UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

RECUPERAÇÃO DE ÓLEO MICROBIANO UTILIZANDO MÉTODOS FÍSICOS ESCALONÁVEIS PARA RUPTURA CELULAR DE *Rhodotorula mucilaginosa*

THYAGO THOMÉ DO AMARAL SANTIAGO

Profa Dr.ª JANAINA FERNANDES DE MEDEIROS BURKERT
Orientadora

Drª LUISA SALA
Coorientadora

RIO GRANDE, RS
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

RECUPERAÇÃO DE ÓLEO MICROBIANO UTILIZANDO MÉTODOS FÍSICOS ESCALONÁVEIS PARA RUPTURA CELULAR DE *Rhodotorula mucilaginosa*

THYAGO THOMÉ DO AMARAL SANTIAGO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos

Profa Dr.ª JANAINA FERNANDES DE MEDEIROS BURKERT
Orientadora

Drª LUISA SALA
Coorientadora

RIO GRANDE, RS
2023

S235r

Santiago, Thyago Thomé do Amaral
Recuperação de óleo microbiano utilizando métodos físicos escalonáveis para ruptura celular de *Rhodotorula mucilaginosa* /Thyago Thomé do Amaral Santiago. – 2026.
54 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, 2026.

Orientadora: Dra.Janaína Fernandes de Medeiros Burkert
Coorientadora: Dra. Luisa Sala

1. Engenharia e Ciência de Alimentos. 2 Lipídios microbianos. 3. Rompimento celular. 4. Ultra-turrax. 5. Plasma frio. I.Burkert, Janaína Fernandes de Medeiros. II. Sala, Luisa. III. Título.

CDU 664

Catalogação na fonte: Bibliotecária Brenda Sequeira CRB10/1979

APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Thyago Thomé do Amaral Santiago, com orientação da Prof.ª Dr.ª Janaina Fernandes de Medeiros Burkert e coorientação da Prof.ª Dr.ª Luisa Sala, aprovada em 28 de agosto de 2023, pela Comissão Examinadora constituída pelos membros:

gov.br
Documento assinado digitalmente
JANAINA FERNANDES DE MEDEIROS BURKERT
Data: 28/08/2023 11:18:26-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof.ª Dr.ª Janaina Fernandes de Medeiros Burkert - FURG

gov.br
Documento assinado digitalmente
LUIZ ANTONIO DE ALMEIDA PINTO
Data: 28/08/2023 21:51:39-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Luiz Antônio de Almeida Pinto - FURG

gov.br
Documento assinado digitalmente
CAROLINE COSTA MORAES
Data: 28/08/2023 16:14:01-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof.ª Dr.ª Caroline Costa Moraes - UNIPAMPA

Dedico esse trabalho às pessoas que são as mais importantes na minha vida: minha esposa, Andressa, aos meus pais, Nilva e Elmo e minha irmã, Maria Luiza

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pois sem Ele nada seria possível

A minha esposa, Andressa, por ser minha maior incentivadora, mesmo quando eu não acreditava ser capaz ela não deixou de acreditar na minha capacidade, sempre se orgulhando de cada etapa vencida neste trabalho.

Aos meus pais, Nilva e Elmo, que sempre me apoiaram na minha formação profissional, pelas orações e pelo amor e carinho que sempre recebi, minha eterna gratidão.

A minha irmã, Maria Luiza, que é um presente de Deus na minha vida.

A CAPES, que fomentou a bolsa de estudo para eu desenvolver este trabalho.

A minha orientadora, Janaína Burkert, por me receber, por ter paciência infinita comigo, por não ter desistido de mim e pelos ensinamentos que recebi nesses anos do mestrado.

A minha coorientadora, Luisa Sala por ter paciência, por não ter desistido de mim, por suas correções e colaborações e pelos ensinamentos.

A minha colega, Tábita Rodrigues que me ensinou a utilizar os equipamentos do laboratório.

A todos que de modo direto ou indireto fizeram parte dessa etapa: Muito obrigado!

RESUMO

As leveduras do gênero *Rhodotorula* destacam-se na produção de óleo microbiano enriquecido com carotenoides. Essas leveduras oleaginosas podem apresentar elevada velocidade de crescimento, com a síntese simultânea de lipídios e carotenoides, podendo esses bioprodutos serem utilizados como aditivos na indústria de alimentos. No entanto, para extrair os biocompostos de interesse é necessária uma etapa de ruptura da parede celular. Existem diversos métodos de ruptura e/ou extração celular que podem ser utilizados para a obtenção de lipídios e carotenoides, porém muitos destes não são escalonáveis e utilizam solventes orgânicos com alto grau de toxicidade. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo aplicar métodos de ruptura celular e extração eficientes, utilizando técnicas escalonáveis, para obter óleo microbiano enriquecido com carotenoides produzidos por *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7668. Os cultivos foram conduzidos em meio de produção previamente otimizado com 70 $g.L^{-1}$ de melaço de cana de açúcar e 3,4 $g.L^{-1}$ de água de maceração de milho, adicionados de 10 % (v/v) do inóculo, incubados a 25 °C, 180 rpm por 144 h. A biomassa foi recuperada por centrifugação (1745 xg por 10 min) e lavada com água destilada obtendo-se assim a biomassa úmida. O método de Bligh Dyer modificado foi utilizado para determinar os lipídios. A fim de avaliar a eficiência de pré-tratamentos, como secagem e congelamento na recuperação de lipídios e carotenoides, utilizando a técnica de ruptura com homogeneizador a alta velocidade, foram realizadas as avaliações das biomassas úmida, seca e seca e congelada. O uso da biomassa seca e congelada foi selecionada e resultou em 7,0±0,19 % de conteúdo lipídico, 0,5±0,01 $g.L^{-1}$ de lipídios totais e concentração específica de carotenoides totais de 33,3±0,5 $\mu g.g^{-1}$ (258, 0±8,5 $\mu g.L^{-1}$). A ferramenta de planejamento experimental foi aplicada em estudos para avaliar a ruptura da parede celular da levedura através da técnica com homogeneizador a alta velocidade, sendo avaliados os parâmetros razão biomassa:solvente (0,3:100 a 1,2:100), tempo de operação (0,6 a 7,4 min) e velocidade de rotação (9280 a 22720 rpm), alcançando de 9,56 a 35,24% e 0,80 a 2,96 $g.L^{-1}$ de conteúdo lipídico e lipídio total em condições distintas, respectivamente. As variáveis independentes biomassa (0,5 a 0,7 g), tempo de operação (20 a 40 min) e potência (8 a 14 W) foram avaliadas através de um delineamento experimental para verificar o rompimento celular utilizando outra técnica, com plasma frio usando o ar sintético como gás de trabalho, alcançando, respectivamente, 20,65 a 34,87% e 1,81 a 3,06 $g.L^{-1}$ de conteúdo lipídico e lipídio total em diferentes condições. Portanto, foi possível definir condições para dois métodos de ruptura celular eficientes, utilizando técnicas passíveis de escalonamento industrial para obter óleo microbiano, semelhante a ruptura química (DMSO) com o método controle.

Palavras-chaves: Lipídios microbianos. Rompimento celular. Ultra-turrax. Plasma frio.

ABSTRACT

MICROBIAL OIL RECOVERY USING SCALABLE PHYSICAL METHODS FOR CELL DISRUPTION OF *Rhodotorula mucilaginosa*

Yeasts of the genus *Rhodotorula* are outstanding in the production of microbial oil enriched with carotenoids. These oleaginous yeasts can grow at a high rate, with the simultaneous synthesis of lipids and carotenoids, and these bioproducts can be used as additives in the food industry. However, in order to extract the biocompounds of interest, the cell wall must be broken. There are several cell rupture and/or extraction methods that can be used to obtain lipids and carotenoids, but many of these are not scalable and use organic solvents with a high degree of toxicity. In view of this, the aim of this study was to apply efficient cell rupture and extraction methods, using scalable techniques, to obtain microbial oil enriched with carotenoids produced by *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7668. Cultivations were conducted in a previously optimized production medium with 70 $g.L^{-1}$ of sugar cane molasses and 3.4 $g.L^{-1}$ of corn steeping water, added to 10% (v/v) of the inoculum, incubated at 25 °C, 180 rpm for 144 h. The biomass was recovered by centrifugation (1745 xg for 10 min) and washed with distilled water to obtain the wet biomass. The modified Bligh Dyer method was used to determine lipids. In order to assess the efficiency of pre-treatments such as drying and freezing in recovering lipids and carotenoids, using the high-speed homogenizer disruption technique, evaluations were carried out on the wet, dry and dry and frozen biomass. The use of dried and frozen biomass was selected and resulted in 7.0±0.19 % lipid content, 0.5±0.01 $g.L^{-1}$ total lipids and a specific concentration of total carotenoids of 33.3±0.5 $\mu g.g^{-1}$ (258, 0±8.5 $\mu g.L^{-1}$). The experimental planning tool was applied in studies to evaluate the rupture of the yeast cell wall using the high-speed homogenizer technique, evaluating the parameters biomass:solvent ratio (0.3:100 to 1.2:100), operating time (0.6 to 7.4 min) and rotation speed (9280 to 22720 rpm), achieving 9.56 to 35.24% and 0.80 to 2.96 $g.L^{-1}$ of lipid content and total lipid under different conditions, respectively. The independent variables biomass (0.5 to 0.7 g), operating time (20 to 40 min) and power (8 to 14 W) were evaluated using an experimental design to verify cell disruption using another technique, with cold plasma using synthetic air as the working gas, achieving 20.65 to 34.87% and 1.81 to 3.06 $g.L^{-1}$ of lipid content and total lipid under different conditions, respectively. It was therefore possible to define conditions for two efficient cell rupture methods, using techniques that can be scaled up industrially to obtain microbial oil, similar to chemical rupture (DMSO) with the control method.

Keywords: Microbial lipids. Cell disruption. Ultra-turrax. Cold plasma.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Produção de carotenoides e lipídios por diferentes cepas de *Rhodotorula* utilizando diferentes meios de produção 21
Tabela 02 - Testes preliminares utilizando homogeneização a alta velocidade 34
Tabela 03 - Níveis codificados e valores reais (entre parênteses) do delineamento composto central rotacional 2^3 35
Tabela 04 - Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP), valor t, valor p e ANOVA para conteúdo de lipídios (%) 36
Tabela 05 - Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP), valor t, valor p e ANOVA para lipídios totais ($g.L^{-1}$) 37
Tabela 06 - Ensaios para validações do modelo empírico do DCCR para homogeneização a alta velocidade 39
Tabela 07 - Níveis codificados e valores reais do delineamento composto central (DCC) 2^3 para o plasma a frio 41
Tabela 08 - Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP), valor t, valor p e ANOVA para conteúdo de lipídios (%) para o plasma a frio 42
Tabela 09 - Resultados do coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP), valor t, valor p e ANOVA para lipídios totais ($g.L^{-1}$) 42

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Estrutura química de alguns carotenoides 18
Figura 02 - Diagrama esquemático do sistema de plasma 30
Figura 03 - Curvas de contorno do conteúdo de lipídios para experimento com homogeneizador a alta velocidade: tempo de utilização do homogeneizador a alta velocidade versus razão biomassa: solvente (a), rotação utilizada no homogeneizador a alta velocidade versus tempo de utilização do homogeneizador a alta velocidade (b) e razão biomassa:solvente versus rotação utilizada no homogeneizador a alta velocidade (c) 37
Figura 04 - Curvas de contorno dos lipídios totais para experimento com homogeneizador a alta velocidade: tempo de utilização do homogeneizador a alta velocidade versus razão biomassa: solvente (a), rotação utilizada no homogeneizador a alta velocidade versus tempo de utilização do homogeneizador a alta velocidade (b) e razão biomassa: solvente versus rotação utilizada no homogeneizador a alta velocidade (c) 38
Figura 05 - Curvas de contorno do conteúdo de lipídios para experimento com plasma frio: tempo de operação do equipamento versus biomassa (a), potência utilizada no equipamento versus tempo de operação do equipamento (b) e biomassa versus potência utilizada no equipamento (c) 43
Figura 06 - Curvas de contorno dos lipídios totais para experimento com plasma frio: tempo de operação do equipamento versus biomassa (a), potência utilizada no equipamento versus tempo de operação do equipamento (b) e biomassa versus potência utilizada no equipamento (c).....44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **13**

2 OBJETIVOS **15**
2.1 Objetivo geral **15**
2.2 Objetivos específicos **15**

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **16**
3.1 Lipídios **16**
3.2 Carotenoides **17**
3.3 Produção microbiana de lipídios e carotenoides **19**
3.4 Extração de carotenoides e óleos **22**
3.5 Métodos de ruptura **23**
3.5.1 Ruptura celular por agitação em alta velocidade 24
3.5.2 Ruptura celular por plasma a frio 26

4 MATERIAL E MÉTODOS **28**
4.1 Micro-organismo, inóculo e condições de cultivo **28**
4.2 Influência de pré-tratamentos no rompimento celular **28**
4.3 Ruptura celular com ultra-turrax **29**
4.4 Ruptura celular com plasma a frio **29**
4.5 Métodos analíticos **30**
4.5.1 Determinação da concentração de biomassa 30
4.5.2 Determinação de carotenoides totais 31
4.5.3 Extração de lipídios 31
4.5.4 Análise estatística 32

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES **33**
5.1 Influência da secagem e congelamento na biomassa para recuperação de lipídios e carotenoides **33**
5.2 Delineamento composto central rotacional para avaliação da ruptura celular com agitação a alta velocidade **34**
5.2.1 Validação dos modelos utilizando ruptura celular com homogeneizador a alta velocidade 38
5.3 Delineamento composto central para avaliação da ruptura celular com plasma a frio **40**

6 CONCLUSÕES **46**

7 RESÍDUOS GERADOS E DESTINO **47**

REFERÊNCIAS **48**

1 INTRODUÇÃO

Os óleos microbianos são fontes de lipídios que podem ser produzidos por bactérias (Castro *et al.*, 2017), fungos (Vicente *et al.*, 2009) e microalgas (Song *et al.*, 2013). Outro bioproduto de interesse produzido por micro-organismos, como as leveduras, são os carotenoides, que são compostos pigmentados lipossolúveis, dos quais já foram isoladas e caracterizadas mais de 600 moléculas e apresentam uma série de benefícios para à saúde humana: atividade pró-vitamina A (Mesquita; Teixeira; Servulo, 2017), redução do risco de doenças cardiovasculares (Barbosa, 2020) e desenvolvimento de doenças degenerativas (Mesquita; Torquilho, 2016), além da capacidade antioxidante (Jomova; Valko, 2013).

Na indústria química, os óleos e os carotenoides são obtidos principalmente a partir de fontes vegetais, no entanto, a obtenção de óleos vegetais é totalmente dependente do clima e dos requisitos específicos do solo (Kot *et al.*, 2018; Mata-Gómez *et al.*, 2014). Outro processo para obtenção de carotenoides é a síntese química, que tem sido criticada pela toxicidade dos reagentes e pela formação de subprodutos indesejáveis (Cheng; Yang, 2016). Diante da problemática acima mencionada, novas pesquisas estão surgindo com o objetivo de propor diferentes alternativas para a obtenção de lipídios e carotenoides, sendo os bioprocessos utilizando células microbianas a abordagem mais citada para esse fim, uma vez que não dependem de fatores climáticos e da qualidade do solo (Costa *et al*, 2020; Garay *et al.*, 2014; Mata-Gómez *et al.*, 2014).

As leveduras oleaginosas são capazes de acumular mais de 20% de lipídios em massa seca (Meng *et al.*, 2009; Ageitos *et al.*, 2011). Nesse cenário, o gênero *Rhodotorula* apresenta grande potencial de produção de óleo microbiano enriquecido com carotenoides ao utilizar uma determinada cepa em condições de cultivo favoráveis (Rodrigues *et al.*, 2019). Sendo assim, o perfil de ácidos graxos do óleo microbiano pode apresentar uma semelhança ao de óleos vegetais, dependendo dos parâmetros de cultivo e do substrato utilizado podendo esse ser os coprodutos agroindustriais (Kanzy *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2018, Rodrigues *et al.*, 2019). A utilização desses coprodutos agroindustriais agrega valor aos mesmos, consequentemente reduz a geração dos resíduos oriundos dos processamentos e diminui o impacto ambiental (Romero *et al.*, 2001).

