–	+	3,23
3	–	+	–	8,833
4	–	+	+	11,170
5	+	–	–	3,225
6	+	–	+	2,696
7	+	+	–	2,727
8	+	+	+	1,979
9	–	–	–	3,661
10	–	–	+	3,225
11	–	+	–	1,761
12	–	+	+	5,531
13	+	–	–	2,945

14	+	–	+	9,332
15	+	+	–	2,727
16	+	+	+	1,761

Analisando a Figura 5 que mostra a concentração de betacaroteno em relação a temperatura e pH, pode-se observar que a concentração de betacaroteno aumentou quando a temperatura diminuiu e quando o pH estava em seu nível mais alto. Entretanto esse efeito foi muito mais pronunciado quando a temperatura foi de 25°C, ou seja, houve uma maior produção de betacaroteno quando a temperatura era de 25°C e o pH 7,0. A Figura 6 mostra a concentração de betacaroteno em relação a temperatura e a velocidade de agitação. Pode-se observar que valores de temperatura e velocidade de agitação mais baixos levaram a maiores produções de betacaroteno, entretanto esse efeito só pode ser observado quando a temperatura estava em seu nível mais baixo, pois na temperatura de 37°C, a produção de betacaroteno permaneceu praticamente a mesma nos diferentes valores de velocidade de agitação.

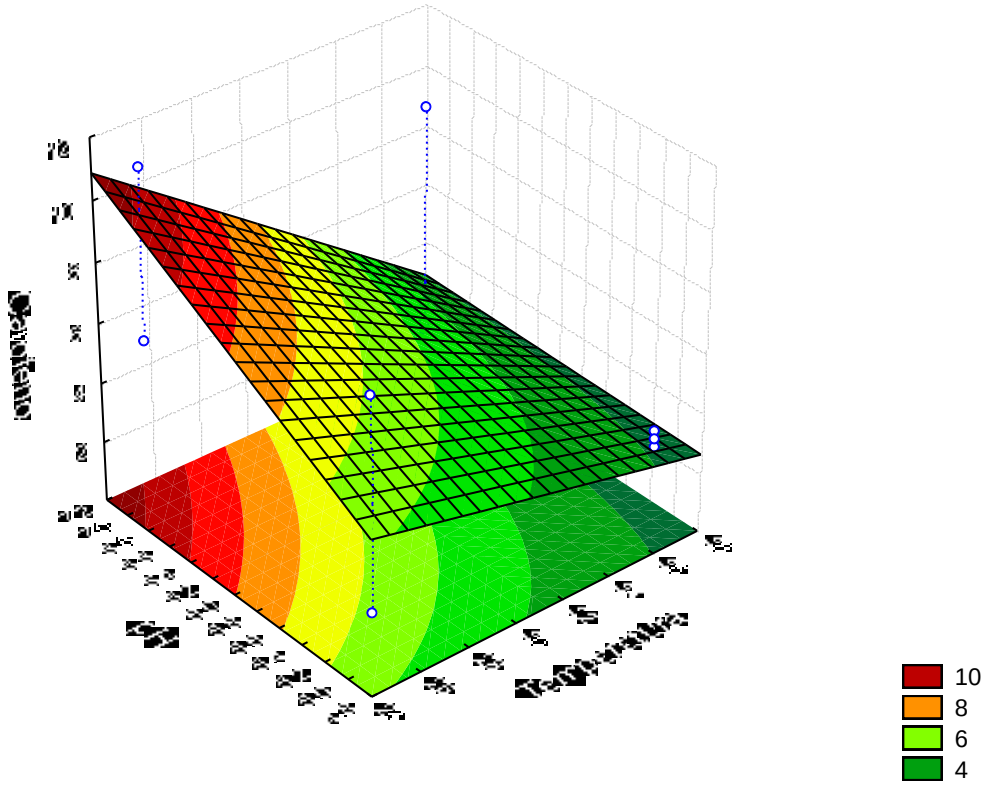

Figura 5 – Produção de carotenoides em relação a Temperatura e ao pH.

