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

ÓLEO MICROBIANO DE *Rhodotorula mucilaginosa*: OTIMIZAÇÃO DE UMA TÉCNICA VERDE DE EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO ÓLEO, BIOMASSA INTEGRAL E RESIDUAL

THALLITA CORDEIRO DE JESUS

Profa. Dra. Janaína Fernandes de Medeiros Burkert
Orientadora

Dra. Andressa Cunha Lemos
Co-Orientadora

Rio Grande, RS
2025

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

ÓLEO MICROBIANO DE *Rhodotorula mucilaginosa*: OTIMIZAÇÃO DE UMA TÉCNICA VERDE DE EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO ÓLEO, BIOMASSA INTEGRAL E RESIDUAL

THALLITA CORDEIRO DE JESUS

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

Profa. Dra. Janaína Fernandes de Medeiros Burkert
Orientadora

Dra. Andressa Cunha Lemos
Co-Orientadora

Rio Grande, RS
2025

J58o

Jesus, Thallita Cordeiro de
Óleo microbiano de *rhodotorula mucilaginosa*: otimização de uma técnica verde de extração, caracterização parcial do óleo, biomassa integral e residual / Thallita Cordeiro de Jesus.. - 2026.
99f.

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. Andressa Cunha Lemos

1. Engenharia e Ciência de Alimentos. 2. Coprodutos agroindustriais. 3. Extração sustentável. 4. Levedura oleaginosa. 5. Otimização. 6. Solvente verde. I. Burkert, Janaína Fernandes de Medeiros. II. Lemos, Andressa Cunha. III. Título.

CDU 664

Catalogação na fonte: Bibliotecária Brenda Sequeira CRB10/1979

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Thallita Cordeiro de Jesus.e aprovada em 25 de julho de 2025, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:

Documento assinado digitalmente
gov.br
JANAINA FERNANDES DE MEDEIROS BURKERT
Data: 12/05/2026 09:21:51-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profª Drª Janaína Fernandes de Medeiros Burkert - FURG

Documento assinado digitalmente
gov.br
LARINE KUPSKI
Data: 07/05/2026 13:54:32-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profª Drª Larine Kupski - FURG

Documento assinado digitalmente
gov.br
JOSILENE LIMA SERRA PEREIRA
Data: 03/03/2026 11:10:51-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profª Drª Josilene Lima Serra Pereira - IFMA

RESUMO

A levedura *Rhodotorula mucilaginosa* é biotecnologicamente valiosa para a produção simultânea de carotenoides e lipídios, com ampla aplicação na indústria. Seu rápido crescimento e capacidade de metabolizar substratos de baixo custo contribuem para a viabilidade de cultivos microbianos. No entanto, a produção de biomoléculas ocorre intracelularmente e a seleção do método de ruptura celular físico, químico e/ou enzimático é determinante para a aplicação dos bioprodutos, em função da toxicidade de alguns solventes e materiais empregados e não permitidos na indústria alimentícia e farmacêutica. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o óleo microbiano rico em carotenoides a partir do cultivo de *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688 em meio agroindustrial, avaliando técnicas de extração verde voltadas para o aproveitamento do óleo, biomassa integral e residual. Para isso, *R. mucilaginosa* CCT 7688 foi cultivada em frascos agitados contendo 70 g L^{-1} de melaço de cana-de-açúcar e 3,4 g L^{-1} de água de maceração de milho, incubada por 144 h a 25 °C e 180 rpm. A biomassa obtida foi submetida à extração lipídica pelo método de Bligh & Dyer e também por solventes verdes, avaliando diferentes métodos de ruptura celular. A concentração máxima de biomassa foi de $12{,}18 \pm 1{,}33$ g L^{-1}, e a concentração de carotenoides alcançou 847,6 µg L^{-1} ($72{,}90 \pm 7{,}44$ µg g^{-1}) em 144 h de cultivo. A técnica de ruptura com esferas de aço resultou em teores lipídicos de 2,5 a 9,4%, enquanto a aplicação de moinho de facas promoveu incremento de aproximadamente 23% na recuperação de lipídios. A concentração de HCl utilizada na ruptura química não demonstrou diferença significativa ($p > 0{,}05$) na recuperação lipídica. Para otimização do processo utilizando extrações com solventes verdes (acetato de etila, etanol e ácido acético), foi aplicado um delineamento *Plackett-Burman* com 12 ensaios, seguido por um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com 27 ensaios. A condição otimizada e validada com 0,1 g de biomassa, 5 mL do volume da mistura (ácido acético, etanol, acetato de etila (2/20/30 v v v^{-1}), 0,5 mL de água destilada, 2 mL de acetato de etila, 3 min de vórtex, centrifução a 3000 rpm por 3 min e 1 re-extração resultou em uma recuperação lipídica de $26{,}0 \pm 1{,}7$%, resultados comparáveis à condição controle (metanol:clorofórmio). O óleo microbiano obtido apresentou um perfil de ácidos graxos predominantemente composto por ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) (~53%) e poli-insaturados (PUFAs) (~23%). A biomassa integral apresentou teor proteico de $16{,}0 \pm 1{,}0$%, enquanto a residual foi de $10{,}34 \pm 0{,}19$%. A fração de proteínas solúveis na biomassa integral indicou predominância de albuminas ($35{,}2 \pm 1{,}5$ mg g^{-1}), seguidas por gluteninas ($21{,}58 \pm 0{,}21$ mg g^{-1}) e globulinas ($16{,}1 \pm 0{,}4$ mg g^{-1}), sugerindo potencial para aplicação em bebidas proteicas e suplementos nutricionais. A caracterização da biomassa incluiu análise termogravimétrica (TGA) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), nas quais se observaram alterações morfológicas na biomassa após o uso do moinho de facas. Os resultados demonstraram que a ruptura celular (moinho de facas) combinada a extração com solventes verdes representou uma alternativa ao método de Bligh & Dyer (metanol e clorofórmio), possibilitando de forma segura o aproveitamento integral e residual da biomassa, além de reduzir o impacto ambiental e permitir aplicações em indústrias alimentícias e farmacêuticas.