O gênero *Rhodotorula* vem sendo estudado pelo nosso grupo de pesquisa atuante no Laboratório de Análise Sensorial e Controle de Qualidade conjuntamente com o Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal do Rio Grande, devido ao seu potencial para produção de carotenoides e também pela possibilidade do uso de substratos de baixo custo

como melaço de cana-de-açúcar (Cipolatti *et al.*, 2019; Rodrigues *et al.*, 2019), água de maceração de milho (Cipolatti *et al.*, 2019; Rodrigues *et al.*, 2019) e água de parboilização de arroz (Otero *et al.*, 2019). Utilizando a mesma cepa da levedura e aproveitando o glicerol bruto oriundo do processo de obtenção do biodiesel, a produção de lipídios também vem sendo avaliada (Pereira *et al.*, 2019; Spier *et al.*, 2015).

A produção do óleo microbiano enriquecido de carotenoides pelas leveduras ocorre intracelularmente, onde a rigidez da parede celular limita a extratibilidade destes biocompostos. Com isso, se faz necessário o uso de técnicas de ruptura celular para a liberação dos compostos produzidos (Michelon *et al.*, 2012). No geral, a parede celular das leveduras é composta por proteínas, polissacarídeos e glicoproteínas interligadas, formando uma estrutura complexa. A camada mais externa é constituída de polissacarídeo contendo manose sobrepondo uma camada de glucana insolúvel, e a camada interna seria responsável pela resistência mecânica da parede celular (Klis *et al.*, 2002).

Diferentes técnicas são utilizadas para liberar os compostos intracelulares, incluindo métodos mecânicos, químicos e enzimáticos, podendo ser feita uma combinação deles. Embora os métodos mecânicos não apresentem especificidade quando comparado aos demais, apresentam uma eficiência elevada podendo ser aplicado de forma mais ampla, diminuindo o uso de solventes de elevado grau de toxicidade proibidos pelas indústrias de alimentos (Geciova; Bury; Jelen, 2002). Alguns pesquisadores têm utilizado os métodos mecânicos não convencionais para extração de compostos fenólicos oriundos de leveduras, utilizando a agitação a alta velocidade através do equipamento utra-turrax (Lima, 2019) e também a técnica do plasma a frio (Bao *et al.*, 2020). Nesses métodos podem influenciar variáveis como relação biomassa:solvente, velocidade de rotação, tempo de processo ou tensão do equipamento.

Nesse sentido, o presente trabalho propõe estudar técnicas alternativas de ruptura celular, como o plasma a frio e homogeneização a alta velocidade com ultra-turrax, para *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7668, visando obter o maior rendimento de óleo microbiano.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os métodos de ruptura celular, utilizando a técnica de homogeneização a alta velocidade ou com aplicação de plasma a frio, a fim de extrair óleo microbiano produzido por *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7668.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência dos pré-tratamentos de secagem e congelamento na biomassa da levedura para romper a parede celular através da agitação por alta velocidade, obtendo como resposta o conteúdo lipídico, lipídios totais e carotenoides totais;
- Aplicar a técnica de homogeneização a alta velocidade, utilizando o equipamento ultra-turrax, para romper a parede celular da levedura avaliando a razão biomassa:solvente, tempo de operação e velocidade de rotação, obtendo como resposta o conteúdo lipídico e lipídios totais.
- Utilizar a técnica de plasma a frio para romper a parede celular da levedura variando a quantidade de biomassa, tempo e tensão, obtendo como resposta o conteúdo lipídico e lipídios totais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Lipídios

Os lipídios são um componente básico de todas as células vivas, também são conhecidos como gorduras, são insolúveis em água e outros solventes polares e constituídos por uma série de substâncias, entre elas os ácidos graxos (Fahy *et al.*, 2005). Para a indústria alimentícia os lipídios possuem grande valor nutricional, oferecem aroma, sabor e palatabilidade ao produto. Na natureza podem ser encontrados em forma de gorduras, óleos, algumas vitaminas e hormônios (Voet; Voet, 2013).

Óleos e gorduras são provenientes de fontes vegetais e animais sendo o óleo de soja, algodão, girassol, milho e amendoim os principais óleos de origem vegetal comercializados pela indústria de alimentos. Estes são dependentes do plantio agrícola podendo sofrer alteração em suas safras anuais, dependendo do clima de cada estação, o que afeta o valor econômico do produto final (Carvalho, 2017). As gorduras animais vêm dos bovinos, ovinos e suínos ou são de origem marinha (Ornelas, 2010). Uma nova fonte de lipídios que vem sendo estudada e desenvolvida, são os de origem microbiana, que podem apresentar semelhança com os óleos vegetais em termos de composição de ácidos graxos e, portanto, podem ser usados como bons substitutos dos óleos vegetais (Wei *et al.*, 2021).

Os ácidos graxos poliinsaturados são amplamente utilizados, por exemplo, como suplementos alimentares e podem ser obtidos a partir de plantas e de micro-organismos. Vários estudos têm demonstrado a produção de importantes ácidos graxos, como o ácido docosahexaenoico (DHA) e o ácido araquidônico (ARA), que são encontrados no tecido cerebral e também no leite materno e são importantes para o neurodesenvolvimento ou efeito funcional, que reduz os níveis de colesterol e diminuem os riscos de ataque cardíaco e derrame cerebral. O DHA pode ser usado para ajudar a prevenir doenças cardíacas, doenças degenerativas (doença de Alzheimer) e até tratar a síndrome de déficit de atenção em crianças (Ratledge, 2004).

Do ponto de vista biológico, o papel desempenhado pelos lipídios é bastante importante, pois, além de sua participação como fonte de energia para o organismo, essas biomoléculas podem atuar como cofatores enzimáticos, transportadores de elétrons, agentes surfactantes no trato intestinal, mensageiros intracelulares, pigmentos e antioxidantes (Lottenberg, 2009). Os ácidos graxos e os carotenoides são exemplos de lipídios com valor industrial, nos últimos anos

existem alguns produtos utilizando carotenoides em suas composições sendo eles: sorvetes, complexos vitamínicos, sucos industriais e balas (Mesquita *et al.*, 2017).

A principal vantagem relacionada à produção de lipídios por catálise microbiana é o fato de que esses processos podem ser realizados utilizando diferentes resíduos agrícolas ou industriais como substratos principais. A escolha da fonte de carbono e/ou nitrogênio adequada tem sido um dos principais parâmetros estudados para fins de otimização (Mata-Gómez *et al.*, 2014).

3.2 Carotenoides

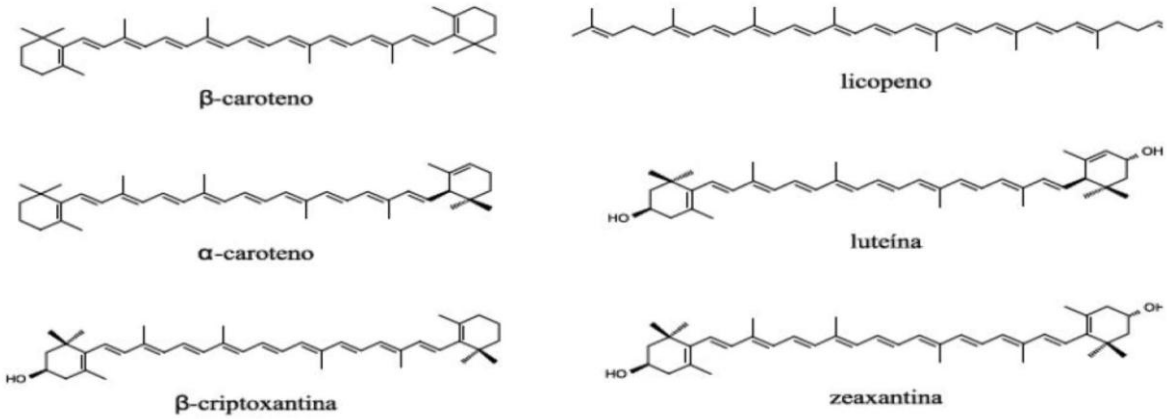
O nome "carotenoide" é derivado do latin *Daucus carota* que significa cenoura (Britton *et al*, 1995). São de grande interesse em estudos científicos, pois são utilizados como corantes naturais em produtos alimentícios e vêm ganhando a preferência do consumidor que tem buscado a utilização de um corante natural (Chandi; Gill, 2011).

Os carotenoides são um grupo de pigmentos naturais solúveis em gordura responsáveis pela cor amarela, laranja e vermelha, especialmente em frutas, vegetais e flores, sua coloração tem essa variação de cor devido ao grande número de insaturações conjugadas presentes na molécula. Esses biocompostos também podem ser encontrados em certas raízes, algas marinhas, invertebrados, peixes, cascas de crustáceos, peles, pássaros, bactérias, fungos e microalgas (Damodaran; Parkin; Fennema, 2010).

O interesse em carotenoides foi estimulado por estudos epidemiológicos que sugerem fortemente que o consumo de alimentos ricos em carotenoides reduz a incidência de várias doenças como câncer (Gomes, 2007), doenças cardiovasculares (Barbosa, 2020), catarata, doenças relacionadas à baixa função imunológica e outras doenças degenerativas (Mesquita; Torquilho, 2016).

Estas biomoléculas são constituídas por tetraterpeno de quarenta carbonos, formado por oito unidades isoprenoides, de cinco carbonos de modo que a molécula é linear e simétrica onde estão inclusos as xantofilas e o caroteno. Na Figura 01 é possível observar algumas estruturas de carotenoides e nas extremidades o anel cíclico é denominado de β-ionona (Damodaran; Parkin; Fennema, 2010). O esqueleto básico dos carotenoides pode ser modificado de várias maneiras, como hidrogenação, desidrogenação, ciclização, migração de ligação dupla, encurtamento ou extensão da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de funções de oxigênio ou combinações desses processos, resultando em uma grande diversidade de estruturas (Bobbio; Bobbio, 1992; Ribeiro; Seravalli, 2004).

Figura 01 - Estrutura química de alguns carotenoides.



Fonte: Rodriguez-Amaya; Kimura; Amaya-Farfan, 2008.

Na biossíntese de carotenoides os mesmos são derivados da via terpenoide geralmente envolvendo três etapas: (i) formação de isopentenilo pirofosfato (IPP), (ii) formação de fitoeno e (iii) ciclização e outras reações de licopeno (Marova; Certik; Breierova, 2015). Começando com os compostos simples acetil-CoA, gliceraldeído-3-fósforo e piruvato, que são formados através da via metabólica do micro-organismo, o intermediário-chave o difosfato de isopentenilo é formado por duas rotas independentes. É então convertido por bactérias, fungos, plantas e animais em milhares de produtos que ocorrem naturalmente.

Cabe salientar que nos fungos, os carotenoides são derivados por reações de sequências através da biossíntese do mevalonato. O principal produto 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) é reduzido para o ácido mevalônico. Essa redução de dois passos de HMG-CoA para mevalonato é altamente controlado e também é um fator de controle principal da síntese de esteróis (Marova; Certik; Breierova, 2015).

Os carotenoides têm propriedades de absorção de luz, que vêm de cromóforos com ligações duplas conjugadas responsáveis por suas cores de tons alaranjados a vermelho (Rodriguez-Amaya; Kimura; Amaya-Farfan, 2008). Derivados de carotenoides sintéticos que são semelhantes aos derivados de carotenoides naturais são produzidos em massa para uso industrial. Geralmente, o propósito de usar carotenoides como corantes na indústria de alimentos é devido à perda de cor durante o processamento earmazenamento (Valduga *et al.*, 2009), sendo os corantes naturais mais utilizados o β-caroteno e a astaxantina conferindo uma aparência mais natural ao produto (Kirti *et al.*, 2014). Algumas pesquisas têm sido realizadas sobre a aplicação de carotenoides em alimentos, como massa de tomate (Pelosi *et al.*, 2014), iogurte (Krigger, 2019; Rutz *et al.*, 2016), pães e maioneses (Zaragoza, 2015), suco de fruta, bebida, sopa, tempero para salada, xarope (Kirti *et al.*, 2014), margarina, manteiga e sorvete (Kaur *et al.*, 2016).

Dentre os 600 tipos de carotenoides conhecidos cerca de 50 apresentam atividade provitamina A, sendo o β-caroteno a molécula que apresenta maior atividade pró-vitamínica. A provitamina A é fundamental para promover o crescimento dos ossos do corpo humano, desempenhando um papel essencial durante o desenvolvimento embrionário do feto e importante para manter as atividades vitais do nosso organismo (Hof *et al.*, 2000).

A atividade antioxidante também é considerada uma propriedade funcional dos carotenoides, a eliminação de radicais livres é feita por compostos que tem duplas ligações conjugadas, possuindo assim o efeito antioxidante. Os carotenoides podem ser facilmente oxidados devido a inativação do oxigênio singlete (Damodaran; Parkin; Fennema, 2010; Stringheta *et al.*, 2006). O uso na dieta, seja para ingestão de medicamentos ou alimentos ricos em carotenoides, pode proteger o corpo humano dos danos oxidativos às células, ao isolar e eliminar os radicais livres, reduzindo o risco de certas doenças crônico-degenerativas (Stahl; Sie, 2003; Stringheta *et al.*, 2006).

Entre as fontes microbianas de carotenoides, além das microalgas, as leveduras pigmentadas são de interesse especial para pesquisadores (Kitcha; Cheirsilp, 2011). Essas leveduras têm vantagem sobre algas devido à alta taxa de crescimento com a utilização de meios de cultivo de baixo custo (Costa *et al.*, 2020).

3.3 Produção microbiana de lipídios e carotenoides

A indústria vem apresentando interesse nos óleos microbianos, também conhecidos como "*Single cell oils*" (SCO), devido às suas características bioquímicas e físico-químicas específicas (Ageitos *et al.*, 2011). O óleo microbiano é um triglicerídeo produzido por micro-organismo, sendo semelhante ao óleo vegetal no que diz respeito a sua composição de ácidos graxos, que também pode ser transesterificados em glicerol e ésteres metílicos de ácidos graxos (Wynn; Ratledge, 2005).

Um micro-organismo é considerado oleaginoso quando pode acumular mais de 20% (m/m) de sua biomassa na forma de lipídios (Khot *et al.*, 2012). Atualmente, pesquisas intensivas estão sendo conduzidas em todo o mundo sobre a possibilidade de produzir lipídios derivados de micro-organismos, em escala industrial, como fontes suplementares de óleos convencionais (Kot *et al.*, 2020; Tang *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2020). Isso decorre principalmente do fato de que esse processo é independente das condições climáticas, requer menos intervenção manual, tem um ciclo de produção curto (Bharathiraja *et al.*, 2017).

As leveduras oleaginosas são excelentes produtoras de lipídios microbianos devido ao seu alto teor de biomassa celular e a capacidade de produzir um óleo com o perfil de ácidos graxos semelhante ao de óleos vegetais (Bharathiraja *et al.*, 2017). A composição de ácidos graxos pode ser modificada alterando os meios de cultivo usando uma mistura de água de maceração de milho com melaço de cana de açúcar (Rodrigues *et al.*, 2019), água de resíduo de batata em conjunto com o glicerol (Kot *et al.*, 2020), somente melaço de cana de açúcar (Costa *et al.*, 2020) e glicerol bruto (Pereira *et al.*, 2019), com essas mudanças do meio foi possível observar nos trabalhos uma diferença de biomassa de cultivo.