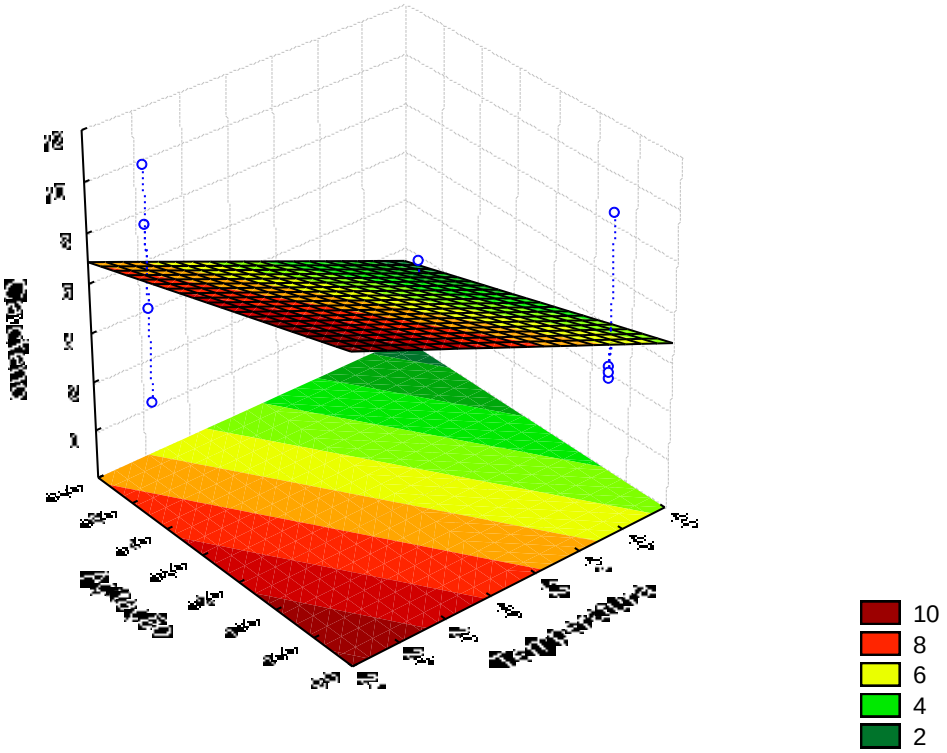

Figura 6 – Produção de carotenoides em relação a Temperatura e a velocidade de agitação.

Malisorn e Suntornsuk (2008) otimizaram o efeito da temperatura sobre a produção de carotenoide e biomassa em *Rhodotorula glutinis*, relatando que a produção máxima foi obtida 29°C e 30°C, respectivamente. De acordo com Hayman *et al*., (1979), o efeito de temperatura regula a concentração de enzimas envolvidas na produção de carotenoide, e, portanto, os níveis de carotenoide e seu tipo são regulados nos microrganismos [33,35].

Segundo Frengova *et al*. (1995), a concentração relativa de cada carotenoide foi alterada pela temperatura de cultivo por *R. glutinis*. Quando a levedura foi cultivada em 5ºC, ocorreu a produção predominante de betacaroteno, enquanto que o cultivo a 25 ºC levou também a síntese de toruleno e torularrodina. Nesse estudo, os autores observaram que o crescimento celular ótimo foi obtido em 30 ºC. Nesta mesma temperatura, a máxima produção de carotenoide foi de 8388 µg/L e 31,9 g/L de biomassa. Portanto, uma maior produção do carotenoide betacaroteno na temperatura de

menor nível estudada neste planejamento se mostra interessante quando maiores temperaturas implicam em maiores gastos energéticos de cultivo [34].

A Figura 7 mostra a produção de betacaroteno em relação a velocidade de agitação e de pH. Pode-se observar que houve uma maior formação do carotenoide quando o pH estava em seu nível mais alto e a velocidade de agitação em seu nível mais baixo. Quando o pH estava no seu nível mais baixo (5,0), a produção de betacaroteno ficou praticamente a mesma em qualquer valor de agitação. Portanto, não se observou uma grande influência da agitação quando o pH era de 5,0, mas se pode observar uma maior variação na produção de betacaroteno quando o pH era 7,0.