Palavras-chave: Coprodutos Agroindustriais. Extração Sustentável. Levedura Oleaginosa. Otimização. Solvente Verde.

ABSTRACT

MICROBIAL OIL FROM *Rhodotorula mucilaginosa*: OPTIMIZATION OF A GREEN EXTRACTION TECHNIQUE, PARTIAL CHARACTERIZATION OF THE OIL, INTEGRAL AND RESIDUAL BIOMASS

The yeast *Rhodotorula mucilaginosa* is biotechnologically valuable for the simultaneous production of carotenoids and lipids, with wide application in industry. Its rapid growth and ability to metabolize low-cost substrates contribute to the viability of microbial cultures. However, biomolecule production occurs intracellularly, and the selection of the physical, chemical, and/or enzymatic cell disruption method is decisive for the application of bioproducts, due to the toxicity of some solvents and materials used and not permitted in the food and pharmaceutical industries. Thus, the objective of this study was to characterize the carotenoid-rich microbial oil from the cultivation of *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688 in agroindustrial medium, evaluating green extraction techniques aimed at the utilization of the oil, whole biomass, and residual biomass. For this purpose, *R. mucilaginosa* CCT 7688 was cultivated in shaking flasks containing 70 g L^{-1} of sugarcane molasses and 3.4 g L^{-1} of corn steep liquor (corn maceration water), incubated for 144 h at 25 °C and 180 rpm. The obtained biomass was subjected to lipid extraction using the Bligh & Dyer method and also using green solvents, evaluating different cell disruption methods. The maximum biomass concentration was 12,18 ± 1,33 g L^{-1}, and the carotenoid concentration 847,6 µg L^{-1} (72,90 ± 7,44 µg g^{-1}) in 144 h of cultivation. The steel bead disruption technique resulted in lipid contents of 2.5 to 9.4%, while the application of a knife mill promoted an increase of approximately 23% in lipid recovery. The concentration of HCl used in chemical disruption did not show a significant difference ($p > 0.05$) in lipid recovery. To optimize the process using green solvent extractions (ethyl acetate, ethanol, and acetic acid), a *Plackett-Burman* design with 12 trials was applied, followed by a Central Composite Rotational Design (CCRD) with 27 trials. The optimized and validated condition with 0.1 g of biomass, 5 mL of mixture volume (acetic acid/ethanol/ethyl acetate (2/20/30 v v v^{-1}), 0.5 mL of distilled water, 2 mL of ethyl acetate, 3 min of vortexing, centrifugation at 3000 rpm for 3 min, and 1 re-extraction resulted in a lipid recovery of 26,0 ± 1,7%, results comparable to the control condition (methanol: chloroform). The microbial oil obtained had a fatty acid profile predominantly composed of monounsaturated fatty acids (MUFAs) (~53%) and polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (~23%). The whole biomass had a protein content of 16,0 ± 1,0%, while the residual biomass was 10,34 ± 0,19%. The soluble protein fraction in the whole biomass indicated a predominance of albumins (35,2 ± 1,5 mg g^{-1}), followed by glutenins (21,58 ± 0,21 mg g^{-1}) and globulins (16,1 ± 0,4 mg g^{-1}), suggesting potential for application in protein drinks and nutritional supplements. Biomass characterization included thermogravimetric analysis (TGA) and scanning electron microscopy (SEM), which revealed morphological changes in the biomass after the use of the knife mill. The results demonstrated that cell disruption (knife mill) combined with green solvent extraction represented an alternative to the Bligh & Dyer method (methanol and chloroform), safely enabling the complete and residual utilization of biomass, in addition to reducing environmental impact and allowing applications in the food and pharmaceutical industries.