Comparando os resultados obtidos no trabalho de Kot e al. (2020) que determinaram o perfil de ácidos graxos do óleo microbiano sintetizado pela levedura *Rhodotorula gracilis* em meio contendo água de batata e glicerol verificou-se um perfil semelhante ao encontrado por Santiago (2019) que determinou a porcentagem de ácidos graxos no azeite de oliva da Região da Campanha do Rio Grande do Sul, sendo o conteúdo de 18,5% de ácido palmítico, 55,4% de ácido oleico e 11,7% de ácido linoleico. Além disso, a participação geral de ácidos graxos saturados (SFA) (18,9%), ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) (65,3%) e ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) (12,0%) no azeite foi semelhante à dos lipídios sintetizados por R. gracilis: SFA (aproximadamente 19%), MUFA (aproximadamente 67%) e PUFA (aproximadamente 14%).

A vantagem de utilizar a cepa *Rhodotorula mucilaginosa* é que além de obter um óleo microbiano rico em ácidos graxos insaturados com alto teor de ácido oleico, tem-se o enriquecimento do mesmo com os carotenoides (Rodrigues, 2020). O uso de leveduras na produção de óleo microbiano enriquecido com carotenoides pode trazer muitos benefícios. Os mais importantes são a capacidade da levedura de crescer rapidamente e a possibilidade de usar matérias-primas baixo custo e residuais como fontes de nitrogênio e carbono. A produção lucrativa de carotenoides a partir de micro-organismos requer a seleção de cepas adequadas, caracterizadas pela biossíntese intensiva desses compostos (Mata-Gómez *et al.*, 2014; Kot *et al.*, 2018). A Tabela 01 apresenta trabalhos encontrados na literatura utilizando diferentes cepas de *Rhodotorula* para a produção de carotenoides e lipídios.

Tabela 01 - Produção de carotenoides e lipídios por diferentes cepas de *Rhodotorula* utilizando diferentes meios de produção.

Micro-organismo	Meio de produção	Ácido graxo majoritário	Lipídios totais ($g\ L^{-1}$)	Carotenoides ($\mu g\ L^{-1}$)
***R. mucilaginosa*[1]**	Melaço de cana de açúcar e água de maceração de milho	Oleico	6,43	3726
***R. mucilaginosa*[2]**	Glicerol bruto e sulfato de magnésio	Linoleico	10,72	2843
***R. gracilis*[3]**	Água residual de batata e glicerol	Oleico	4,26	6240

Fonte: Rodrigues *et al.*, (2020)[1], Pereira *et al.*, (2019)[2], Kot *et al.*, (2020)[3].

Usando meio de cultura previamente otimizado com 70 g L^{-1} melaço de cana de açúcar e 3,4 g L^{-1} água de maceração de milho (Rodrigues *et al.*, 2019), Rodrigues (2020) estudou a produção de óleo microbiano enriquecido com carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688. O óleo microbiano produzido em 144 h de cultivo apresentou concentrações de lipídios totais de 6,43 g L^{-1}, carotenoides totais de 3726 µg L^{-1}, biomassa de 14,78 g L^{-1} e conteúdo lipídico de 43,23 % (m/m). Nessas condições, o perfil de ácidos graxos da biomassa de *R. mucilaginosa* foi analisado e identificou-se 15 ácidos graxos nos quais o ácido oleico (69,89 % m/m) e o palmítico (23,18 % m/m) apresentaram maior relevância.

Pereira *et al.* (2019) estudaram uma estratégia de cultivo em batelada alimentada de *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688 para acumular lipídios e carotenoides de alto valor agregado, com potencial de contribuir para a viabilidade econômica de óleos microbianos em comparação com óleos vegetais. Em seu estudo foram avaliadas as quantidades de carotenoides totais, lipídios totais e o perfil de ácidos graxos produzidos pela levedura. O cultivo em batelada alimentada com alimentação de glicerol bruto às 24 h, 96 h e 144 h, com a adição de sulfato de magnésio ao meio de cultura inicial, resultou em um teor de carotenoides totais (2843 µg L^{-1}) e lipídios totais (10,72 g L^{-1}) após 96 h de cultivo. Dentre os 15 ácidos graxos que foram identificados o principal ácido graxo encontrado nos óleos produzidos pela levedura *R. mucilaginosa* foi o ácido linoleico.

Kot *et al.* (2020) avaliaram a possibilidade de usar água residual de batata e glicerol como componentes do meio para produção de carotenoides por levedura *Rhodotorula gracilis* ATCC 10788 em biorreator de laboratório BioFlo 3000, com capacidade total de 5 L. Os

cultivos foram realizados em 20 e 28 °C. A biossíntese do carotenoide por células de levedura cultivadas em biorreator durou 120 h, a produção de carotenoides foi 6240 μg L^{-1} em 96 h de cultivo. Após 120 h de cultivo, os níveis de β-caroteno (47%) e toruleno (51%) foram semelhantes. O valor da concentração mais elevado para os lipídios totais 4,26 g L^{-1} foi encontrado em 96 h após a cultura. Foram identificados 6 principais ácidos graxos, no qual o ácido oleico (54,5 % m/m) apresentou maior relevância.

3.4 Extração de carotenoides e óleos

Mediante a presença de dupla ligação em sua estrutura, os carotenoides são altamente sensíveis à alta temperatura, luz e oxigênio. Quando produtos que apresentam um teor significativo de carotenoides são submetidos a processamentos que os expõem a tais fatores, estes compostos usualmente passam pelo processo de isomerização cis/trans, ou podem se degradar, dependendo da intensidade do tratamento. Sendo assim, os carotenoides não podem ser expostos a fatores que causam degradação e perda de função (Strati; Oreopoulou, 2011).

Estas mesmas preocupações devem ser levadas em consideração quando os carotenoides são extraídos de fontes microbianas para aplicações posteriores. Os processos de extração exaustiva de carotenoides geralmente envolvem três etapas. A primeira etapa consiste na ruptura da parede celular a fim de liberar compostos intracelulares como os lipídios e os carotenoides, a segunda etapa consiste na extração das biomoléculas de interesse e a terceira etapa está relacionada a recuperação do bioproduto extraído (Saini; Keum, 2018; Rodriguez-Amayaz, 2001).

No processo de extração de óleos e carotenoides, um fator importante é a escolha do solvente. Os solventes orgânicos mais utilizados para a extração de óleos e carotenoides são acetona (log P = -0,26), clorofórmio (log P = +2,00), hexano (log P = +3,50), metanol (log P = -0,69) e acetato de etila (log P = 0,23) (Yara-Varón *et al.*, 2016).

A escolha do solvente tem relação direta com a polaridade dos carotenoides e óleos alvos da extração. Por exemplo, o β-caroteno, licopeno e os ácidos graxos são altamente lipofílicos. Portanto no geral, solventes não polares, como hexano, éter de petróleo ou tetrahidrofurano (THF), são uma excelente escolha para extração de óleos e carotenoides não polares ou xantofilas esterificadas, enquanto solventes polares, como acetona, etanol e acetato de etila são mais apropriados para extração de carotenoides polares (Amorim-Carrilho *et al.*, 2014).

Silva *et al.* (2018), estudaram em seu trabalho a produção de lipídios totais utilizando *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688, em cultivo submerso em frascos agitados a 200 rpm,

30°C por 120 h. Para o romper a parede celular foi utilizado uma solução de HCl 2 mol.L^{-1} sendo o teor de lipídios determinado através do método de Bligh e Dyer (1959), obtendo uma produção de lipídios totais variando entre 8,47 e 13,33 g.100g^{-1}.

3.5 Métodos de ruptura

As células vegetais e os micro-organismos são compostos por paredes celulares complexas e rígidas, que constituem um obstáculo à entrada de solventes na célula. Além disso, a associação dos carotenoides com outras macromoléculas, como proteínas e ácidos graxos, impede a transferência de massa dos carotenoides durante a extração (Singh *et al.*, 2015). Assim, a primeira etapa antes da extração, é o rompimento da parede celular podendo ocorrer por meios físicos (secagem, choque osmótico, congelamento-descongelamento, moagem criogênica), químicos (ácido, base, surfactantes) e enzimáticos para facilitar a extração eficiente de bioprodutos. Cabe salientar que a seleção de um método apropriado de rompimento celular está diretamente relacionada com as características da matriz celular e da parede celular (Saini; Keum, 2018).

Além das técnicas convencionais de ruptura da parede celular empregando agentes químicos (SINGH *et al.*, 2015) ou utilizando meios físicos como maceração (Michelon *et al.*, 2012), diversas tecnologias emergentes têm surgido nas últimas décadas, dentre elas é possível citar a ruptura por líquido pressurizado, campo elétrico pulsado, fluido supercrítico, ultrassom, ruptura enzimática (Saini; Keum, 2018), homogeneização a alta velocidade (Lima, 2019) e plasma a frio (Bao *et al.*, 2020).

Lopes *et al.* (2017) estudaram e compararam a eficácia de diferentes técnicas químicas e mecânicas utilizadas para romper a parede celular de leveduras de *Sporidiobolus pararoseus* e *Rhodotorula mucilaginosa* isoladas de amostras ambientais de Ecossistemas Gaúchos. Dentre as técnicas em estudo, o banho ultrassônico e a abrasão com pérolas de vidro apresentaram os resultados mais promissores para *S. pararoseus* (84,8 e 76,9 μg.g^{-1}, respectivamente). O banho ultrassônico proporcionou a maior concentração de carotenoides para R. mucilaginosa (193,5 μg.g^{-1}). A liofilização aumentou as concentrações específicas de carotenoides de *S. pararoseus* e *R. mucilaginosa* em 20 e 13,7%, respectivamente.

Kim *et al.* (2016) fizeram uma análise sistemática de vários métodos de ruptura e extração da parede celular das microalgas *Chlorella* e *Haematococcus* para obtenção de lipídios e astaxantina. Os autores concluíram que, embora várias técnicas de ruptura da parede celular utilizando meios físicos e químicos estejam disponíveis, muitos problemas críticos, como

consumo de energia, toxicidade, estabilidades de metabólitos e aumento de escala, ainda precisam ser investigados. Um processo de extração perfeitamente otimizado pode ajudar na produção econômica de carotenoides naturais.

Michelon *et al.* (2012) empregaram para ruptura da parede celular da levedura *Phaffia rhodozyma*, diferentes técnicas mecânicas, químicas e enzimáticas de ruptura celular para extração de carotenoides. Dentre as técnicas estudadas, a maior concentração de carotenoides (190,35 $\mu g.g^{-1}$) resultou das técnicas combinadas de maceração de biomassa congelada com terra diatomácea e lise enzimática em pH do meio reacional de 4,5 a 55 °C.

Rodrigues (2023) demonstrou que a etapa de ruptura da parede celular de leveduras oleaginosas é muito importante para recuperação de lipídios e carotenoides. Em seu estudo foi avaliado o efeito de diferentes métodos de rompimento da parede celular da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* (hidrólise ácida, micro-ondas e ultrassom) na eficiência da extração de lipídios. No qual o método mais eficiente foi a hidrólise ácida, comparando aos demais métodos estudados, onde houve baixa recuperação de lipídios de 9,9, 16,7 e 16,1% para micro-ondas, ultrassom e ponteira ultrassônica, respectivamente. Com os resultados obtidos revelou-se que o método de tratamento com água quente catalisada por ácido (condição de 2,4 mol HCl, 80ºC e 60 min) aumentou significativamente em cerca de 20% em comparação com o controle (condição de 2M HCl, a 80°C por 60 min.) a extração de lipídios. Com o presente estudo, também foi possível avaliar o conteúdo de carotenoides presentes no óleo microbiano, no qual foram obtidos, 302,9 $\mu g.g^{-1}$ de óleo. Cabe salientar que um aspecto importante do óleo extraído da levedura foi seu conteúdo de carotenoides, um óleo enriquecido com carotenoides pode ser usado para aumentar o valor agregado ao óleo, por exemplo, em produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos, combinando o óleo microbiano com as propriedades benéficas a saúde e agente corante dos carotenoides.

3.5.1 Ruptura celular por agitação em alta velocidade

O ultra-turrax consiste em um equipamento homogeneizador que opera com altas velocidades de rotações. Este aparelho é versátil podendo ser utilizado em diferentes aplicações como a homogeneização de sistemas imiscíveis líquido/líquido, formação de emulsões, dispersão de cristais em fase aquosa, dentre outras (Scholz; Keck, 2015).

A ruptura por dispersão utilizando o equipamento ultra-turrax (UTE) é uma técnica que pode ser aplicada em matrizes alimentícias com o objetivo de se recuperar compostos bioativos de interesse, sendo o mecanismo de funcionamento do ultra-turrax bastante eficiente para a

liberação de compostos alvos de uma gama de materiais. O aparelho atua fornecendo alta força de cisalhamento devido à rotação em alta velocidade, o que leva ao rompimento das paredes celulares do material, liberando os compostos alvos e permitindo sua transferência para o solvente de extração (Xu *et al.*, 2016).

Na literatura, ainda não existem estudos sobre o rompimento celular da levedura *R. mucilaginosa* para a extração de óleo microbiano enriquecido de carotenoide utilizando a homogeneização a alta velocidade. Entretanto, alguns estudos (Lima, 2019; Timotheo, 2018; Taipong *et al.*, 2006) abordaram a extração de compostos bioativos usando dispersão por ultra-turrax. Thaipong *et al.* (2006) extraíram os compostos fenólicos de amostras de polpa e casca de goiaba por homogeneização a alta velocidade utilizando metanol como solvente. Com este método, foi possível obter teor de fenólicos totais de até 344,9 mg AGE 100 g-^{1} no extrato, uma alta recuperação de fenólicos levando-se em consideração que a fruta não passou por um processo prévio de desidratação.

Lima (2019) extraiu compostos fenólicos a partir da polpa e do resíduo de goiaba por meio de diferentes técnicas verdes de extração: extração assistida por ultrassom (EAU), extração por líquido pressurizado (PLE) e extração por homogeneização a alta velocidade (UTE). Os fenólicos foram extraídos com uma mistura etanol e água (30:70, v/v) como solvente, na proporção de 1 g de amostra para 15 mL de solvente por UTE (1 h, 25 ºC). A UTE foi o método de extração que apresentou o maior teor de fenólicos totais para a polpa de goiaba (2348,2 mg AGE 100 g^{-1}).

Timotheo (2018) avaliou diferentes metodologias para a lise celular para a extração de lipídeos das leveduras *Yarrowia lipolytica* e *Meyerozyma guilliermondii*. As duas cepas foram cultivadas em tanque biorreator de 5 L em meio à base de glicose e sais inorgânicos, em 120 h, agitação de 400 rpm e temperatura de 26 ºC. Após o cultivo de 120 h foi realizado a extração de lipídios da biomassa, utilizando o ultra-turrax para romper a parede celular, liberando os biocompostos de interesse, o equipamento foi programado, com ciclos de homogeneização durante 6 min a 4000 rpm. conseguindo extrair 11% de lipídios totais para a levedura *Yarrowia lipolytica* e 12% de lipídios totais para a levedura *Meyerozyma guilliermondi*.

Com base no exposto, o presente trabalho visa um estudo diferencial que aborda a utilização de técnicas não convencionais para realizar a ruptura celular e extrair o óleo microbiano enriquecido de carotenoides, avaliando o potencial para aplicação futura em escala industrial.

3.5.2 Ruptura celular por plasma a frio

O plasma frio é um tipo de plasma normalmente gerado em um ambiente com pressão atmosférica com baixo custo de energia durante a conversão de gases a um estado altamente reativo. O plasma pode gerar vários tipos de espécies de gases reativos, radiação ultravioleta, íons energéticos e partículas carregadas que podem induzir reações físico-químicas com materiais tratados (Hoffmann *et al.*, 2013). Essas reações são influenciadas pelo tipo de plasma, tensão aplicada, gás de trabalho, tempo de tratamento e umidade relativa (Lotfy *et al.*, 2020).