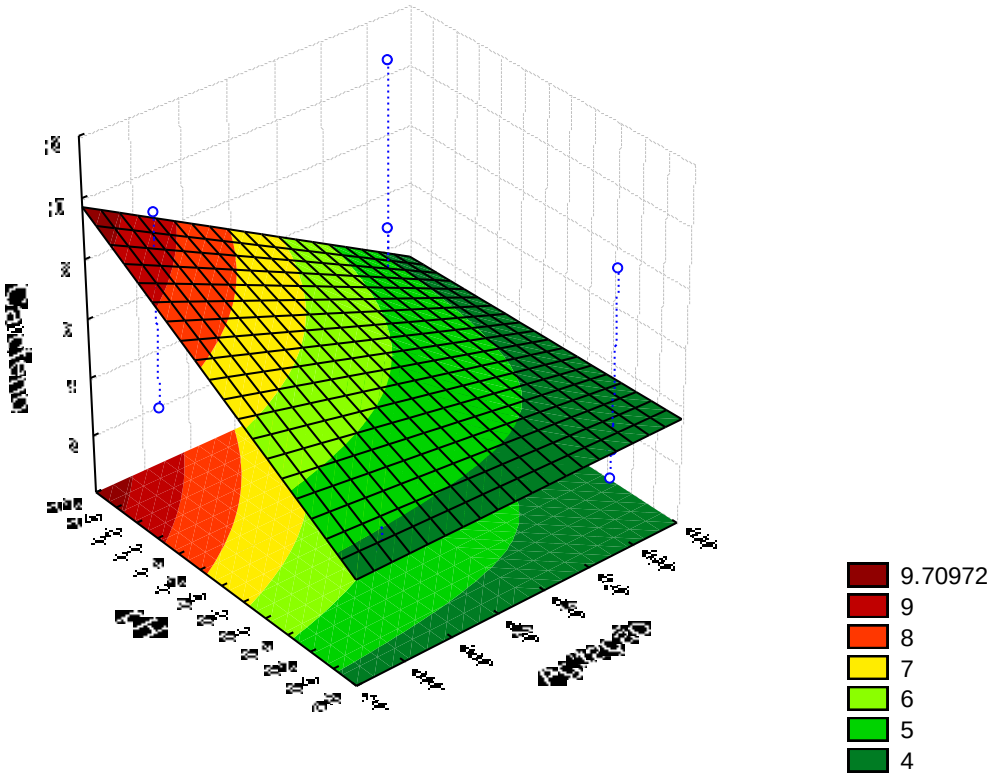

Figura 7 – Produção de carotenoide em relação pH e agitação.

O pH é um dos parâmetros ambientais mais importantes que exercem influência no crescimento celular e formação de produto. Os resultados encontrados no presente estudo concordam com os encontrados por Aksu e Eren (2007) que verificaram que com a elevação do pH de 3,0 para 7,0 houve um aumento tanto das taxas de crescimento quanto de produção de carotenoide [9]. Latha *et al*. (2005) incubaram o microrganismo num meio com glicose, em temperaturas entre 29 a 32ºC, e agitação de 200 rpm. Os

autores verificaram que 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 carotenoide (3,5 mg/L) [25].

Com relação a velocidade de agitação, verificou-se neste estudo que uma menor agitação levou a uma maior produção de betacaroteno. Segundo Marova *et al.* 2012 a aeração é outro parâmetro importante, devido à carotenogênese ser um processo aeróbio e a taxa de transporte de ar na cultura de levedura é um fator essencial para a assimilação do substrato para a taxa de crescimento, massa celular e carotenogênese. Além disso, a diminuição dos níveis de oxigênio influencia a produção de carotenos ou xantofilas, devido à oxidação de carotenos em Astaxantina, Cantaxantina e outros [26].

Saenge *et al*. 2011 examinou os efeitos da taxa de aeração sobre o crescimento celular, o rendimento lipídico, a produção de carotenoide e o consumo de glicerol por *Rhodotorula glutinis*. A agitação está relacionada diretamente relacionada a aeração, já que uma maior agitação leva a maior aeração do meio de cultivo.Os autores observaram que a taxa de aeração teve um efeito significativo na produção de biomassa e lipídios. Quando a velocidade variou de 0 para 2 vvm, a biomassa e o rendimento lipídico foram os maiores em 8,17 e 4,32 g L-1, respectivamente[13]. Davoli *et al*. 2004 estudaram a influência da aeração sobre o conteúdo de carotenoide de *R. glutinis* e observaram que para uma maior taxa de aeração obteve-se maior concentração de carotenoide, um aumento de 113 para 206 µg/g, embora o perfil de carotenoide permanecesse inalterado [27].