Keywords: Agroindustrial Co-Products. Green solvent. Oleaginous yeast. Optimization. Sustainable extraction

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Conteúdo lipídico produzidos por leveduras em diferentes substratos. 18
Tabela 2 - Produção de carotenoides por diferentes cepas microbianas..... 25
Tabela 3- Variáveis e níveis para o delineamento *Plackett-Burman*..... 45
Tabela 4- Variáveis e níveis para o DCCR..... 45
Tabela 5 - Parâmetros do cultivo de *R. mucilaginosa* cultivada em meio agroindustrial (70 g L^{-1} de melaço de cana-de-açúcar e 3,4 g L^{-1} de água de maceração de milho) por 144 h 55
Tabela 6 - Testes de ruptura química..... 56
Tabela 7 - Conteúdo lipídico com diferentes condições de ruptura mecânica com esferas de aço inoxidável usando extração com metanol e clorofórmio..... 59
Tabela 8 - Conteúdo lipídico com diferentes condições de ruptura mecânica usando diferentes solventes de extração. 61
Tabela 9 - Níveis codificados e valores reais (entre parênteses) do *Plackett Burman* e conteúdo lipídico como resposta. 63
Tabela 10 - Efeitos estimados utilizando o conteúdo lipídico como variável dependente com análise de curvatura. 64
Tabela 11 - Níveis codificados e valores reais (entre parênteses) do DCCR 2^4 com 27 ensaios. 67
Tabela 12 - Resultados do coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP), valor t, valor *p*..68
Tabela 13 - Análise de variância (ANOVA) do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)..... 69
Tabela 14 - Perfil de ácidos graxos do óleo da levedura *R. mucilaginosa*. 72
Tabela 15 - Estabilidade do óleo de *Rhodotorula mucilaginosa* ao armazenamento..... 77
Tabela 16 - Composição proximal da biomassa integral e residual de *R. mucilaginosa*..... 79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da estrutura de alguns lipídios a) representa a estrutura de um triacilglicerol, b) a estrutura de uma bicamada lipídica e c) estrutura de um lipossomo 14
Figura 2 - Estrutura dos carotenos a) β-caroteno e b) γ-caroteno e das xantofilas c) luteína e d) astaxantina. 21
Figura 3 - Esquema da rota metabólica da síntese de carotenoides. 23
Figura 4 - Esquema simplificado da moagem de grãos de milho..... 27
Figura 5 - Processamento de cana-de-açúcar. 28
Figura 6 - Levedura *Rhodotorula mucilaginosa*. 29
Figura 7 - Representação esquemática das etapas desenvolvidas neste estudo..... 35
Figura 8 - Esquema geral do processo de ruptura celular. 38
Figura 9 - Fluxograma de ruptura celular com HCl 2,4 M e extração com hexano e etanol do Ensaio 1 39
Figura 10 - Fluxograma de ruptura celular com HCl 2,4 M e extração com metanol e clorofórmio do Ensaio 2 40
Figura 11 - Etapa de Ruptura celular com esferas de aço inoxidável usando diferentes proporção de biomassa:esfera (g g^{-1}) e extração com Bligh & Dyer..... 41
Figura 12 - Diferentes métodos mecânicos para a ruptura celular e extração com Bligh & Dyer e com a metodologia baseada em Wittenhofer *et al.* (2024). 42
Figura 13 - Acompanhamento do cultivo de *R. mucilaginosa* utilizando meio agroindustrial. 52
Figura 14 - Lipídios antes (a) e após (b) a evaporação do solvente 58
Figura 15 - Aspecto visual da extração após ruptura com esferas de aço inoxidável a) tubo contendo solvente b) após a retirada do solvente 60
Figura 16 - Curvas de contorno da recuperação de lipídios: a) biomassa versus volume da mistura, b) biomassa versus acetato de etila c) volume da mistura versus acetato de etila. As variáveis: tempo de vórtex, tempo de centrifugação, velocidade da centrifugação e nº de extrações foram fixas no ponto central..... 70
Figura 17 - a) ^{1}H RMN do óleo extraído de *R. mucilaginosa* b) ^{1}H RMN do triacilglicerol.. 74
Figura 18 - Cromatograma representativo da determinação de β-caroteno em óleo de *R. mucilaginosa*: a) análise cromatográfica do óleo b) padrão β-caroteno de referência 76
Figura 19 - Microscopia de varredura da parede celular da biomassa de *R. mucilaginosa*. a, b, c: biomassa integral. d, e, f : biomassa pré-tratada. g, h, i: biomassa residual 81
Figura 20 - Perfil de decomposição térmica da biomassa de *R. mucilaginosa*. 82