Para aplicações em alimentos, plasma frio tem sido usado para esterilização comercial, no qual as espécies reativas de plasma atacam a membrana celular de bactérias, induzindo sua ruptura e resultando na lise celular (Han *et al.*, 2016). O plasma frio também tem a capacidade de manipular características de superfície de produtos alimentícios. As superfícies de alface e uva branca fresca tornaram-se mais hidrofílicas após os tratamentos de plasma devido à degradação da camada de cutícula, que consiste em ceras cuticulares hidrofóbicas (Grzegorzewski *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2019). Os danos celulares e modificações superficiais causados pelo plasma indicam seu potencial para diminuir a resistência a difusão de moléculas internas, com isso aumentando a capacidade de extração de compostos intracelulares (Huang *et al.*, 2019), que podem facilitar a recuperação de óleos microbianos enriquecidos de carotenoides.

O plasma frio foi utilizado na extração de nutrientes por Kodama *et al.*, (2014) em seus estudos sobre óleo essencial, no qual uma descarga de plasma de barreira dielétrica foi usada para o tratamento da superfície da casca do limão, seguido por destilação a vapor, para melhorar a extração do óleo essencial. Os efeitos do tratamento da superfície do plasma da casca do limão no rendimento e composição do óleo essencial foram investigados sendo o rendimento do óleo essencial melhorado pelo tratamento com plasma. Na literatura consultada até o presente momento não se tem relatos sobre a aplicação do plasma a frio para romper células de leveduras. Portanto, neste trabalho está sendo aplicada esta técnica de forma inovadora até o presente.

Bao *et al.* (2020) utilizaram o plasma frio atmosférico de alta tensão com diferentes gases de trabalho (ar, Ar, He e N2), para modificar a superfície do bagaço de tomate, visando facilitar a migração de compostos fenólicos durante o processo extração. As amostras tratadas com plasma de hélio e nitrogênio apresentaram rendimentos de extração fenólica significativamente maiores do que o controle, em 8,9% (1,025 ± 0,036 mg GAE g^{-1}) e 9,8% (1,033 ± 0,020 mg GAE g^{-1}), dessa forma, os compostos fenólicos foram extraídos utilizando a técnica de ruptura com plasma frio.

O efeito do pré-tratamento com plasma frio de descarga luminescente (CPT) foi investigado por Faria *et al.* (2020) na extração de compostos fenólicos do aspargo marinho *Salicornia neei*. Os compostos extraídos foram aplicados em salame italiano. Verificou-se que o pré-tratamento com CPT (potência de descarga de 14 W por 5 min) antes da extração dos compostos fenólicos aumentou a atividade antioxidante em 22%.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismo, inóculo e condições de cultivo

A levedura *Rhodoturula mucilaginosa*, depositada na Coleção de Cultura André Toselo (CCT 7668) isolada por Otero *et al.*, 2019, foi utilizada para a obtenção do óleo microbiano enriquecido de carotenoides. O micro-organismo foi mantido em ágar inclinado em meio extrato de malte e levedura modificado (YM) composto por 3 $g.L^{-1}$ de extrato de levedura, 3 $g.L^{-1}$ de extrato de malte, 5 $g.L^{-1}$ de peptona, 10 $g.L^{-1}$ de glicose e adicionados de 0,2 $g.L^{-1}$ de KNO3 a 4 ºC (Parajó; Vázquez, 1998). Para a reativação, a partir da cultura estoque foi realizado repiques para tubos de ensaio com o mesmo meio e incubados por 48 h a 25 ºC.

O pré-inóculo foi realizado a partir da biomassa nos tubos da etapa de reativação que foi ressuspendida em 1 mL de água peptonada 0,1%, transferida para tubos de ensaios com 9 mL no meio YM e incubados por 48 h a 25 ºC (Silva *et al.*, 2012).

Os inóculos foram preparados em frascos agitados de 250 mL contendo 90 mL do meio de cultivo YM modificado (Silva *et al.*, 2012), previamente esterilizado a 121 ºC por 15 min, e adicionado de 10 mL do pré-inóculo, sendo incubados a 25 °C, 150 rpm por 48 h ou tempo necessário para atingir no mínimo 1×10^8 células mL^{-1}, contadas através de câmara de Neubauer (Michelon *et al.*, 2012).

Os cultivos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 225 mL do meio de produção previamente otimizado contendo 70 g L^{-1} de melaço de cana de açúcar e 3,4 g L^{-1} de água de maceração de milho, adicionados de 10 % (v/v) do inóculo, incubados a 25 °C, 180 rpm por 144 h (Rodrigues *et al.*, 2019). A biomassa foi recuperada do caldo fermentado por centrifugação (1745 xg por 10 min) e lavada com água destilada obtendo-se assim a biomassa úmida.

A água de maceração de milho foi obtida da empresa Corn Products (Balsa Nova - PR) e o melaço de cana de açúcar foi adquirido da empresa Melaços Brasileiros (Saltinho- SP).

4.2 Influência de pré-tratamentos no rompimento celular

Para avaliar a influência dos pré-tratamentos de secagem e congelamento na biomassa da levedura no rompimento da parede celular através homogeneização por alta velocidade com ultra-turrax, foram considerados:

- Biomassa úmida (recuperada do caldo fermentado por centrifugação a 1745 xg por 10 min e lavada com água destilada);
- Biomassa seca (após obtenção da biomassa úmida foi submetida a secagem por 35°C e 48 h em estufa de circulação de ar forçado (Fonseca *et al.*, 2011), sendo macerada e peneirada (mesh 115) conforme Cipolatti (2012);
- Biomassa seca e congelada (após a obtenção da biomassa seca, esta foi submetida ao congelamento por -18°C e 48 h (Moraes, Burkert; Kalil, 2010).
- Cada ensaio preliminar foi realizado em triplicata com 0,5 g de biomassa, 100 mL de hexano em um béquer de 250 mL, e submetido ao ultra-turrax a 3000 rpm por 4 min.
- Nos testes preliminares o processo de rompimento celular denominado controle foi realizado com ruptura química utilizando dimetilsulfóxido (DMSO), segundo a metodologia de Michelon *et al.* (2012). Em tubos contendo 0,05 g de biomassa foram adicionados 2 mL de DMSO a 55ºC e homogeneizadas por 1 min em vórtex, em intervalos de tempo de 15 min, até completar 1 h de contato. Posteriormente, aos processos de ruptura foram realizadas a extração dos lipídios e carotenoides.

4.3 Ruptura celular com ultra-turrax

As variáveis independentes razão biomassa:solvente (0,3:100 a 1,2:100), tempo de operação (0,6 a 7,4 min) e velocidade de rotação (9280 a 22720 rpm) foram avaliadas através de um delineamento composto central rotacional (DCCR) 23, totalizando 18 ensaios, sendo 4 pontos centrais, e as respostas avaliadas foram os valores de conteúdo lipídico e os lipídios totais que estão apresentados na Tabela 02. Para cada ensaio, em béqueres (250 mL) foram colocadas amostras de biomassa seca e congelada da levedura (Tabela 02), diluídas em 100 mL de hexano e levadas ao ultra-turrax.

Para a validação dos modelos selecionou-se condições experimentais de razão biomassa:solvente, tempo de operação e velocidade de rotação que se encontra dentro da faixa ótima para as respostas conteúdo lipídico e lipídios totais, sendo realizadas em triplicatas.

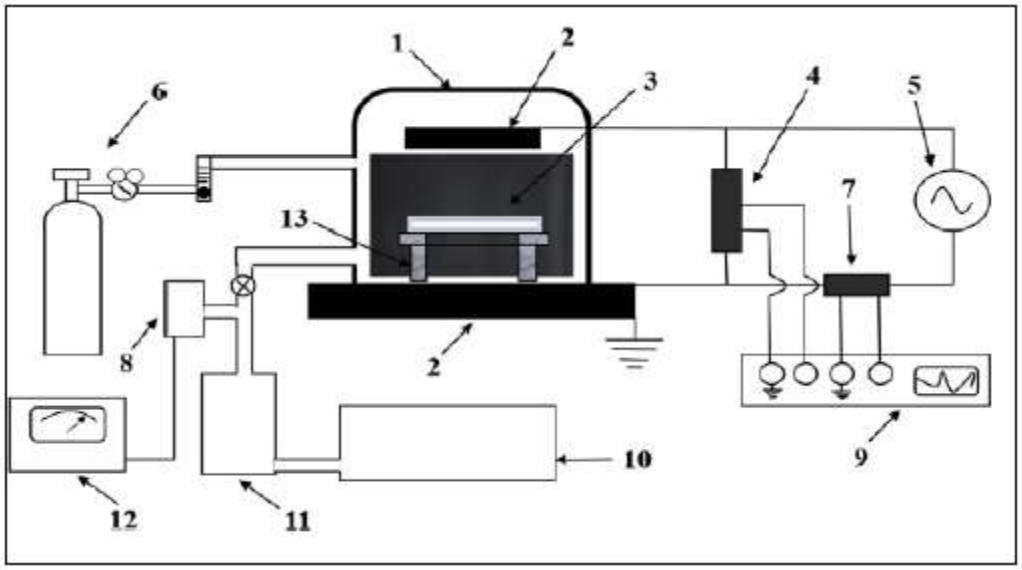
4.4 Ruptura celular com plasma a frio

A ruptura celular foi realizada por técnica mecânica utilizando o plasma frio de descarga luminescente, conforme a metodologia descrita por Faria *et al.* (2020) apresentado na Figura

02. Para cada ensaio a biomassa seca e congelada foi colocada dentro da câmara de plasma em um suporte de amostra e o tratamento foi realizado entre dois eletrodos com uma distância de 13 cm entre eletrodos. Inicialmente, a câmara de plasma foi ajustada para 2 x 10-2 mbar, em seguida, o ar atmosférico seco foi preenchido para o procedimento do processo. Após a estabilização da pressão, o plasma da descarga luminescente foi gerado pela aplicação de energia. Um dos eletrodos foi conectado a terra e a entrada de alta tensão de 46 V foi aplicada entre dois eletrodos.

As variáveis independentes biomassa (0,5 a 0,7 g), tempo de operação (20 a 40 min) e potência (8 a 14 W) foram avaliadas através de um delineamento composto central (DCC) 2^3, totalizando 12 ensaios, sendo as respostas avaliadas os valores de conteúdo lipídico e os lipídios totais que estão apresentados na Tabela 07.

Figura 02 - Diagrama esquemático do sistema de plasma.



(1) Plasma câmara de vácuo, (2) eletrodos, (3) amostra de biomassa e plasma, (4) sonda HV, (5) Fonte de alimentação (0-15 kV), (6) Ar seco do cilindro, (7) resistor de derivação (medição de corrente), (8) Medidor de vácuo, (9) Osciloscópio, (10) Vácuo mecânico da bomba, (11) Bomba de vácuo molecular turbo, (12) Vácuo medidor, (13) Suporte de amostra de vidro.
Fonte: Faria *et al.* (2020).

4.5 Métodos analíticos

4.5.1 Determinação da concentração de biomassa

A concentração de biomassa ($g.L^{-1}$) foi determinada através de gravimetria após as 144 h de cultivo. A partir de amostras em quadruplicata, 10 mL do caldo fermentado foi centrifugado (1745 xg) por 10 min, a biomassa foi lavada com água destilada, agitada em

vórtex, centrifugada novamente nas mesmas condições e seca a 105 °C até peso constante para determinação da mesma por gravimetria (Apha, 2005).

4.5.2 Determinação de carotenoides totais

Nos testes preliminares foi determinado a concentração de carotenoides totais de acordo com Fonseca *et al.* (2011), modificado por Cipolatti *et al.* (2015). Primeiramente, 0,05 g de biomassa seca (35°C por 48 h) foi macerada, peneirada (Tyler 115) e congelada (-18°C por 48 h). Após, misturada com 2 mL de dimetilsulfóxido (55°C). A mistura foi homogeneizada em vórtex por 1 min a cada 15 min por 1 h. Posteriormente, 6 mL de acetona foram adicionados e a amostra foi centrifugada (1745 x g por 10 min) para remover o solvente. O procedimento foi repetido até o branqueamento das células. Em seguida, o extrato solvente foi misturado com 10 mL de NaCl 20% (p/v) e 10 mL de éter de petróleo. Após agitação e separação de fases, o excesso de água foi removido com sulfato de sódio (Michelon *et al.*, 2012). A absorbância foi então medida por um espectrofotômetro a 448 nm (Machado; Burkert, 2015) e a concentração específica de carotenoides foi calculada pela Equação 1, conforme relatado por Davies (1976). O carotenoide foi expresso como seu componente principal (β-caroteno em éter de petróleo com absorbância específica de = 2592). Para calcular a concentração volumétrica de carotenoides ($\mu g.L^{-1}$), foram utilizados valores de concentração específica de carotenoides e concentração de biomassa (Cipolatti *et al.*, 2019).

$$CT = \frac{A*V*10^6}{A_{1\,cm}^{1\%}*100*m_{amostra}} \quad (1)$$

Onde: CT = concentração específica de carotenoides totais ($\mu g\ g^{-1}$); A = absorbância; V = volume (mL); mamostra= massa celular seca (g); $A1cm1\%$= absortividade específica.

4.5.3 Extração de lipídios

Após o processo de ruptura da biomassa em estudo, os lipídios foram extraídos e quantificados, conforme proposto por Bligh e Dyer (1969), modificado por Manirakiza *et al.* (2001). Cerca de 0,3 a 0,5 g de biomassa foram adicionados de 5 mL de HCl 2 M, em banho-maria a 80°C por 60 min, sendo resfriado e centrifugado por 10000 rpm por 15 min. A extração dos lipídios polares e apolares foi realizada com a adição de 4 mL de metanol, 2 mL de

clorofórmio, e mais 2 mL de clorofórmio, intercalando agitações de 2 min entre as adições. Também foram adicionados 3,6 mL de água destilada, e após agitação o tubo foi então centrifugado por 5 min a 10414 × g. Desta centrifugação, resultou um sistema bifásico constituído de metanol e água (fase superior), biomassa (interface) e clorofórmio (fase inferior). Os lipídios ficaram solubilizados no clorofórmio, na fase inferior, sendo separado do sistema. Uma segunda extração foi necessária, com adição de 4 mL de uma solução de 10 % de metanol em clorofórmio ao resíduo contido no tubo. Após agitação, este foi centrifugado por 5 min a 10414 × g, retirando-se o extrato e juntando-o ao primeiro. Este extrato foi evaporado em um rotaevaporador e o conteúdo lipídico (%) foi quantificado por gravimetria. A produção de lipídios totais (g L^{-1}) foi calculada multiplicando a concentração de biomassa em 144 h, tempo de cultivo do processo, pelo teor de lipídios (Spier *et al.*, 2015).

4.5.4 Análise estatística

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada, quando necessário, para avaliar as diferenças entre as médias sendo estas comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de significância. As superfícies de contorno foram construídas de acordo com Rodrigues; Iemma, (2014).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Influência da secagem e congelamento na biomassa para recuperação de lipídios e carotenoides

A Tabela 02 apresenta os valores de conteúdo lipídico, lipídios totais, concentrações específica e volumétrica de carotenoides totais para diferentes condições na biomassa após o cultivo. Três ensaios utilizaram o ultra-turrax com diferentes condições para a biomassa (úmida, seca e seca e congelada) e o quarto ensaio denominado controle utilizou a ruptura química com DMSO sendo a biomassa seca e congelada. A maior recuperação de lipídios (32,5% e 2,5 $g.L^{-1}$) e carotenoides (73,7 $\mu g.g^{-1}$ e 572,3 $\mu g.L^{-1}$) foram observadas no ensaio controle sendo estatisticamente ($p<0,05$) diferente dos demais. A ruptura celular com ultra-turrax utilizando a biomassa seca e congelada para recuperação de lipídios e carotenoides foi significativamente superior que a biomassa seca e a biomassa úmida, respectivamente. Um incremento de aproximadamente mais de 5 vezes pode ser observado ao comparar o conteúdo lipídico com a aplicação do pré-tratamento da secagem na biomassa, e 45% a mais obtido com o efeito do congelamento na biomassa. Ao associar os dois pré-tratamentos secagem e congelamento o aumento na recuperação do conteúdo lipídico é cerca de 7 vezes superior comparado a biomassa úmida. Apesar da recuperação de lipídios (7% e 0,5 g L^{-1}) e carotenoides (33,3 µg g-1 e 258 µg L^{-1}) com o ultra-turrax utilizando a biomassa seca e congelada, ter sido significativamente ($p<0,05$) inferior quando comparado ao controle essa condição foi selecionada em função da maior toxicidade do agente químico DMSO de ruptura celular, ser utilizado no método controle. Portanto, visando futuras aplicações do extrato lipídico foi selecionado a recuperação de lipídios e carotenoides com ultra-turrax e a biomassa seca e congelada.