Uma análise dos efeitos mostra que a produção média global de betacaroteno foi de 5,7 g/L. Não houve efeitos de interação significativos. A Figura 8 mostra o gráfico de Pareto para os efeitos significativos num intervalo de 75% de confiança. Analisando o efeito da temperatura, pode-se observar que este foi o único efeito significativo para produção de betacaroteno.

Analisando a Tabela 7 que mostra a ANOVA para a produção de carotenoide, pode-se observar que o valor do teste F de 2,6 é maior que F(5,1) indicando que o modelo é significativo com 25% de nível de confiança. O valor da probabilidade do nível p também é baixo (0,167) indicando a significância do modelo para a variável temperatura. Pois, os efeitos de interação não foram estatisticamente significantes, assim, o ajuste do modelo foi de regressão linear. Deve-se observar que as condições operacionais escolhidas levaram em consideração crescimento de biomassa e produção de betacaroteno, que são importantes respostas para definir a produção dessa pró-

vitamina. Além disso, para se obter alta concentração de biomassa com alta produção de betacaroteno não é necessário trabalhar em um único conjunto de condições experimentais. Desejando-se outro carotenoide que o betacaroteno, é possível um ajuste adequado das condições estudadas. Os resultados dos experimentos ajustaram um modelo de regressão como mostra a equação 2.

$$Betacaroteno = 5{,}6865 - 4{,}5254 \times Temperatura \quad (02)$$
$$(\pm 1{,}2549) \quad (\pm 2{,}8061)$$

TABELA 7 – Análise de variância para a produção de carotenoide (ANOVA).

	SS	***df***	***MS***	***F***	***p***
(1)Temperatura	32,7672	1	32,76715	2,600845	0,167725
(2)Agitação	8,1074	1	8,10741	0,643513	0,458855
(3)pH	17,8920	1	17,89201	1,420152	0,286853
1 by 2	6,1155	1	6,11553	0,485411	0,517036
1 by 3	5,7319	1	5,73191	0,454962	0,529911
2 by 3	62,9933	5	12,59866		
Error	118,9314	10			
Total SS	32,7672	1	32,76715	2,600845	0,167725

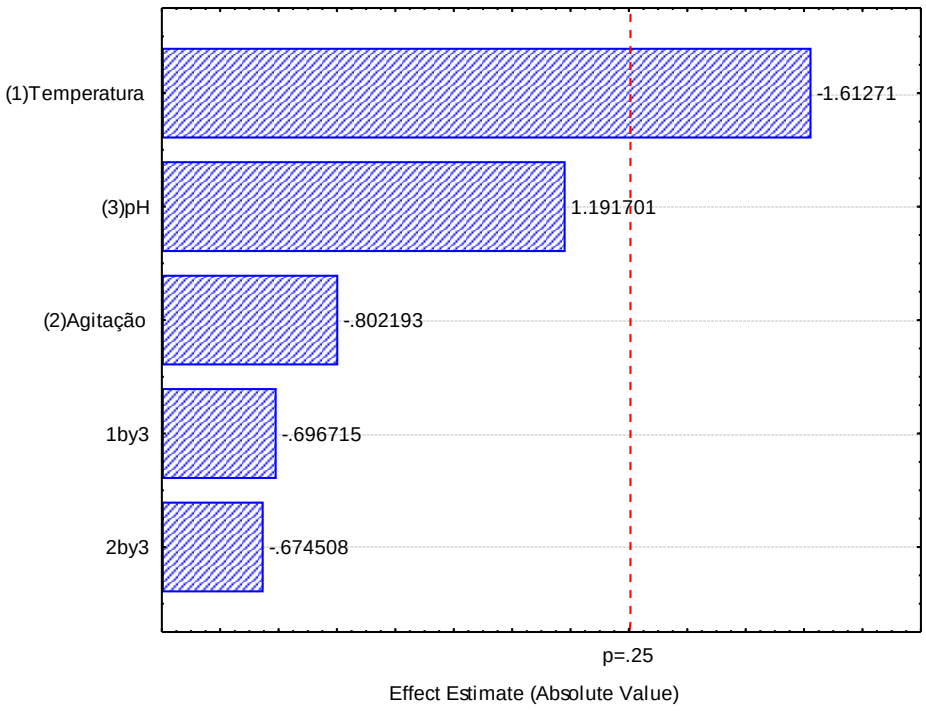

Figura 8 – Gráfico de Pareto com 75% de intervalo de confiança.