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 11

2. OBJETIVOS 13
2.1 OBJETIVO GERAL 13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 13

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 14
3.1 LIPÍDIOS 14
3.1.1 Lipidos em alimentos 15
3.1.2 Lipidios microbianos 17
3.2 CAROTENOIDES 21
3.2.1 Carotenoides microbianos 24
3.3 *Rhodotorula mucilaginosa* 28
3.4 TÉCNICAS DE RECUPERAÇÃO DE LIPÍDIOS E CAROTENOIDES MICROBIANOS 33

4. MATERIAIS E MÉTODOS 35
4.1 MICRORGANISMO, MANUTENÇÃO E REATIVAÇÃO 35
4.2 PREPARO DO PRÉ-INÓCULO E INÓCULO 35
4.3 CULTIVO 36
4.4 ACOMPANHAMENTO DO CULTIVO 36
4.5 AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO LIPÍDICA SOB DIFERENTES CONDIÇÕES 38
4.5.1 Testes preliminares de ruptura celular 38
4.5.1.1 Ruptura química 38
4.5.1.1 Ruptura mecânica 39
Ruptura com esferas de aço inoxidável 39
Ruptura com diferentes métodos mecânicos 40
4.5.2 Determinação de lipídios por Bligh & Dyer – método controle 42
4.5.3 Determinação de lipídios com extração por Wittenhofer *et al*. (2024) 43
4.5.3.1 Extração usando acetato de etila, etanol e ácido acético 43
4.5.3.2 Extração usando hexano e isopropanol 43
4.6 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS POR SOLVENTES VERDES 44
4.6.1 Delineamento experimental *Plackett-Burman* 44
4.6.2 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 45
4.6.3 Validação das Condições Otimizadas pelo DCCR 45
4.7 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO MICROBIANO 46
4.7.1 Perfil de ácidos graxos 46
4.7.2 Ressonância magnética nuclear (RMN) 47
4.7.3 Índice de acidez e peróxido por titulometria 47
4.7.4 Carotenoides totais no óleo microbiano 47
4.7.5 Identificação de carotenoides no óleo 48
4.7.6 Acompanhamento da coloração do óleo durante o armazenamento 48
4.8 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA INTEGRAL E RESIDUAL 49
4.8.1 Composição proximal 49
4.8.2 Análise termogravimétrica (TGA) 50
4.8.3 Microscopia de varredura (MEV) 50

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA 51

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 52
5.1 CRESCIMENTO MICROBIANO 52
5.2 EXTRAÇÃO LIPÍDICA 55
5.2.1 Testes preliminares de ruptura 55
5.2.1.1 Ruptura química 55
5.2.1.2 Ruptura mecânica 58
Ruptura com esferas de aço inoxidável 58
Ruptura da parede celular com diferentes tratamentos e diferentes solventes 60
5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 63
5.3.1 Plackett-Burman 63
5.3.2 Análise de efeitos principais 63
5.3.3 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 63
5.3.4 Validação Experimental 72
5.4 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO MICROBIANO 72
5.4.1 Perfil de ácidos graxos 73
5.4.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 75
5.4.3 Determinação e identificação de β-caroteno no óleo 77
5.4.4 Estabilidade do óleo de *Rhodotorula mucilaginosa* ao armazenamento 78
5.5 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA INTEGRAL E A RESIDUAL 78
5.5.1 Composição proximal 79
5.5.2 Microscopia de varredura (MEV) 81
5.5.3 Análise termogravimétrica (TGA) 82

6. CONCLUSÃO 83

RESÍDUOS GERADOS E DESTINO 84

SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS 85

REFERÊNCIAS 86

1. INTRODUÇÃO

Os sistemas tradicionais de produção de alimentos enfrentam desafios crescentes. Crises humanitárias, pandemias e sobretudo mudanças climáticas estão dificultando a oferta de alimentos básicos e nutricionais (Ritchie; Reay; Higgins, 2018). Diante disso, organizações internacionais como a ONU (2015) (Organização das Nações Unidas) e a OMS (Organização Mundial da Saúde), têm reforçado a necessidade de desenvolver modelos mais sustentáveis para a produção de alimentos (FDA, 2015; OMS 2018).