Meullemiestre *et al.* (2016) em seu presente estudo, testou um pré-tratamento com o congelamento da biomassa e depois seu descongelamento a fim de intensificar a eficiência da extração de lipídios da levedura Yarrowia lipolytica aplicando várias técnicas modernas de extração, incluindo ultrassom, micro-ondas e moagem de esferas. O pré-tratamento com o congelamento da biomassa mostrou resultados satisfatórios quando comparado aos resultados da extração sem o congelamento, no processo de congelamento é formado cristais de gelo que são capazes de romper a estrutura da parede celular da levedura, facilitando a extração de biocompostos de interesse como os óleos microbianos.

Meullemiestre *et al.* (2016) em seu presente estudo, testou um pré-tratamento com o congelamento da biomassa e depois seu descongelamento a fim de intensificar a eficiência da

extração de lipídios da levedura *Yarrowia lipolytica* aplicando várias técnicas modernas de extração, incluindo ultrassom, micro-ondas e moagem de esferas. O pré-tratamento com o congelamento da biomassa mostrou resultados satisfatórios quando comparado aos resultados da extração sem o congelamento, no processo de congelamento é formado cristais de gelo que são capazes de romper a estrutura da parede celular da levedura, facilitando a extração de biocompostos de interesse como os óleos microbianos.

Tabela 02 - Testes preliminares utilizando o Ultra-turrax.

Ensaio	Conteúdo lipídico (%)	Lipídios totais ($g.L^{-1}$)	Carotenoides totais ($\mu g.g^{-1}$)	Carotenoides totais ($\mu g.L^{-1}$)
Controle	$32,5 \pm 0,21^{a}$	$2,5 \pm 0,02^{a}$	$73,7 \pm 2,0^{a}$	$572,3 \pm 32,0^{a}$
Biomassa úmida*	$0,9 \pm 0,02^{d}$	$0,1 \pm <0,01^{d}$	-	-
Biomassa seca*	$4,8 \pm 0,17^{c}$	$0,4 \pm 0,02^{c}$	$29,3 \pm 0,5^{c}$	$227,0 \pm 5,1^{c}$
Biomassa seca e congelada*	$7,0 \pm 0,19^{b}$	$0,5 \pm 0,01^{b}$	$33,3 \pm 0,5^{b}$	$258,0 \pm 8,5^{b}$

*Ultra-turrax. Valores médios ± desvio padrão (n=3). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

5.2 Delineamento composto central rotacional para avaliação da ruptura celular com agitação a alta velocidade

Primeiramente para a otimização da recuperação de lipídios, foi necessário efetuar um delineamento composto central (DCC) 2^3 no entanto as análises e interpretações de estudo apontaram a necessidade de realizar um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 a fim de avaliar a ruptura celular com homogeneização a alta velocidade utilizando o equipamento ultra-turrax, estudando as variáveis razão biomassa:solvente (X1), tempo de operação (X2) e velocidade de rotação (X3). A Tabela 03 mostra a matriz do planejamento com os valores reais e codificados das variáveis investigadas e as respectivas respostas quanto ao conteúdo lipídico (Y1) e lipídios totais (Y2). É possível verificar uma variação de 9,56% (ensaio 11) a 35,24% (ensaio 10) no conteúdo lipídico, e nas mesmas condições de ensaio o lipídio total variou de 0,80 a 2,96 $g.L^{-1}$.

Em função das concentrações das variáveis biomassa:solvente (X1), tempo de operação (X2) e velocidade de rotação (X3), a verificação do modelo de segunda ordem foi realizada

para as diferentes respostas. Para a verificação do modelo, os efeitos, desvio padrão e limites de confiança foram calculados, assim como a análise de variância (ANOVA) e os coeficientes de regressão apresentados na Tabela 04.

Para a resposta conteúdo lipídico é possível verificar que os termos lineares foram significativos ($p<0,05$) e positivos, enquanto os termos quadráticos dos coeficientes do modelo foram significativos ($p<0,05$) e negativos, já as interações entre os mesmos não apresentaram efeitos significativos e foram adicionadas à falta de ajuste para o cálculo da ANOVA (Tabela 03). O coeficiente de correlação (R) de 0,94 assim como a relação Fcalculado/Ftabulado de 5,2 foram calculados (Tabela 04). Com base no teste F e R, os modelos são preditivos (Rodrigues; Iemma, 2014) e significativos, respectivamente. Portanto, pode-se concluir que os dados experimentais se ajustam ao modelo codificado de segunda ordem (Eq. 2), sendo o mesmo usado para gerar as curvas de contorno (Figura 03) que descrevem o conteúdo lipídico (%).

$$Y1\ (\%) = 32,47 + 4,63\ X1 - 3,22\ X12 + 4,81\ X2 - 3,69\ X22 + 5,75\ X3 - 3,45\ X32 \quad (2)$$

Onde: Y1 é o conteúdo lipídico, X1 a razão biomassa:solvente, X2 o tempo de operação e X3 a velocidade de rotação.

Tabela 03 - Níveis codificados e valores reais (entre parênteses) do delineamento composto central rotacional 2^3.

Ensaio	X1 ($g.mL^{-1}$)	X2 (min)	X3 (rpm)	Y1 (%)	Y2 ($g.L^{-1}$)	DR Y1 (%)	DR Y2 (%)
1	-1(0,5:100)	-1(2)	-1(12000)	12,75	1,07	45,73	45,79
2	1(1:100)	-1(2)	-1(12000)	14,52	1,22	-11,43	-11,48
3	-1(0,5:100)	1(6)	-1(12000)	15,28	1,28	-8,25	-7,81
4	1(1:100)	1(6)	-1(12000)	26,27	2,21	1,79	2,26
5	-1(0,5:100)	-1(2)	1(20000)	23,36	1,96	21,15	21,43
6	1(1:100)	-1(2)	1(20000)	25,80	2,17	-7,29	-6,91
7	-1(0,5:100)	1(6)	1(20000)	25,01	2,10	-12,12	-11,43
8	1(1:100)	1(6)	1(20000)	33,47	2,81	-11,44	-11,03
9	-1,68(0,3:100)	0(4)	0(16000)	11,65	0,98	-33,91	-32,65
10	1,68(1,2:100)	0(4)	0(16000)	35,24	2,96	11,58	11,82
11	0(0,75:100)	-1,68(0,6)	0(16000)	9,56	0,80	-46,13	-46,25
12	0(0,75:100)	1,68(7,4)	0(16000)	34,65	2,91	13,02	13,40
13	0(0,75:100)	0(4)	-1,68(9280)	10,97	0,92	-19,14	-19,57
14	0(0,75:100)	0(4)	1,68(22720)	34,57	2,90	6,31	6,55
15	0(0,75:100)	0(4)	0(16000)	33,32	2,80	2,55	2,86
16	0(0,75:100)	0(4)	0(16000)	32,20	2,70	-0,84	-0,74
17	0(0,75:100)	0(4)	0(16000)	32,87	2,76	1,22	1,45
18	0(0,75:100)	0(4)	0(16000)	31,49	2,65	-3,11	-2,64

X1= razão biomassa:solvente (g:mL), X2 = tempo de operação (min), X3= velocidade de rotação (rpm), Y1 = Conteúdo Lipídico (%), Y2 = Lipídios Totais ($g.L^{-1}$) e DR=Desvio relativo.

Na Figura 03 é possível verificar que a otimização do conteúdo lipídico ocorre com o aumento do tempo de operação entre 4 a 6 min, a razão biomassa:solvente na faixa de 0,8:100 a 1:100 $g.mL^{-1}$ e a velocidade de rotação de aproximadamente de 20000 rpm.

Para a resposta dos lipídios totais é possível verificar que os termos lineares foram significativos ($p<0,05$) e positivos, enquanto os termos quadráticos dos coeficientes do modelo foram significativos ($p<0,05$) e negativos, já as interações entre os mesmos não apresentaram efeitos significativos e foram adicionadas à falta de ajuste para o cálculo da ANOVA (Tabela 05). O coeficiente de correlação (R) de 0,94 assim como a relação Fcalculado/Ftabulado de 5,2 foram calculados (Tabela 05). Com base no teste F e R, os modelos são preditivos (Rodrigues; Iemma, 2014) e significativos, respectivamente. Portanto, pode-se concluir que os dados experimentais se ajustam ao modelo codificado de segunda ordem (Eq. 03), sendo o mesmo usado para gerar as curvas de contorno (Figura 04) que descrevem os Lipídios totais (g/L).

$$Y2\ (g/L) = 2,72 + 0,78\ X1 - 0,54\ X12 + 0,80\ X2 - 0,62\ X22 + 0,96\ X3 - 0,58\ X32 \quad (3)$$

Onde: Y2 são os lipídios totais, X1 a razão biomassa:solvente, X2 o tempo de operação e X3 a velocidade de rotação.

Tabela 04 - Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP), valor t, valor p e ANOVA para conteúdo de lipídios (%).

	Efeitos	CR	EP	*t*(8)	*p*
Média	32,47	32,47	2,10	15,49	<0,01
X_1(L)	9,28	4,64	2,27	4,08	<0,01
X_1(Q)	-6,44	-3,22	2,36	-2,72	<0,02
X_2(L)	9,64	4,82	2,27	4,24	<0,01
X_2(Q)	-7,39	-3,69	2,36	-3,12	<0,01
X_3(L)	11,50	5,75	2,27	5,06	<0,01
X_3(Q)	-6,92	-3,46	2,36	-2,93	<0,01
X_1X_2	3,81	1,91	2,97	1,28	0,23
X_1X_3	-0,46	-0,23	2,97	-0,16	0,88
X_2X_3	-1,24	-0,62	2,97	-0,42	0,69

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	$F_{calculado}$
Regressão	6	1382,906	252,611	16,01
Resíduos	11	173,552	15,777	-
Total	17	1556,458	-	-

X1= razão biomassa:solvente (g:mL), X2 = tempo de operação (min), X3= velocidade de rotação (rpm), R^2= 88,85%, $F_{0,05;\ 6;11}$ = 3,09.

Figura 03 - Curvas de contorno do conteúdo de lipídios utilizando homogeneizador a alt velocidade: tempo de utilização do homogeneizador a alta velocidade versus razão biomassa: solvente (a), rotação utilizada no homogeneizador a alta velocidade versus tempo de utilização do homogeneizador a alta velocidade (b) e razão biomassa:solvente.

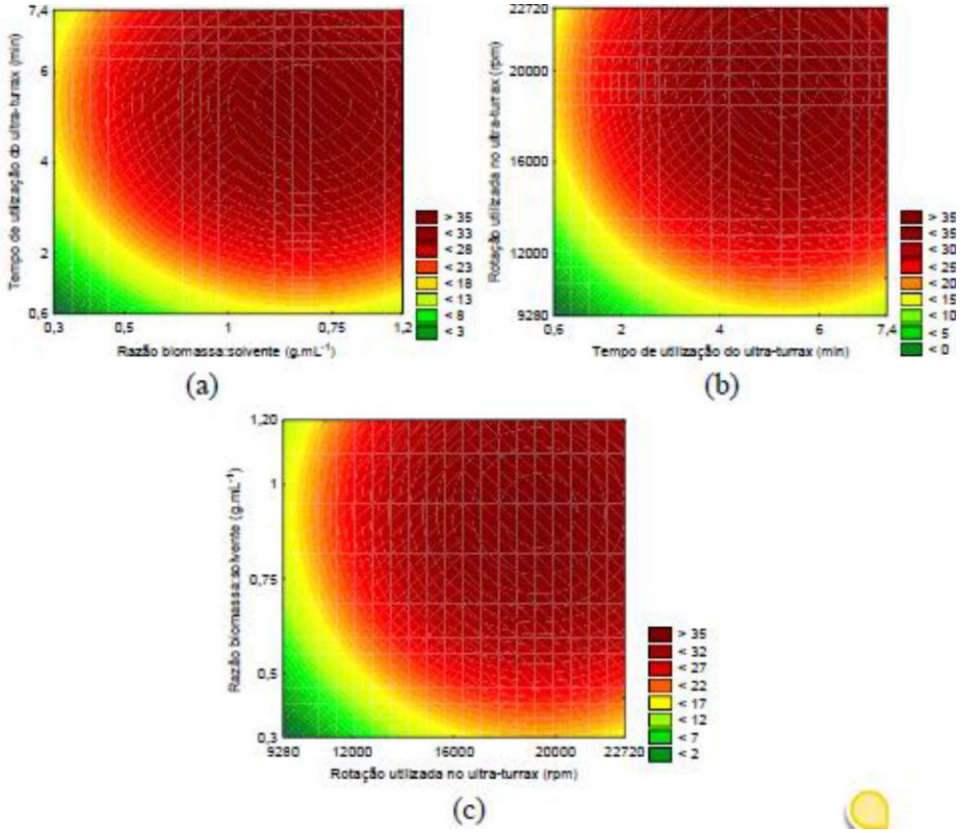


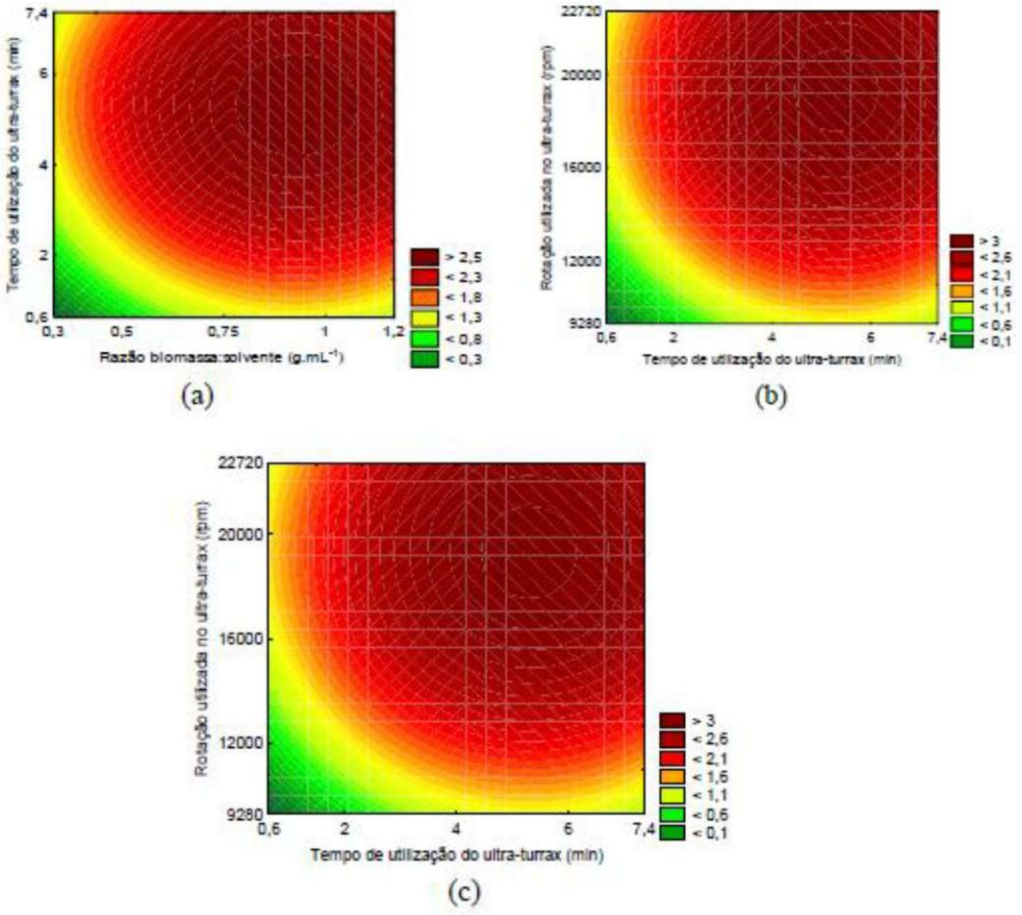
Tabela 05 - Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP), valor t, valor p e ANOVA para lipídios totais ($g.L^{-1}$).