3.4 Análise da produção de carotenoides usando manipueira como fonte de carbono

Após selecionar a melhor forma de extração dos fermentados da levedura, estes foram submetidos a extração a fim de confirmar a melhor condição para produção de carotenoide usando manipueira como substrato. Conforme pode ser observado na tabela 8, os maiores valores de produção de carotenoide tanto em meio sintético, quanto no meio usando manipueira como substrato foram alcançados em pH 7. Mesmo tendo variação quanto as condições de agitação, todos os fermentados em pH 7 alcançaram maiores valores de produção comparados aos fermentados em pH 5.

Como já mencionado anteriormente, dados da literatura apontam que entre espécies de *Rhodotorula*, a *R. Glutinis* é a que produz percentualmente mais betacaroteno[28]. Em outro estudo envolvendo o cultivo de *R. glutinis* em diferentes composições de meio de cultura contendo caldo de cana-de-açúcar. Squina *et al.*, 2002 observaram que a composição de carotenoide variou, e inclusive, a variação percentual na produção de betacaroteno foi de 33 a 50% [29].

Todos estes dados mostram que a quantidade de carotenoide e o tipo de carotenoide produzido varia com a temperatura, agitação, pH e concentração do meio de cultura. Os valores de betacaroteno encontrados neste estudo podem indicar que o microrganismo produziu não só o betacaroteno, mas algum outro tipo de carotenoide. Estabelecer o tipo exato de carotenoide produzidos foi além do escopo deste trabalho, pois necessitaria de uma ampla análise dos mais de 600 carotenoides existentes. Outro ponto importante a se ressaltar é o tipo de substrato, a manipueira é um substrato possível de ser utilizado para a produção de carotenoide, pois se conseguiu produzir betacaroteno sem a necessidade de suplementação no meio de cultivo.

TABELA 8 – Valores de concentração em g/L produzidas pela levedura em cada uma das condições testadas.

Ensaio	Condição pH – Agitação – Temperatura	Betacaroteno × 10^3 (g/L)
1	7,0 – 100 rpm – 25°C	3,225
2	7,0 – 150 rpm – 25°C	3,330
3	5,0 – 150 rpm – 25°C	2,948

O microrganismo utilizado neste estudo conseguiu crescer no substrato manipueira como pode ser observado na Figura 9, as condições operacionais as quais se produziu mais biomassa foram as mesmas condições usadas para o meio sintético, comprovando a influência das variáveis estudadas neste planejamento experimental. Quanto a produção de betacaroteno, observou-se que o substrato manipueira pode ser usado para baratear o custo da produção, como pode ser observado na Tabela 8, foi possível produzir betacaroteno neste substrato, contudo a sua produção, mesmo nas melhores condições estudadas (pH 7, 150 rpm, 25 C°) foi menor comparada com a produção na mesma condição em meio sintético.

Uma possível investigação para a menor produção de carotenoide pela levedura quando em fermentação usando manipueira como fonte de carbono, pode estar relacionada ao fato de, apesar de apresentar açúcares redutores, a sua composição é menos rica em outros nutrientes do que o meio sintético. Como pode ser visto na Figura 9, que mostra a concentração de biomassa ao longo do tempo para o substrato

manipueira, a levedura diminuiu sua velocidade de crescimento com o decréscimo de açúcares. Contudo ainda existe açúcares para serem consumidos no momento em que ela entra na fase estacionária.