Nesse contexto, a OMS (2018) lançou um plano (*Replace*) baseado em cinco estratégias, com o objetivo de encerrar a produção industrial de gorduras *trans*, pois estão associadas ao aumento das doenças cardiovasculares. O objetivo do plano é regulamentar a presença das gorduras *trans* nos alimentos, substituindo-as por lipídios mais saudáveis e por fim erradicando seu uso na indústria. No Brasil, a ANVISA (2019) dispôs a RDC 332/2019, restringindo a presença de gordura *trans* nos alimentos a até 2 g/100 g, mas, em 2022, essa resolução foi revogada (RDC nº 632, de 24/03/2022) e a partir de janeiro de 2023 não deveriam mais ser produzidos e/ou comercializados alimentos que contenham óleos parcialmente hidrogenados.

Como forma de atender a essa demanda e proporcionar soluções mais sustentáveis, a biotecnologia oferece uma solução: a produção de bioprodutos por meio de bioprocessos. Os bioprocessos possibilitam o uso de fontes não convencionais, como insetos e plantas, em especial, biomassas produzidas por microrganismos, na formulação de alimentos (Doughty *et al*., 2024). Microrganismos são uma alternativa sustentável para a produção de alimentos porque exigem menos recursos, geram menor impacto ambiental e não requerem grandes áreas de cultivo. Além disso, apresentam rápido crescimento celular e as condições de cultivo como temperatura e pH são facilmente controladas, além de dispensar o uso de inseticidas, herbicidas e pesticidas, como ocorre na produção de óleos de origem vegetal (Sawangkeaw; Ngamprasertsith, 2013).

Os óleos e gorduras são consumidos mundialmente. A produção de óleos vegetais, por exemplo, excedeu 200 milhões de toneladas, com um mercado estimado em U$ 200 milhões em 2024 (Lee *et al*., 2022; Zio *et al*., 2025). Por fazerem parte da dieta humana e serem essenciais nutricionalmente, existe uma demanda por novas fontes de óleo, principalmente óleos nutricionalmente ricos.

Diante desse cenário, esses bioprodutos, especialmente os lipídios microbianos, surgem como alternativa à substituição dessas gorduras *trans*. Entre os microrganismos estudados para

essa finalidade, as leveduras oleaginosas têm destaque, pois são capazes de metabolizar diferentes fontes de carbono e nitrogênio (Rafiq *et al*., 2023), acumulando compostos como lipídios, principalmente na forma de triacilgliceróis. Além da produção lipídica, as biomassas microbianas resultantes do processo de extração apresentam componentes importantes como, proteínas, carboidratos, minerais e outros compostos. Essa composição torna a biomassa integral ou residual um ingrediente com potencial para aplicações em alimentos bem como em formulações funcionais, contribuindo para a valorização do processo biotecnológico.

Dentre as leveduras de grande importância biotecnológica, o gênero *Rhodotorula* em particular *R. mucilaginosa*, principal classe desse gênero se destaca pela capacidade de produzir lipídios e carotenoides simultaneamente (Rodrigues *et al*., 2024), além de metabolizar diversos coprodutos agroindustriais de baixo custo, como melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho. O uso desses substratos não somente reduz os custos de cultivo, como também promovem a valorização dos coprodutos agroindustriais (Rodrigues *et al*., 2019).

No entanto, devido a produção de lipídios e carotenoides microbianos ocorrer de forma intracelular, a sua recuperação se torna um desafio, pois os métodos tradicionais de extração, frequentemente utilizam solventes tóxicos, como metanol e clorofórmio o que impossibilita sua aplicação em alimentos. Portanto, para tornar esse processo mais sustentável, têm sido estudadas técnicas de extração verde, que utilizam solventes alternativos, como etanol e acetato de etila (Wittenhofer *et al*., 2024; Tsirigka *et al*., 2022), em substituição aos solventes tóxicos tradicionalmente usados. Além disso, técnicas de ruptura celular mecânica, como moagem com facas e moagem com esferas de aço inoxidável, são estudadas quanto a sua eficiência na liberação de bioprodutos, eliminando o uso de rupturas químicas.

Nesse contexto, o presente trabalho propôs uma abordagem alternativa para a recuperação de bioprodutos oriundos de *R. mucilaginosa*, utilizando métodos físicos de ruptura celular combinados com solventes verdes. Além disso, a caracterização físico-química tanto do óleo quanto da biomassa integral e residual (após a extração verde do óleo), tornou-se essencial para viabilizar a aplicação desses bioprodutos em formulações alimentícias e nutracêuticas, conforme preconizado nos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 15 e 17. Assim, essa pesquisa contribui para o desenvolvimento de novos modelos de produção alimentar alinhados aos ODS, especialmente no que diz respeito ao reaproveitamento de resíduos, à redução de impactos ambientais e à promoção de alimentos mais saudáveis (ONU, 2015).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Obter e caracterizar o óleo microbiano rico em carotenoides a partir do cultivo de *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688 em meio agroindustrial, empregando técnicas de extração verdes e avaliando características do óleo da biomassa integral e residual.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir biomassa microbiana utilizando coprodutos agroindustriais;
- Avaliar estratégias de ruptura celular para extração de óleo microbiano com solventes verdes;
- Otimizar um método para extração de óleo rico em carotenoides utilizando solventes menos tóxicos;
- Investigar a composição proximal das biomassas microbianas antes e após a recuperação do óleo rico em carotenoides;
- Caracterizar o óleo produzido por *Rhodotorula mucilaginosa* obtido via abrasão com moinho de facas e solventes verdes.