	Efeitos	CR	EP	*t*(8)	*p*
Média	2,72	32,47	2,10	15,51	<0,01
X_1(L)	0,78	4,63	2,27	4,09	<0,01
X_1(Q)	-0,54	-3,22	2,36	-2,72	<0,02
X_2(L)	0,80	4,81	2,27	4,24	<0,01
X_2(Q)	-0,62	-3,69	2,36	-3,13	<0,01
X_3(L)	0,96	5,75	2,27	5,06	<0,01
X_3(Q)	-0,58	-3,45	2,36	-2,93	<0,01
X_1X_2	0,32	1,91	2,96	1,28	0,23
X_1X_3	-0,04	-0,23	2,96	-0,16	0,87
X_2X_3	-0,10	-0,62	2,96	-0,42	0,68

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	$F_{calculado}$
Regressão	6	9,767	1,784	16,07
Resíduos	11	1,222	0,111	-
Total	17	10,989	-	-

X1= razão biomassa: solvente (g:mL-1), X2 = tempo de operação (min), X3= velocidade de rotação (rpm); R^2= 88,87%, $F_{0,05;\,6;11}$ = 3,09.

Figura 04 - Curvas de contorno dos lipídios totais para experimento com homogeneizador a alta velocidade: tempo de utilização do homogeneizador a alta velocidade versus razão biomassa: solvente (a), rotação utilizada no homogeneizador a alta velocidade versus tempo de utilização do homogeneizador a alta velocidade (b) e razão biomassa:solvente.



5.2.1 Validação dos modelos utilizando ruptura celular com homogeneizador a alta velocidade

Para a validação dos modelos obtidos através do DCCR 23 para homogeneização a alta velocidade utilizando o equipamento ultra-turrax selecionou-se a condição do ensaio 8 que se encontra dentro da faixa de otimização do processo (Figuras 3 e 4), onde as variáveis são: razão biomassa:solvente (1:100 g.mL^{-1}), tempo de operação no equipamento (6 min) e velocidade de rotação (20000 rpm). A Tabela 06 apresenta os resultados da validação para as respostas conteúdo lipídico (33,36%) e lipídios totais (2,92g.L^{-1}), onde todas obtiveram desvios inferiores a 20%, se adequando bem ao modelo proposto (Rodrigues; Iemma, 2014).

Ao comparar a ruptura utilizando o método controle com DMSO para o rompimento celular foi obtido 32,50% de conteúdo lipídico e 2,50 g.L^{-1} de lipídios totais (Tabela 02), ou seja, para a condição de processo otimizada, utilizando homogeneização a alta velocidade por

meio do equipamento ultra-turrax, foi possível obter um resultado semelhante ao teste controle, sem utilizar agente químico para a ruptura celular.

Tabela 06 - Ensaios para validação do modelo empírico do DCCR 2^3 para homogeneização a alta velocidade.

	Conteúdo lipídico (%)	Lipídios totais ($g.L^{-1}$)
Resposta prevista	37,30	3,12
Resposta experimental	33,36 ± 0,60	2,92 ± 0,05
Desvio do modelo (%)	11,81	6,85

Valores médios ± desvio padrão (n=3).

Garay, Boundy-Mills e German (2014) estudaram a produção de compostos oleaginosos por leveduras que está relacionada com a limitação da matriz fonte de nitrogênio, essa constatação encontra-se outorgada na literatura e pode ser confirmada na pesquisa de Costa, 2020) que demonstra uma discrepância de quase 75 % entre o acúmulo de lipídios obtidos entre os cultivos no meio sintético com glicerol e cultivo com melaço e extrato de levedura. Esta discrepância está relacionada à razão carbono-nitrogênio no meio de cultivo, quanto maior a razão, maior a produção de óleos microbianos pela levedura.

Liu *et al.* (2015) por intermédio de seus experimentos mostrou que em sua melhor condição de cultivo, a levedura *Rhodotorula gluitinis* acumulou 36,4 % de lipídios, contendo em seu meio hidrolisado de sabugo de milho como fonte de carbono a uma razão carbono-nitrogênio (C/N) equivalente a 75. No presente estudo, utilizando uma outra cepa de *Rhodotorula mucilaginosa*, o acúmulo de lipídios foi de 33,36% (Tabela 06) apresentando uma razão (C/N) no meio de cultivo previamente otimizado superior e equivalente a 143,6 (Rodrigues *et al.*, 2019).

Os pesquisadores Reyna-Martínez *et al.* (2014) cultivaram *Rhodotorula mucilaginosa*, com uma razão C/N de 12,5, no qual obteve um acúmulo de conteúdo lipídicos de 20,0%, diferente do presente estudo que obteve um acúmulo de 33,36% de conteúdo lipídico, comprovando o estudo de Garay, Boundy-Mills e German (2014), já que a baixa razão C/N é um fator limitante a produção dos compostos lipídicos.

Lima (2019) em seu estudo para obter compostos fenólicos e carotenoides, utilizando tecnologias de extração consideradas verdes (extração assistida por ultrassom (EAU), extração por líquido pressurizado (PLE) e extração por ultraturrax (UTE)), a partir da polpa e do resíduo de goiaba no meio. Os extratos foram caracterizados quanto ao teor de fitoquímicos, perfil de fenólicos, teor de β-caroteno e licopeno, e atividade antioxidante *in vitro*. Os resultados apontaram para dados interessantes, uma vez que os compostos fenólicos da polpa foram extraídos em maior número e quantidade quando foi aplicada a extração por homogeneização

a alta velocidade. Embora o estudo não apresente dados da extração de lipídios, mas mostra a eficiência da utilização do homogeneizador a alta velocidade como método para uma alternativa mais verde.

Pino-Maureira *et al.* (2021) utilizaram as cepas marinhas de *Rhodotorula* NCYC4007 e NCYC1146 para determinar a biossíntese de ácidos graxos e carotenoides por biotransformação de glicerol bruto (produto residual do biodiesel). Para avaliar a presença de lipídios, as amostras foram cultivadas na presença de glicerol de grau analítico e glicose como a principal fonte de carbono. A ruptura celular foi realizada com ultra-turrax por 1 min. Utilizando o ultra-turrax assim como no presente trabalho foi possível obter resultados satisfatórios semelhantes a utilização do método controle com DMSO, na extração e depois recuperação do biocompostos de interesse que apresentou entre 19 a 23% de conteúdo lipídio na amostra.

5.3 Delineamento composto central para avaliação da ruptura celular com plasma a frio

Para a otimização da recuperação de lipídios, a ruptura celular com plasma a frio foi estudada através de um delineamento composto central (DCC) 2^3 tendo como variáveis biomassa (X1), tempo (X2) e potência (X3). A Tabela 07 apresenta a matriz do planejamento com os valores reais e codificados das variáveis investigadas e as respectivas respostas quanto ao conteúdo lipídico (Y1) e lipídios totais (Y2). É possível verificar uma variação de 20,65% (ensaio 1) a 34,87% (ensaio 8) no conteúdo lipídico, e nas mesmas condições de ensaio o lipídio total variou de 1,81 a 3,06 $g.L^{-1}$

Em função das concentrações das variáveis biomassa (X1), tempo (X2) e potência utilizada no equipamento (X3), a verificação do modelo de primeira ordem foi realizada para as diferentes respostas. Para a verificação do modelo, os efeitos, desvio padrão e limites de confiança foram calculados, assim como a análise de variância (ANOVA) e os coeficientes de regressão apresentados na Tabela 08.

Tabela 07 - Níveis codificados e valores reais do delineamento composto central (DCC) 2^3 para o plasma a frio.

Ensaio	X1 (g)	X2 (min)	X3 (W)	Y1 (%)	Y2 ($g.L^{-1}$)	DR Y1 (%)	DR Y2 (%)
1	-1 (0,5)	-1 (20)	-1(8)	20,7	1,8	34,8	34,3
2	1 (0,7)	-1 (20)	-1(8)	24,9	2,2	11,6	11,0
3	-1 (0,5)	1 (40)	-1(8)	24,5	2,2	9,8	10,2
4	1 (0,7)	1 (40)	-1(8)	28,5	2,5	-7,5	-7,6
5	-1 (0,5)	-1 (20)	1(14)	25,5	2,2	1,5	1,3
6	1 (0,7)	-1 (20)	1(14)	30,5	2,7	-10,4	-10,8
7	-1 (0,5)	1 (40)	1(14)	31,0	2,7	-9,0	-8,5
8	1 (0,7)	1 (40)	1(14)	34,9	3,1	-21,4	-21,2
9	0 (0,6)	0 (30)	0 (11)	28,8	2,5	3,0	3,2
10	0 (0,6)	0 (30)	0 (11)	29,0	2,5	3,6	3,5
11	0 (0,6)	0 (30)	0 (11)	28,7	2,5	2,8	2,8
12	0 (0,6)	0 (30)	0 (11)	27,9	2,5	0,1	0,0

X1= Biomassa (g), X2 = Tempo (min), X3= Potência (W), Y1 = Conteúdo lipídico (%), Y2 = Lipídios totais ($g.L^{-1}$) e DR = Desvio relativo.

Com o resultado para a resposta do conteúdo lipídico foi possível verificar que os termos lineares foram significativos ($p<0,05$, Tabela 08) e positivos enquanto que as interações entre os mesmos não apresentaram efeitos significativos e foram adicionadas à falta de ajuste para o cálculo da ANOVA (Tabela 08). O coeficiente de correlação (R) de 0,98 assim como a relação Fcalculado/Ftabulado de 20,7 foram calculados (Tabela 08). Com base no teste F e R, os modelos são preditivos (Rodrigues; Iemma, 2014) e significativos, respectivamente. Portanto, pode-se concluir que os dados experimentais se ajustam ao modelo codificado de primeira ordem (Eq. 04), sendo o mesmo usado para gerar as curvas de contorno (Figura 05) que descrevem o conteúdo lipídico (%).

$$Y1\ (\%) = 27,90 + 4,27\ X1 + 4,32\ X2 + 5,84\ X3 \quad (4)$$

Onde: Y1 é o conteúdo lipídico, X1 a biomassa, X2 o tempo e X3 a potência.

Nas Figuras 5 e 6 é possível verificar que ocorre um incremento no conteúdo lipídico e lipídios totais, respectivamente, com o aumento do tempo de operação do equipamento de 20 para 40 min, com a maior concentração de biomassa (0,7 g) e associada a maior potência do equipamento (14 W).

Tabela 08 - Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP), valor t, valor p e ANOVA para conteúdo de lipídios (%) para o plasma a frio.

	Efeitos	CR	EP	*t*(5)	*p*
Média	27,90	27,90	0,24	114,81	<0,01
X_1(L)	4,27	2,13	0,59	7,17	<0,01
X_2(L)	4,32	2,16	0,59	7,25	<0,01
X_3(L)	5,84	2,92	0,59	9,81	<0,01
X_1X_2	-0,33	-,016	0,59	-0,56	0,60
X_1X_3	0,15	-0,07	0,59	0,26	0,80
X_2X_3	0,58	0,29	0,59	0,98	0,40

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	$F_{calculado}$
Regressão	3	142,0018	47,33	84,13
Resíduos	8	4,5006	0,56258	-
Total	11	146,5024	-	-

X1= Biomassa (g), X2 = Tempo (min), X3= Potência (W), R^2= 96,83% $F_{0,05;\ 3;8}$ = 4,07.

Tabela 09 - Resultados do coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP), valor t, valor p e ANOVA para lipídios totais (g/L).

	Efeitos	CR	EP	*t*(5)	*P*
Média	2,45	2,45	0,02	113,75	<0,01
X_1(L)	0,38	0,19	0,05	7,15	<0,01
X_2(L)	0,38	0,19	0,05	7,15	<0,01
X_3(L)	0,51	0,25	0,05	9,71	<0,01
X_1X_2	-0,03	-0,01	0,05	-0,61	0,56
X_1X_3	0,01	-0,006	0,05	0,23	0,82
X_2X_3	0,05	-0,02	0,05	0,99	0,36

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	$F_{calculado}$
Regressão	3	1,095	0,365	91,27
Resíduos	8	0,035	0,004	-
Total	11	1,131	-	-

X1= biomassa (g), X2 = tempo (min), X3= potência (W), R^2= 96,83% $F_{0,05;\ 3;8}$ = 4,07.

Para a resposta dos lipídios totais é possível verificar que os termos lineares no modelo foram significativos ($p<0,05$) e positivos, enquanto as interações entre os mesmos não apresentaram efeitos significativos e foram adicionadas à falta de ajuste para o cálculo da ANOVA (Tabela 09). O coeficiente de correlação (R) de 0,98 assim como a relação Fcalculado/Ftabulado de 22,4 foram calculados (Tabela 09). Com base no teste F e no valor de R, os modelos são preditivos (Rodrigues; Iemma, 2014) e significativos, respectivamente. Portanto, pode-se concluir que os dados experimentais se ajustam ao modelo codificado de primeira ordem (Eq. 05), sendo o mesmo usado para gerar as curvas de contorno (Figura 06) que descrevem os lipídios totais.

$$Y2\ (g.L^{-1}) = 2{,}45 + 0{,}38\ X1 + 0{,}37\ X2 + 0{,}51\ X3 \quad (5)$$

Onde: Y2 são os lipídios totais, X1 a biomassa, X2 o tempo e X3 a potência.

Figura 05 - Curvas de contorno do conteúdo de lipídios para experimento com plasma frio: tempo de operação do equipamento versus biomassa (a), potência utilizada no equipamento versus tempo de operação do equipamento (b) e biomassa versus potência utilizada no equipamento (c).