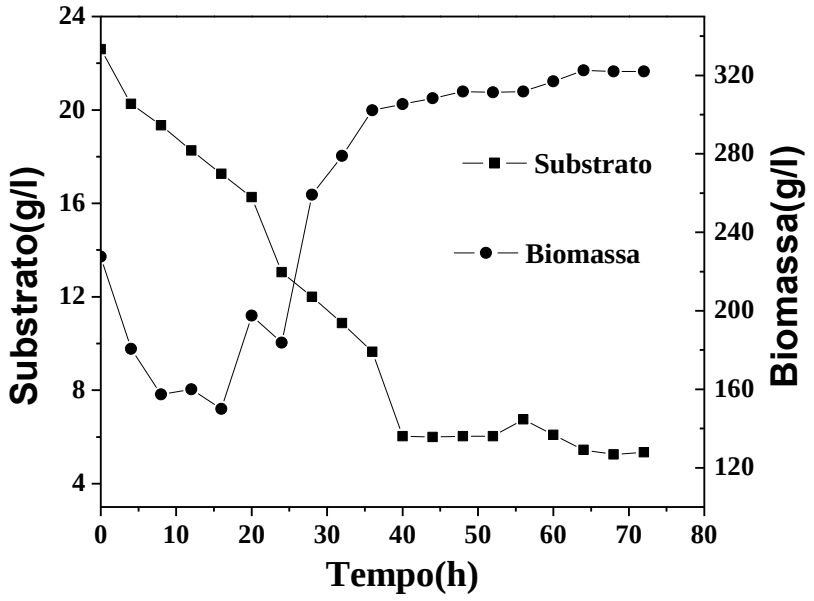

Figura 9 – Curvas do crescimento da biomassa e consumo de açúcares redutores.

Na bioprodução de carotenoide por cepas do gênero *Rhodotorula* em diferentes substratos (mosto de uva, xarope de glicose, melaço de beterraba, extrato de farinha de soja e extrato de farinha de milho). Buzzini e colaboradores (2000) obtiveram rendimento máximo de carotenoide totais (5,9 mg/L) e carotenoide específicos (630 μg/g) para a cepa *R. glutinis* cultivada em mosto de uva concentrado (820 g/L do total de carboidratos) [11].

Na produção de carotenoide por *R. glutinis* utilizando substratos de baixo custo (glicose, sacarose de melaço e lactose do soro de queijo), Aksu e Eren (2007), observaram que a maior concentração de carotenoide totais (125 mg/L) foi obtida com 20 g/L de sacarose de melaço; enquanto que o maior rendimento de produto baseado na máxima concentração celular (35,5 mg/g) foi alcançado com a lactose do soro na concentração de 13,2 g/L. de carotenoide e biomassa [9]. Assim, pode-se observar que a levedura *R. glutinis* conseguiu se adaptar muito bem ao meio complexo da manipueira que é um resíduo agroindustrial altamente poluente e ainda produzir uma biomolécula de alto valor agregado como o betacaroteno.

Vale ressaltar que em cada um dos trabalhos citados as condições ótimas de cultivo foram outras, diferentes das condições abordadas neste estudo, além disso a maioria dos trabalhos mostrou os resultados de carotenoide totais não especificando quais seriam e teriam atividade pró-vitamínica A. Considerando que este estudo teve foco na produção de betacaroteno (alta atividade pró-vitamínica A), e que dentro dos carotenoide totais existem muitos outros carotenoides, o valor de 0,03 g/l encontrada no presente estudo é uma quantidade consideravelmente alta. Utilizado a equação de rendimento de produto por substrato:

$$Y_{ps} = \frac{P_1 - P_0}{S_0 - S_1}$$

Observa-se que para cada 20, 6 g/g de açucares redutores da manipueira produzem-se 0,03 g/l de betacaroteno, mostrando-se um rendimento considerável para este resíduo.

3.5 Extração de carotenoides

De acordo com os resultados obtidos através dos métodos de extração mostrados na Tabela 9, observa-se que éter de petróleo foi o solvente que apresentou melhor desempenho. Verificou-se que a técnica de extração com o auxílio do ultrassom tornou o processo de extração mais eficiente.

TABELA 9 – Concentração em mg/L de betacaroteno extraído por cada solvente.

Solvente	Concentração (mg/L)	Concentração (mg/L) + ultrassom
ÉTER DE PETRÓLEO	8,65	10,36
ÉTER DE PETRÓLEO + ACETONA	2,58	4,13
HEXANO	1,80	2,73
ACETONA	1,90	2,50
ACETONA + HEXANO	1,30	1,88
ÉTER DE PETRÓLEO + HEXANO	0,97	1,79

Oliveira (2010) também testou uma técnica de extração com acetona acoplada ao ultrassom, e obteve uma melhor extração do que com a extração utilizando somente solventes. Segundo Oliveira (2010), o ultrassom age nas paredes das células, a fim de ajudar no rompimento das mesmas, aumentando a concentração de betacaroteno e com isso aumentando o rendimento [30]. Barbato (2014) observou que a extração dos carotenoide realizada com acetona/éter de petróleo e ultrassom foi o processo mais eficiente, através do qual obtiveram-se maiores concentrações de carotenoide para todos os meios estudados [31] e os seus dados concordam com os encontrados por Oliveira (2010). Diferenças na eficiência de extração de carotenoides de diferentes linhagens de *Rhodotorula* também foram reportadas no estudo conduzido por Peterson *et al.*, onde o mesmo observou que com acetona sob agitação houve melhor extração para *R.Glutinis.* (1958) [32].