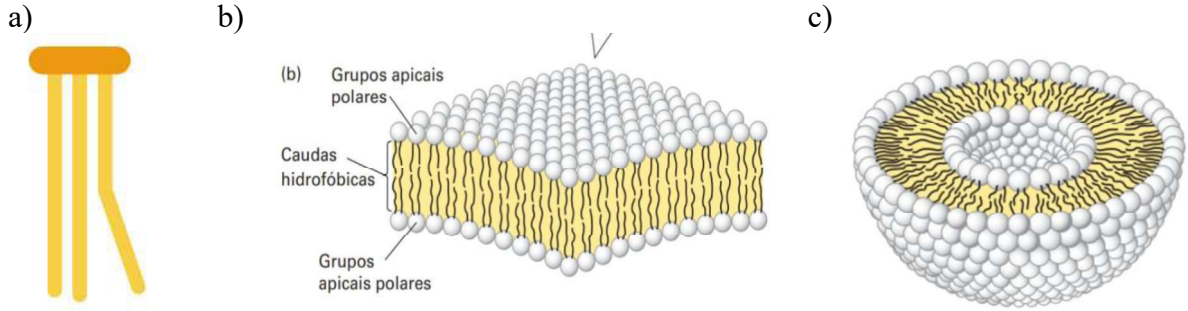
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. LIPÍDIOS

Os lipídios compõem um grupo diversificado de moléculas cuja principal característica é a insolubilidade em água. São solúveis em solventes apolares como éter e clorofórmio. A maior parte das gorduras naturais é composta por até 99% de triacilgliceróis, e a grande maioria desses é de cadeia longa. Sua função central é o armazenamento de energia sob a forma de gorduras e óleos, enquanto esteróis e fosfolipídios desempenham papéis estruturais nas membranas biológicas. Também funcionam como isolantes térmicos, atuam como cofatores enzimáticos, pigmentos que absorvem luz, agentes emulsificantes no sistema digestivo e têm funções hormonais (Fonseca-Alaniz *et al*., 2006; Jorge, 2009; Nelson; Cox, 2022; Yao *et al*., 2020).

Os óleos e gorduras são derivados de ácidos graxos, que são hidrocarbonetos com cadeias variando de 4 a 36 carbonos, que após ingestão, são oxidados a CO2 e H2O, fornecendo duas vezes mais energia (9 kcal/g) que os carboidratos e as proteínas (Lowery, 2004). Portanto, são essenciais para a manutenção e bom funcionamento das células. Em alguns ácidos graxos a cadeia não é ramificada e é totalmente saturada, e em outros, a cadeia contém uma ou mais ligações duplas (Nelson; Cox, 2022). A Figura 1 mostra a representação de algumas estruturas lipídicas.

Figura 1 - Representação da estrutura de alguns lipídios. a) representa a estrutura de um triacilglicerol, b) a estrutura de uma bicamada lipídica e c) estrutura de um lipossomo



Fonte: adaptado de Lodish (2005)

Em termos de funcionalidade, algumas moléculas (esqualeno, precursor do colesterol) podem atuar como antioxidantes, auxiliando na fotoproteção da pele (Amarowicz, 2009), eliminando os radicais livres e impedindo a passagem de raios ultravioleta (Voet; Voet, 2013).

Devido à natureza hidrofóbica dos lipídios, uma das suas principais funções é atuar como barreiras biológicas, pois a insolubilidade em água evita a entrada dessa molécula para dentro das células, o que confere uma estrutura mais rígida à parede celular (Gurr; Harwood, 1991), sendo os glicerofosfolipídios as principais classes de lipídios responsáveis por essas estruturações (Amarowicz, 2009).

A classificação dos lipídios distingue os lipídios apolares ou neutros dos polares. Os primeiros são ésteres de ácidos graxos com álcoois, como ceras, glicerídeos, carotenoides e esteróis. Os lipídios polares têm outras funções químicas além da ligação éster do ácido graxo e álcool. Os representantes desse grupo são os fosfolipídios e esfingolipídios (Jorge, 2009). Em geral, misturas complexas de lipídios são separadas por diferenças na polaridade ou na solubilidade em solventes apolares (Nelson; Cox, 2022).