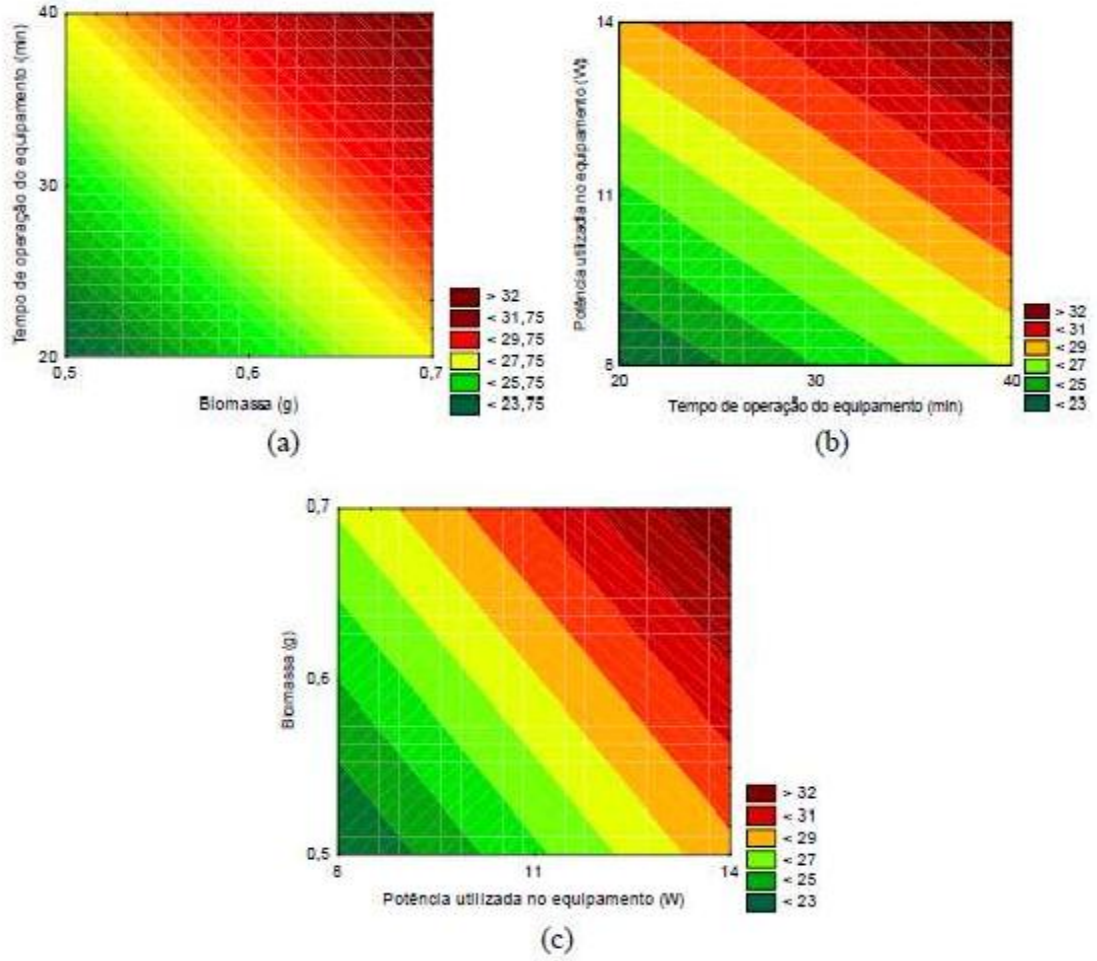
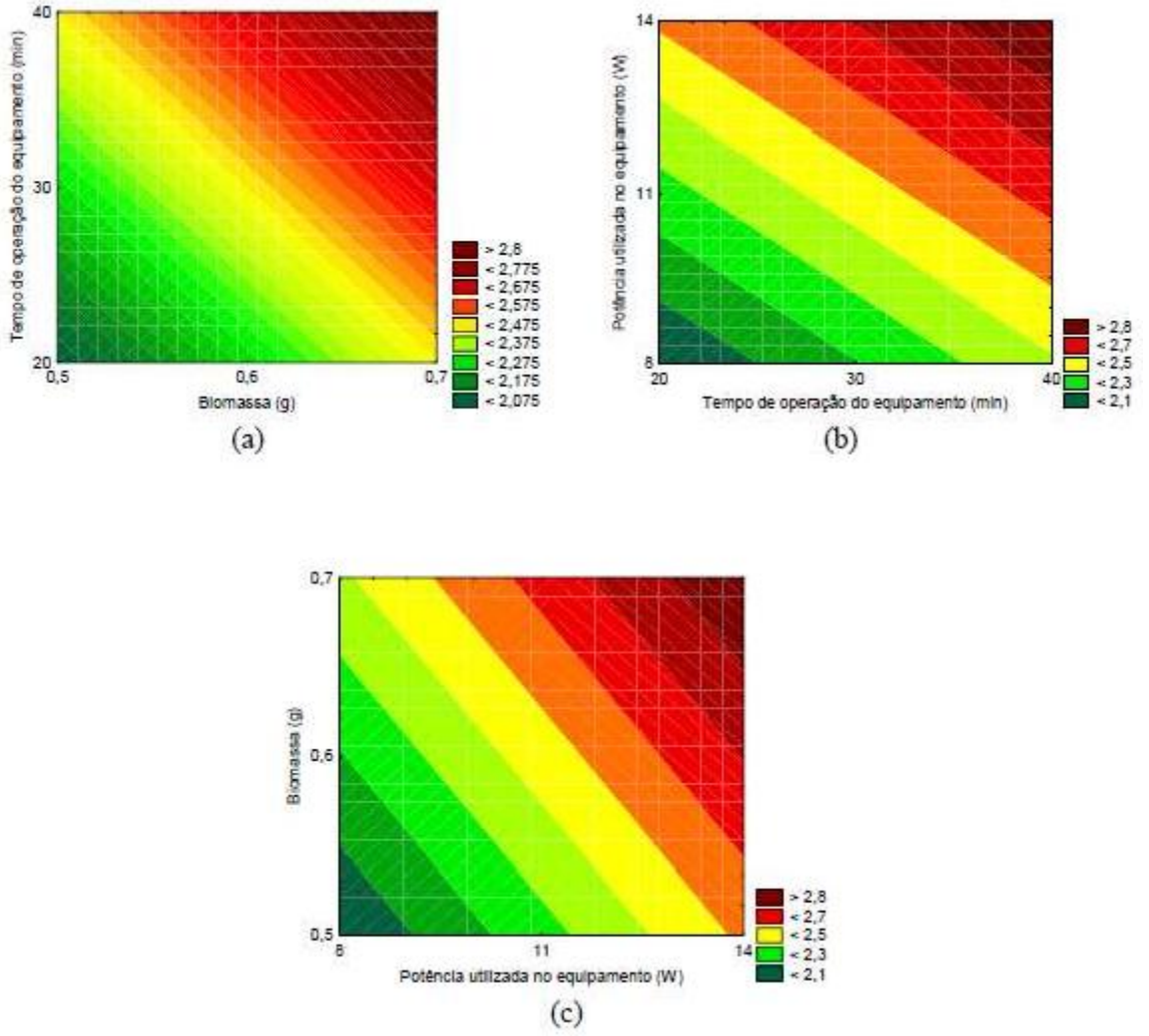


Figura 06 - Curvas de contorno dos lipídios totais para experimento com plasma frio: tempo de operação do equipamento versus biomassa (a), potência utilizada no equipamento versus tempo de operação do equipamento (b) e biomassa versus potência utilizada no equipamento (c).



Através do DCC foi possível analisar o processo e verificar que o ensaio 8 na Tabela 07, com o conteúdo lipídico (34,87%) e lipídios totais (3,06 $g.L^{-1}$), ao comparar o controle utilizando o DMSO para o rompimento celular se obteve, conteúdo lipídico (32,50%) e lipídios totais (2,50 $g.L^{-1}$), ou seja, para a condição de processo otimizada, utilizando o plasma a frio foi possível obter um resultado superior ao comparado com o controle, sem utilizar agente químico para a ruptura celular.

Cubas *et al.* (2020) em seu estudo para aumentar a eficiência e reduzir o tempo de extração, melhorando a qualidade do óleo extraído da borra de café, avaliaram uma nova técnica para extração do óleo da borra de café, utilizando uma tecnologia de plasma frio como um procedimento de pré-extração antes da extração Soxhlet. Para fins de comparação, também foram realizados experimentos usando um procedimento de pré-extração de ultrassom antes da extração de Soxhlet. Observou-se que o uso da pré-extração com o plasma mais que dobrou o

rendimento da extração em comparação com a extração Soxhlet isoladamente. Além disso, aumentou o rendimento em cerca de 30% em comparação com o uso de ultrassom como procedimento de pré-extração.

6 CONCLUSÕES

No presente estudo a partir da seleção do pré-tratamento de secagem e congelamento da biomassa produzida pela levedura foi possível obter uma extração de óleo microbiano rico em carotenoides produzido por *Rhodotorula mucilaginosa* (7,0±0,19 % de conteúdo lipídico, 0,5±0,01 $g.L^{-1}$ de lipídios totais e concentração de carotenoides totais de 33,3±0,5 $\mu g.g^{-1}$ ou 258, 0±8,5 $\mu g.L^{-1}$), isento do uso de DMSO. A otimização através da técnica de planejamento experimental permitiu com a aplicação da homogeneização a alta velocidade alcançar, através de um modelo validado, 33,36% de conteúdo lipídico e 2,92 $g.L^{-1}$ de lipídios totais com razão biomassa:solvente de 1:100 $g.mL^{-1}$, tempo de operação no equipamento de 6 min e velocidade de rotação de 20000 rpm. A ruptura celular utilizando plasma a frio e ar sintético em um planejamento experimental, nas condições com 0,7 g de biomassa, durante 40 min e 14 W de potência atingiu 34,87% e 3,06 $g.L^{-1}$ de conteúdo lipídico e lipídio total, respectivamente. É possível verificar que as duas técnicas propostas apresentaram resultados superiores quanto a extração de lipídios, com ausência do uso do agente de ruptura química DMSO. Portanto, podem tornar-se alternativas menos agressivas quimicamente no processo de ruptura da célula microbiana.

7 RESÍDUOS GERADOS E DESTINO

Os resíduos gerados na pesquisa foram solventes orgânicos (acetona, etanol, dimetilsulfóxido e éter de petróleo) além de soluções aquosas salinas diluídas (cloreto de sódio e sulfato de sódio). Todos os resíduos citados foram colocados em frasco âmbar, estão devidamente identificados e acondicionados, aguardando atingir a quantidade mínima para solicitação de recolhimento pela Coordenação de Gestão Ambiental (PROINFRA-FURG).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGEITOS, J. M.; VALLEJO, J. A.; VEIGA-CRESPO, P.; VILLA, T. G. Oil yeasts as oleaginous cell factories. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 1219-1227, 2011.

AMORIM-CARRILHO, K. T.; A. CEPEDA, A.; FENTE, C.; REGAL, P. Review of methods for analysis of carotenoids. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 56, p. 49-73, 2014.

AOAC - ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, 17thedition. Washington, D. C., CD-ROM, 2000.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION**. Standart Methods Examination of Water and Wastewater**, 19thedition. Washington D. C., American Water Works Association, 1995.

BAO, Y.; REDDIVARIA, L.; JEN-YI, H. Development of cold plasma pretreatment for improving phenolics extractability from tomato pomace. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 65, p. 102445, 2020.

BARBOSA, O. J. S. **Fatores dietéticos protetores de doenças cardiovasculares: uma revisão sistemática**.2020. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2020.

BHARATHIRAJA, B.; SRIDHARAN, S.; SOWMYA, V.; YUVARAJ, D.; PRAVEENKUMAR, R. Microbial oil - A plausible alternate resource for food and fuel application. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 423-432, 2017.

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

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 2 ed. São Paulo: Varela, 1992. 223 p.

BRAGA, L. T. **Microencapsulação de extratos carotenogênicos produzidos por *Sporidiobolus pararoseus* e *Rhodotorula mucilaginosa***. 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2016.

BRITTON, G. In Carotenoids 3: **Biosynthesis and Metabolism**, *Vol. 3*, 1st ed. Boston, Berlin, 1998, pp. 13.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **The FASEB Journal**, v. 9, p. 1551-1558, 1995.

CARVALHO, O. C. A. **Características físico-químicas de óleos vegetais comestíveis puros e adulterados.** 2017. TCC (Licenciatura em Química) - Universidade Federal Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2017.

CASTRO, A. R.; GUIMARÃES, M.; OLIVEIRA, J. V.; PEREIRA, M. A. Production of added value bacterial lipids through valorization of hydrocarbon-contaminated cork waste. **Science of the Total Environment**, v. 60, p. 677-682, 2017.

CHANDI, G. K.; GILL, B. S. Production and characterization of microbial carotenoids as an alternative to synthetic colors: A review. **International Journal of Food Properties**, v. 14, p. 503-513, 2011.

CHEIRSILP, B.; LOUHASAKUL, Y. Industrial wastes as a promising renewable source for production of microbial lipid and direct transesterification of the lipid into biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 329-337, 2013.

CHEN, W.; LIU, Y.; SONG, L.; SOMMERFELD, M.; HU, Q. Automated accelerated solvent extraction method for total lipid analysis of microalgae. **Algal Research**, v. 51, p. 102080, 2020.

CHENG, Y.; YANG, C. F. Usings trains *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 16, p. 270-275, 2016.

CHOI, M. H.; PARK, Y. H. Production of yeast biomass using waste Chinese cabbage**.** **Biomass & Bioenergy**, v. 25, p. 221-226, 2003.

CIPOLATTI, E. P.; BULSING, B. A.; SÁ, C. S.; BURKERT, C. A. V.; FURLONG, E. B.; BURKERT, J. F.M. Carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: antioxidants activity and stability of extracts. **African Journal of Biotechnology**, v.14, p.1982-1988, 2015.

CIPOLATTI, E. P.; REMEDI, R. D.; SÁ, C. S. S.; RODRIGUES, A. B.; RAMOS, J. M. G.; BURKERT, C. A. V.; FURLONG, E. B.; BURKERT, J. F. M. Use of agroindustrial by products as substrate for production of carotenoids with antioxidant potential by wild yeasts. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 20, p. 101208, 2019.

COSTA, A. W.; PADILHA, E. D. C.; JÚNIOR, O. D. S.; SILVA, H. L. F.; SILVA, J.; ANCÂNTARA, A. M.; FERRARI, M.; SANTOS, S. E. Oil-lipids, carotenoids and fatty acids simultaneous production by *Rhodotorula mucilaginosa* CCT3892 using sugarcane molasses as carbon source. **Brazilian Journal of the Food Technology**, v. 23, p. 2019064, 2020.

CUBAS, A. L. V.; MACHADO, M. DE M.; BIANCHET, R. T.; HERMANN, K. A. DA C.; BORK, J. A.; DEBACHER, N. A.; MOECKE E. H. S. Oil extraction from spent coffee grounds assisted by non-thermal plasma. **Separation and Purification Technology**, v.250, p. 117171, 2020.

DAMODARAM, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.

DAVIES, B. H. **Chemical biochemistry plant pigments**. GOODWIN, T. W., Academic Press: New York, 1976. 38 p.

FAHY, E.; SUBRAMANIAM, S.; BROWN, H. A.; GLASS, C. K.; MERRILL, A. H. J. R.; MURPHY, R. C.; RAETZ, C. R. H.; RUSSELL, D. W.; SEYAMA, Y.; SHAW, W.; SHIMIZU, T.; SPENER, F.; VAN MEER, G.; VAN NIEUWENHZE, M. S.; WHITE, S. H.;

WITZTUM, J. L.; DENNIS, E. A. A. Comprehensive classification system for lipids. **Journal of Lipid Research**, v. 46, p. 839-861, 2005.

FARIA, G.Y.Y.; SOUZA, M. M.; OLIVEIRA, J. R. M.; COSTA, C. S. B.; COLLARES, M. P.; PRETICE, C. Effect of ultrasound-assisted cold plasma pretreatment to obtain sea asparagus extract and its application in Italian salami. **Food Research International**, v. 137, p. 109435, 2020.

FONSECA, R. A. S.; RAFAEL, R. S.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 1165-1171, 2011.

FONSECA-ALANIZ, F. H. M.; TAKADA, J.; VALE, A. C. I. M.; LIMA, B. F. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivo Brasileiro Endocrinologia Metabologia,** v. 50, p. 216-229, 2006.

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

GECIOVA, J.; BURY, D.; JELEN, P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry - a review. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 541-553, 2002.

GOMES, S. F. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. **Revista de Nutrição**, v. 20, p. 537-548, 2007.

GRZEGORZEWSKI, F.; ROHN, S.; KROH, L. W.; GEYER, M..; SCHLÜTER, O. Surface morphology and chemical composition of lamb's lettuce (Valerianella locusta) after exposure to a low-pressure oxygen plasma. **Food Chemistry**, v. 122, p. 1145-1152, 2010.

HAN, L.; PATIL, S.; BOEHM, D.; MILOSAVLJEVIĆ, V.; CULLEN, P. J.; BOURKE, P. Mechanisms of inactivation by high-voltage atmospheric cold plasma differ for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, p. 450-458, 2016.

HIMMEL, M.E. Comparison of nitrogen depletion and repletion on lipid production in yeast and fungal species. **Energies**, v. 9, p. 1-12, 2016.

HINDS, T. S.; WILLIAM, R. D.; WEST, L.; KNIGHT E. M. Carotenoids and retinoids: a review of research, clinical and public health applications. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 37, p. 551-558, 1997.