Interessante ressaltar que, durante a extração foi possível observar o solvente adquirindo continuamente a coloração correspondente aos carotenoides, indicando visualmente a presença do componente no meio. Inicialmente, observou-se que a utilização única ou combinação de solventes não era capaz de extrair totalmente todo o carotenoide, uma vez que ainda era possível verificar visualmente (com auxílio de microscópio) cor dentro da célula. Assim, a técnica de ultrassom foi acoplada a extração solvente para auxiliar a etapa de separação de modo a aumentar seu rendimento.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A manipueira se apresentou como substrato viável para o crescimento de *Rhodotorula Glutinis* por possui dentro das suas características físico-químicas, açucares que são utilizados pelo microrganismo.

Os dados do planejamento experimental mostraram que em agitação de 150 rpm e temperaturas de 37 Cº a levedura produz mais biomassa e mais betacaroteno, tanto em meio sintético quanto na manipueira. Além disso, eles mostraram que as variáveis sozinhas possuem menos influência do que quando interagem entre sí.

A produção de betacaroteno através da fermentação da manipueira pela levedura se mostrou eficiente e produziu quantidades significantes, nas melhores condições apresentadas. Como perspectivas futuras, pode-se otimizar o processo para maximizar a produção.

5. REFERÊNCIAS

1. Carotenoid markert by values. In: *The global market for carotenoids*. (2015). Disponível em: <http://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/carotenoids-global-market-report-fod025e.html>. Acesso em: FEV. 2017.

2. Tang, G., Qin, J., Dolnikowski, G. G., Russell, R. M., & Grusak, M. A. (2009). Golden Rice is an effective source of vitamin A. *The American journal of clinical nutrition*, *89*(6), 1776-1783.

3. Rodriguez-Amaya, D. B. (1997). *Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed and stored foods*. Arlington, VA: John Snow Incorporated/OMNI Project.

4. Chagas, M. H. D. C., Flores, H., Campos, F. D. A. C., Santana, R. A. D., & Lins, E. C. B. (2003). Teratogenia da vitamina A. *Rev. bras. saúde matern. infant*, *3*(3), 247-252.

5. Jaswir, I., & A Monsur, H. (2011). Anti-inflammatory compounds of macro algae origin: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*, *5*(33), 7146-7154.

6. Dufossé, L. (2009). Microbial and microalgal carotenoids as colourants and supplements. In *Carotenoids* (pp. 83-98). Birkhäuser Basel.

7. Evangelista, J. (1994). Tecnologia de alimentos. In *Tecnologia de alimentos*. Atheneu.

8. Schneider, T., Graeff-Hönninger, S., French, W. T., Hernandez, R., Merkt, N., Claupein, W., & Pham, P. (2013). Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents. *Energy*, *61*, 34-43.

9. AKSU, Zümriye; EREN, Ayse Tugba. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochemical engineering journal*, v. 35, n. 2, p. 107-113, 2007.

10. Valduga, E., Tatsch, P. O., Tiggemann, L., Treichel, H., Toniazzo, G., Zeni, J., & Furigo, A. J. (2009). Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. *Química Nova*, *32*(9), 2429-2436.

11. Buzzini, P., & Martini, A. (2000). Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. *Bioresource Technology*, *71*(1), 41-44.

12. Fontana, J. D., Czeczuga, B., Bonfim, T. M. B., Chociai, M. B., Oliveira, B. H., Guimaraes, M. F., & Baron, M. (1996). Bioproduction of carotenoids: the comparative use of raw sugarcane juice and depolymerized bagasse by *Phaffia rhodozyma*. *Bioresource Technology*, *58*(2), 121-125.

13. Saenge, C., Cheirsilp, B., Suksaroge, T. T., & Bourtoom, T. (2011). Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry*, *46*(1), 210-218.