A polaridade é o que confere aos lipídios a capacidade de formar bicamadas (formadas principalmente por fosfolipídios) (Figura 1) (Lenaz, 1979), pois esta é responsável pela hidratação das moléculas, através da passagem de água, induzida pela tensão da membrana, de extrema importância na estrutura celular (Reddy; Warshaviak; Chachisvilis, 2012). Essa propriedade permite que as estruturas lipídicas tenham duas extremidades, apolares (afinidade à água) e polares (repelem água), portanto, ao mesmo tempo que são insolúveis em água, os lipídios também são solúveis em solventes orgânicos (Alberts, 2017).

Nos estudos de Lowery (2004) e Ağagündüz *et al*. (2023). Os autores buscaram compreender outros papéis dos lipídios além das suas funções estruturais e biológicas. De acordo com os autores, os lipídios ou gorduras, como é conhecido popularmente, tem efeito benéfico ao organismo, uma vez que alguns lipídios, principalmente os ácidos graxos como o linoleico e ômega 6 não são produzidos pelo corpo humano e precisam ser consumidos através da dieta alimentar. Para Ağagündüz *et al*. (2023), uma dieta rica em ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) permite que o organismo tenha maior sensibilidade à insulina, as células respondem melhor a essa sensibilidade e consequentemente o metabolismo da glicose é mais efetivo, mesmo fato observado por Lowery (2004).

3.1.1 Lipidos em alimentos

Os lipídios estão presentes na dieta humana na forma de óleos e gorduras vegetais e/ou animais (Chen *et al*., 2023); em geral, esses lipídios são mais fáceis de serem encontrados e metabolizados pelo organismo. A definição de “óleo” ou “gordura” é dada de acordo com o

estado físico dessas moléculas em temperatura ambiente (25 °C), líquido ou sólido, respectivamente (Ramalho; Suarez, 2013), e pela composição de ácidos graxos presentes na cadeia (Kent, 2003).

Os compostos de oxidação desses ácidos graxos, contribuem com características sensoriais de certos produtos alimentícios como textura e sabor (Chen *et al*., 2023). Para isso, é crucial compreender o comportamento dos lipídios nos alimentos, assim, pode-se retardar o processo de oxidação e prolongar a vida útil do produto.

No estudo investigativo de Liu *et al*. (2025) os autores buscaram compreender como o aquecimento influenciava os compostos aromáticos decorrentes da oxidação lipídica da carne bovina. Segundo os autores, os triacilgliceróis foram considerados os lipídios com maior associação aos odores da carne. Esses compostos secundários que incluem aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos foram associados a odores como gordura oxidada, papelão e odores herbáceos, considerados desagradáveis pelos consumidores, mesma característica observada por Dinh *et al*. (2021) para carnes que sofreram algum tipo de aquecimento. Entretanto, Dinh *et al*. (2021) atribuíram os compostos voláteis desejáveis da carne à presença de ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados, como o ácido oleico e o ácido linoleico. Diante disso, é interessante caracterizar os óleos obtidos de fontes não convencionais, como os óleos microbianos.

Em geral, os óleos e gorduras usados na formulação de alimentos são obtidos de fontes convencionais, como soja, sementes oleaginosas, carne, ovos, leite e seus derivados. As propriedades emulsionáveis desses óleos e gorduras podem ser aplicadas na indústria de panificação, confeitaria, para formulação de sorvetes, emulsões e molhos (Rios *et al*., 2014), pois conferem estabilidade e palatabilidade a esses produtos (Jia-Wei *et al*., 2025).

Para garantir a estabilidade oxidativa, e aumentar a vida de prateleira desses óleos e gorduras, as indústrias alimentícias aplicam diversas técnicas para alcançar esse objetivo. Uma das principais técnicas aplicadas em óleos é o processo de hidrogenação (Kent, 2003). Esse processo consiste na saturação das ligações duplas por meio da adição de hidrogênio na molécula (Jia-Wei *et al*., 2025), e tem como produto resultante, a margarina. Assim, obtêm-se gorduras sólidas mais limpas e com ponto de fusão mais alto ao mesmo tempo que retarda o processo de oxidação e aumenta a vida útil do óleo (Wongjaikham *et al*., 2022).

Os processos de hidrogenação são realizados parcialmente, pois sua totalidade tende a deixar as gorduras mais resistentes, o que acaba limitando sua aplicação em alimentos (Jia-Wei *et al*., 2025). Contudo, a hidrogenação parcial pode acarretar a formação de gorduras do tipo

trans (Wongjaikham *et al*., 2022), consideradas prejudiciais à saúde, por estarem associadas a doenças cardiovasculares.