HOF, H. K. H.; WEST, C. E.; WESTSTRATE, J. A.; HAUTVAST, J. G. Dietaryfactors that affect the bioavailability of carotenoids. **Journal of Nutritional**, v. 130, p. 503- 506, 2000.

HOFFMANN, C.; BERGANZA, C.; ZHANG, J. Cold Atmospheric Plasma: Methods of production and application in dentistry and oncology. **Medical Gas Research**, v. 3, p. 21, 2013.

HUANG, C. C.; WU, J. S. B.; WU, J. S.; TING, Y. Effect of novel atmosphericpressure jet pretreatment on the drying kinetics and quality of white grapes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, p. 5102-5111, 2019.

J.; PURI, M. Understanding response surface optimisation to the modeling of Astaxanthin extraction from a novel strain *Thraustochytrium sp.* **Algal Research**, v. 11, p. 113-120, 2015.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants**. European Journal of Medicinal Chemistry**, v.70, p. 102-10, 2013.

KANZY, H. M.; NASR, N. F.; EL-SHAZLY, H. A. M.; BARAKATA, O. S. Optimization of carotenoids production by yeast strains of *Rhodotorula* using Salted Cheese. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, p. 456-469, 2015.

KAUR, D.; WANI, A. A.; SINGH, D. P.; SOGI, D. S. Shelf life enhancement of butter, ice-cream, and mayonnaise by addition of lycopene. **International Journal of Food Properties**, v. 14, p.1217-1231, 2016.

KHOT, M.; KAMAT, S.; ZINJARDE, S.; PANT, A.; CHOPADE, B.; RAVIKUMAR, A. Single cell oil of oleaginous fungi from the tropical mangrove wetlands as a potential feedstock for biodiesel. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p. 71, 2012.

KIM, D.Y.; VIJAYAN, D.; PRAVEENKUMAR, R.; HAN, J. I.; LEE, K.; PARK, J. Y.; OH, Y. K. Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 300-310, 2016.

KIRTI, K.; AMITA, S.; PRITI, S.; KUMAR, A. M.; JYOTI, S. Colorful world of microbes: carotenoids and their applications. **Advances in Biology**, v. 2014, p. 1-13, 2014.

KITCHA, S.; CHEIRSILP, B. Screening of Oleaginous Yeasts and Optimization for Lipid Production Using Crude Glycerol as a Carbon Source. **Energy Procedia**, v. 9, p. 274, 2011.

KLIS, F. M.; MOL, P.; HELLINGWERF, K.; BRUL, S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 239-256, 2002.

KODAMA, S.; THAWATCHAIPRACHA, B.; SEKIGUCHI, H. Enhancement of essential oil extraction for steam distillation by DBD surface treatment. **Plasma Processes and Polymers**, v. 11, p. 126-132, 2014.

KOT, A. M.; BŁAŻEJAK, S.; GIENTKA, I.; KIELISZEK, M.; BRYŚ, J. Torulene and torularhodin: "New" fungal carotenoids for industry? **Microbial Cell Factories**, v. 17, p. 49, 2018.

KOT, A. M.; BŁAŻEJAK, S.; KIELISZEK, M.; GIENTKA, I.; PIWOWAREK, K.; BRZEZIŃSKA, R. Production of lipids and carotenoids by *Rhodotorula gracilis* ATCC 10788 yeast in a bioreactor using low - cost wastes**. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 26, p. 101634, 2020.

KOT, A. M.; BŁAZEJAK, S.; KURCZ, A.; GIENTKA, I.; KIELISZEK, M. *Rhodotorula glutinis* - potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 6103 - 6117, 2016.

KRIGGER, S. P. **Obtenção e aplicação de microcápsulas de betalaínas extraídas da pitaya vermelha como corante natural em iogurtes e avaliação da estabilidade através de**

imagens digitais. 2019. TCC (Bacharel em Química Industrial) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.

LEE, P. C.; SCHMIDT-DANNERT, C. Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 1-11, 2002.

LI, Y.; ZHAO, Z. K.; BAI, F. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* Y4 in fed-batch culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 312-317, 2007.

LIMA, R. S. **Extração e caracterização de carotenoides e compostos fenólicos da polpa e do resíduo de processamento da goiaba (*Psidium guajava l.*).** Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianopolis, 2019

LIU, Y.; WANG, Y.; LIU, H.; ZHANG, J. Enhanced lipid production with undetoxified corncob hydrolysate by *Rhodotorula glutinis* using high cell density culture strategy. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 32-39, 2015.

LOPES, A. N.; REMEDI, R. D.; SÁ, C. S.; CARLOS ANDRÉ VEIGA BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. Different cell disruption methods for obtaining carotenoids by *Sporodiobolus pararoseus* and *Rhodothorula mucilaginosa*. **Food Science and Biotechnology**, v. 26, p.759-766, 2017.

LOTFY, K.; KHALIL, S. M.; EL-RAHEEM, H. A. Inactivation by helium cold atmospheric pressure plasma for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Theoretical and Applied Physics**, v. 14, p. 37-45, 2020.

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

MACHADO, W. R. C.; BURKERT, J. F. M. Optimization of agroindustrial medium for the production of carotenoids by wild yeast *Sporidiobolus pararoseus*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, p. 209-219, 2015.

MALDONADE, I. R.; CARVALHO, P. G. B.; FERREIRA, N. A. Comunicado técnico 85: Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS. Brasília: **Embrapa Hortaliça**, 2013.

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

MAROVA, I.; CERTIK, M.; BREIEROVA, E. Production of Enriched Biomass by Carotenogenic Yeasts - Application of Whole-Cell Yeast Biomass to Production of Pigments and Other Lipid Compounds. **Biomass - Detection, Production and Usage**, v. 35, p. 345-384, 2015

MASSAROLO, K. C.; SOUZA, T. D.; RIBEIRO, A. C.; FURLONG, E. B.; SOARES, L. A. S. Influence of cultivation *Rhizopus oryzae* on rice bran on lipid fraction: fatty acids and phospholipids. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 8, p. 204 - 208, 2016.

MATA-GÓMEZ, L.; MONTAÑEZ, J.; MÉNDEZ-ZAVALA, A.; AGUILAR, C. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. **Microbial Cell Factories**, v. 13, p. 1-14, 2014.

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

MESQUITA, F. G.; TORQUILHO, S. H. O uso dos carotenoides para promoção da saúde. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v. 8, p. 1-28, 2016.

MESQUITA, S. S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; SERVULO, E. F. C. Carotenoides: Propriedades, aplicações e mercado. **Revista Virtual de Química**, v. 9, p. 672-688, 2017.

MICHELON, M.; BORBA, T. M.; RAFAEL, R. S.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. de M. Extration of carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: a comparison between different techniques of cell disruption. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 1-8, 2012.

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

MORAES, C. C.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J. C-phycocyanin extraction process for large-scale use. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, p. 133-148, 2010.

ORNELAS, L. H. **Técnica dietética**: Seleção e preparo dos alimentos. 8ª ed. São Paulo: Atheneu, 2010, p. 205-212.

OTERO, D. M.; HUERTA, K. M.; BULSING, B. A.; ROSA, C. A.; ZAMBIAZI, R. C.; BURKERT, C. A.; BURKERT, J. Carotenoid-producing yeasts in the brazilian biodiversity: isolation, identification and cultivation in agroindustrial waste. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, p. 117-129, 2019.

PARAJÓ, J. C. V. S.; VÁZQUEZ, M. Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cell grown on xylose. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 181-187, 1998.

PELOSI, S. M. **Produção de massa de tomate enriquecida com fontes naturais de carotenoides importantes para a saúde humana**.2012. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2012.

PEREIRA, R. N.; SILVEIRA, J. M.; BURKERT, J. F. M.; ORES, J. C.; BURKERT, C. A. V. Simultaneous lipid and carotenoid production by stepwise fed-batch cultivation of *Rhodotorula mucilaginosa* with crude glycerol. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, p. 1099-1108, 2019.

PINO-MAUREIRA, N.; GONZÁLEZ-SALDÍA, R.; CAPDEVILLE, A.; SRAIN, B. *Rhodotorula Strains* Isolated from Seawater That Can Biotransform Raw Glycerol into Docosahexaenoic Acid (DHA) and Carotenoids for Animal Nutrition. **Applied Sciences**, v. 11, p. 11062824, 2021.

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

REYNA-MARTINEZ, R. *et al.* Lipid production by pure and mixed cultures production by pure and mixed cultures of *Chlorella pyrenoidosa* and *Rhodotorula mucilaginosa* isolated in Nuevo Leon, Mexico. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, p.354-379, 2014.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. 1. ed. São Paulo: Edgar Blucher, 2004. 196 p.

RIBEIRO, J. E. S.; MARTINI, M.; ANDREUCCI, A.; ALTOMONTE, I. Preliminary investigation of reuse of Ricotta-cheesewhey (scotta) as substrate for thegrowth of *Rhodotorula glutinis* intended for the production of carotenoids. **Journal of Agricultural and Biological Science,** v. 12, p. 302-306, 2017.

RODRIGUES, T. V. D. **Processos em batelada e batelada alimentada em frascos agitados para produção de carotenoides em meio agroindustrial por *Rhodoturula mucilaginosa***. 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2018.

RODRIGUES, T. V. D. **Utilização de LED na produção simultânea de carotenoides e lipídios por *Rhodotorula mucilaginosa* em meio agroindustrial**. 2023. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2023.

RODRIGUES, T. V.; AMORE, T. D.; TEIXEIRA, E. C.; BURKERT, J. F. M. Carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa* in batch and fed-batch fermentation using agroindustrial by products. **Food Technology and Biotechnology**, v.57, p. 388-398, 2019.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2008.

RODRIGUEZ-AMAYAZ, D. B. **A guide to carotenoid analysis in foods**. 1. ed. Washington D. C: ILSI Press, 2001. 63 p.

ROMERO, F.J.; GARCIA, L. A.; SALAS, J. A.; DIAZ, M.; QUIROS, L. M. Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 507-515, 2001.

RUTZ, J. K.; BORGES, C. D.; ZAMBIAZI, R. C.; ROSA, C. G.; SILVA, M. M. Elaboration of microparticles of carotenoids from natural and synthetic sources for application in food. **Food Chemistry**, v. 202, p. 324-333, 2016.

SAINI, K. R. KEUM, Y. S. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. **Food Chemistry**, v. 240, p. 90-103, 2018.

SANTIAGO, A. T. T. **Análise cromatográfica do perfil dos ácidos graxos de azeites do cultivar arbequina produzidos na região da campanha-RS**. 2019. TCC (Bacharel em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal do Pampa, Bagé, 2019.

SCHOLZ, P.; KECK, C. M. Nanoemulsions produced by rotor-stator high speed stirring. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 482, p. 110-117, 2015.

SILVA, C. M.; BORBA, T. M.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. Carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* using raw glycerol as an additional carbon source. **International Journal of Food Engineering**, v. 8, p. 18-15, 2012.

SILVA, J.; SILVA, F. L. H.; SANTOS, S. F. M.; RIBEIRO, J. E. S.; MEDEIROS, L. L.; FERREIRA, A. L. O. Biomass and lipid production by yeast *Rhodotorula mucilaginosa* using cassava waste water as the substrate. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, p. 2017145, 2018.

SILVA, M. C. **Alterações na biossíntese de carotenoides em leveduras induzidas por agentes químicos.** Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

SINGH, D.; GUPTA, A.; WILKENS, S. L.; MATHUR, A. S.; TULI, D. K.; BARROW, C. J.; PURI, M. Understanding response surface optimisation to the modeling of Astaxanthin extraction from a novel strain *Thraustochytrium sp.* **Algal Research**, v. 11, p. 113-120, 2015.

SONG, N.; PEI, H.; HU, W.; MA, G. Evaluation of the potential of 10 microalgal strains for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 141, p. 245-251, 2013.

SPIER, F.; BUFFON, J. G.; BURKERT, C. A. V. Bioconversion of raw glycerol generated from the synthesis of biodiesel by different oleaginous yeasts: lipid content and fatty acid profile of biomass. **Indian Journal of Microbiology**, v. 55, p. 415-422, 2015.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 24, p. 345-351, 2003.

STRATI, I. F.; OREOPOULOU, V. Process optimisation for recovery of carotenoids from tomato waste. **Food Chemistry**, v. 129, p. 747-752, 2011.

STRINGHETA, P. C.; NACHTIGALL, A. M.; OLIVEIRA, T. T.; RAMOS, A. M.; SANT'ANA, H. M. P.; GONÇALVEZ, M. P. J.C. Luteína: propriedades antioxidantes e benefícios à saúde. **Alimentos e Nutrição**, v.17, p. 229-238, 2006.

TANG, S.; DONG, Q.; FANG, Z.; CONG, W.; ZHANG, H. Microbial lipid production from rice straw hydrolysates and recycled pretreated glycerol. **Bioresource Technology**, v. 312, p. 123280, 2020.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROSZEVALLOS, L.; BYRNE, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 669-675, 2006.

TIMOTHEO, A. C. **Avaliação de métodos de lise celular das leveduras *yarrowia lipolytica* QU21 e *meyerozyma guilliermondii* BI281 para extração de óleo microbiano**.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; LUCCIO, M. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, p. 2429-2436, 2009.

VÁZQUEZ, R. M. R.; MARTÍNEZ, S. R.; GARRE, V. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 22-27, 2009.

VICENTE, G.; BAUTISTA, L. F.; RODRÍGUEZ, R.; GUTIÉRREZ, F. J.; SÁDABA, I.; VÁZQUEZ, R. M. R.; MARTÍNEZ, S. R.; GARRE, V. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 22-27, 2009

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 1481 p

WEI, M.; PARRISH, C. C.; GUERRA, N. I.; ARMENTA, R. E.; COLOMBO, S. M. Extracted microbial oil from a novel Schizochytrium sp. (T18) as a sustainable high DHA source for Atlantic salmon feed: Impacts on growth and tissue lipids. **Aquaculture**, v. 534, p. 736249, 2021.

WYNN, J.P., RATLEDGE, C. **Microbial production of oils and fats, in Food Biotechnology**. 2. ed. Cambridge: Food Sci. Technol, 2005. 443-472 p.

XIÃO, A.; NI, H.; CAI, H.; LI, L.; SU, W.; YANG, Q. An improved process for cell disruption and astaxanthin extraction from *Phaffia rhodozyma*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25. P. 2029-2034, 2009.

XU, W. J.; ZHAI, J. W.; CUI, Q.; LIU, J. Z.; LUO, M.; FU, Y. J.; ZU, Y. G. Ultra-turrax based ultrasound-assisted extraction of five organic acids from honeysuckle (Lonicera japonica Thunb.) and optimization of extraction process. **Separation and Purification Technology**, v. 116, p. 73- 82, 2016.

YANG, S., WANG, W., WEI, H., VAN WYCHEN, S., PIENKOS, P.T., ZHANG, M., HIMMEL, M.E. Comparison of nitrogen depletion and repletion on lipid production in yeast and fungal species. **Energies**, v. 9, p. 1-12, 2016.

YARA-VARÓN, E.; FABIANO-TIXIERA, A. S.; BALCELLS, M.; CANELAGARAYOA, R., BILY, A.; CHEMAT, F. Is it possible to substitute hexane with green solvents for extraction of carotenoids? A theoretical versus experimental solubility study. **RSC Advances**, v. 6, p. 27750-27759, 2016.

YU, Y.; XU. Z.; CHEN, S.; JIN, M. Microbial lipid production from dilute acid and dilute alkali pretreated corn stover via *Trichosporon dermatis*. **Bioresource Technology**, v. 295, p. 122253, 2020.

ZARAGOZA, M. F. **Bioavailability of carotenoids incorporated into processed foods: bread and mayonnaise**. 2015. Trabalho de conclusão de curso (Faculdade de Medicina) Universidade de Lleida Faculdade de Medicina, 2015.