14. Neves, O. S. C., Souza, A. S., Costa, M. A., de Almeida Sousa, L., Viana, A. E. S., & Neves, V. B. F. (2014). PERSISTÊNCIA DO CIANETO E ESTABILIZAÇÃO DO pH EM MANIPUEIRA. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, *8*(1).

15. Sedmak, J. J., Weerasinghe, D. K., & Jolly, S. O. (1990). Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnology techniques*, *4*(2), 107-112.

16. Zenebon, O., Pascuet, N. S., & Tiglea, P. (2008). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. *São Paulo: Instituto Adolfo Lutz*, 1020.

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

18. Pinto, P. H. M., Camili, E. A., & Cabelo, C. (2013). Processo de flotação no tratamento da manipueira originada da fabricação de farinha de mandioca. *RETEC-Revista de Tecnologias*, *3*(1).

19. Maróstica Jr, M. R., & Pastore, G. M. (2006). Biotransformation of citronellol in rose-oxide using cassava wastewater as a medium. *Food Science and Technology (Campinas)*, *26*(3), 690-696.

20. Nitschke, M., & Pastore, G. M. (2003). Biosurfatantes a partir de resíduos agroindustriais. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, *6*, 63-67.

21. Johnson, V., Singh, M., Saini, V. S., Sista, V. R., & Yadav, N. K. (1992). Effect of pH on lipid accumulation by an oleaginous yeast: *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *8*(4), 382-384.

22. Martínez, C., Gertosio, C., Labbe, A., Pérez, R., & Ganga, M. A. (2006). Production of *Rhodotorula glutinis*: a yeast that secretes alpha-L-arabinofuranosidase. *Electronic Journal of Biotechnology*, *9*(4), 0-0.
23. Uenojo, M., Marostica, M. R., & Pastore, G. M. (2007). Carotenoides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. *Química Nova*, *30*(3), 616.

24. Tinoi, J., Rakariyatham, N., & Deming, R. L. (2005). Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. *Process Biochemistry*, *40*(7), 2551-2557.

25. Latha, B. V., Jeevaratnam, K., Murali, H. S., & Manja, K. S. (2005). Influence of growth factors on carotenoid pigmentation of *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY from natural source.

26. Marova, I., Carnecka, M., Halienova, A., Certik, M., Dvorakova, T., & Haronikova, A. (2012). Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. *Journal of Environmental Management*, *95*, S338-S342.

27. Davoli, P., Mierau, V., & Weber, R. W. S. (2004). Carotenoids and fatty acids in red yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, *40*(4), 392-397.

28. Squina, F. M., & Mercadante, A. Z. (2003). HPLC analysis of carotenoids from five Rhodotorula strains. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, *39*(3), 309-318.

29. Squina, F. M., Yamashita, F., Pereira1, J. L., & Mercadante, A. Z. (2002). Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* and *R. glutinis* in culture medium supplemented with sugar cane juice. *Food Biotechnology*, *16*(3), 227-235.

30. OLIVEIRA, C. G. *Extração e caracterização do betacaroteno produzido por Rhodotorula glutinis tendo como substrato o suco de caju*. 2010. Trabalho de conclusão de curso de (Graduação em Engenharia Química) – Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 31f.

31. Barbato, J. (2014). *Estudo da obtenção de carotenoides por fermentação empregando a levedura Rhodotorula sp em melaço e caldo de cana-de-açúcar como meio de cultura* (Bachelor's thesis, Universidade Tecnológica Federal do Paraná).

32. Peterson, W. J., Evans, W. R., Lecce, E., Bell, T. A., & Etchells, J. L. (1958). Quantitative determination of the carotenoids in yeasts of the genus *Rhodotorula*. *Journal of bacteriology*, *75*(5), 586.

33. Malisorn, C., & Suntornsuk, W. (2008). Optimization of β-carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. *Bioresource Technology*, *99*(7), 2281-2287.

34. Frengova, G. I., Simova, E. D., & Beshkova, D. M. (1995). Effect of temperature changes on the production of yeast pigments co-cultivated with lacto-acid bacteria in whey ultrafiltrate. *Biotechnology letters*, *17*(9), 1001-1006.

35. Hayman, E. P., Yokoyama, H., Chichester, C. O., & Simpson, K. L. (1974). Carotenoid biosynthesis in Rhodotorula glutinis. *Journal of bacteriology*, *120*(3), 1339-1343.