Diante disso, fontes alternativas de lipídios que substituam óleos e gorduras, principalmente hidrogenados e potencialmente prejudiciais à saúde, são estudadas visando à sua aplicação na indústria alimentícia (Silva *et al*., 2023).

3.1.2 Lipidios microbianos

A presença de ácidos graxos do tipo *trans* em alimentos tem despertado preocupação por órgãos governamentais sendo um assunto bastante discutido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2018). Estudos têm demonstrado que o consumo de gorduras trans causam efeitos nocivos ao corpo humano, como aumento dos níveis de colesterol das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), consideradas “ruins” ao organismo, (Mensink; Katan, 1990) e doenças crônicas, como hipertensão e diabetes (Gebauer; Baer, 2023).

Segundo o Dietary Guidelines Advisory Committee., 2005 (Comitê Consultivo de Diretrizes Dietéticas dos EUA), o consumo diário de gorduras do tipo trans não deveria ultrapassar 1%. Por isso, há aproximadamente 5 anos, a OMS lançou um pacote de ações chamado *Replace* visando ajudar a acelerar o uso e consumo de gorduras e óleos mais saudáveis.

No Brasil, a ANVISA (2019) (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) publicou a resolução RDC nº 632, de 24/03/2022, que bane o uso de gorduras trans em toda e qualquer matriz alimentícia, a partir de janeiro de 2023. Nos Estados Unidos a gordura trans para aplicações alimentícias é proibida desde 2018, pois está associada a doenças cardiovasculares quando consumida em excesso, segundo Food and Drug Administration (FDA, 2023). Diante disso, o mercado enfrenta desafios para substituir os óleos e gorduras hidrogenados por fontes mais saudáveis e que agregam propriedades funcionais aos alimentos (FDA, 2023; ANVISA, 2019).

Como alternativa à substituição das gorduras trans, destacam-se os lipídios microbianos, também conhecidos como óleos unicelulares (SCOs) (Robles-Iglesias *et al*., 2023). Microrganismos considerados oleaginosos são aqueles capazes de acumular mais de 20% de seu peso na forma de lipídios (Sineli *et al*., 2022) e geralmente armazená-los no interior das células. O acúmulo desses lipídios ocorre em condições de excesso de carbono e limitação de

nitrogênio, situação que induz um redirecionamento do metabolismo celular para a síntese de lipídios (Rafiq *et al*., 2023).

Diversos microrganismos têm sido estudados quanto à sua capacidade de produzir e acumular lipídios, com destaque para as leveduras. Esses microrganismos se destacam por apresentarem alta taxa de crescimento em uma ampla variedade de substratos (Shaigani *et al*., 2021). A Tabela 1 destaca algumas espécies de leveduras produtoras de lipídios cultivadas em diferentes substratos.

Conforme apresentado na Tabela 1, *Yarrowia lipolytica* ATCC 20177 destacou-se pelo maior teor de lipídios (70,13%), quando cultivada em biorreator de 5 L utilizando glicerol bruto e óleo residual de cozinha como substratos, em condições controladas de temperatura (30 °C) e agitação (200 rpm) Mitrea *et al.* (2022), bem como , *Rhodotorula glutinis* BCRC 22360 que obteve 60,70% de lipídios quando cultivada em óleo residual de cozinha, sob temperatura 24 °C e com faixa de agitação entre 200 a 500 rpm (Yen *et al*., 2019).

Tabela 1 - Conteúdo lipídico produzidos por leveduras em diferentes substratos.

Leveduras	Conteúdo lipídico (%)	Condições de cultivo	Substratos	Referência
Y. lipolytica ATCC 20177	70,13	Cultivo em biorreator de 5L por 192 h a 30 °C e 200 rpm	Glicerol bruto e óleo residual de cozinha	Mitrea *et al.* (2022)
R. glutinis BCRC 22360	60,70	Cultivo em biorreator de 5L por 180 h a 24 ºC, agitação na faixa de 200 a 500 rpm e aeração de 1 vvm.	Óleo residual de cozinha	Yen *et al*. (2019)
R. glutinis	46,00	Cultivo realizado em frascos agitados de 250 mL por 144 h	Águas residuais de alimentos	Lei *et al.* (2024)
Apiotrichum dulcitum PR27	45,3	Cultivo em agitador com aeração (200 rpm + 2 vvm) a 25 °C por 144 h	Resíduos de vinhaça industrial	Díaz *et al.* (2023)
R. mucilaginosa CCT 7688	42,90	Cultivo em batelada alimentada usando coprodutos agroindustriais por 240 h e aplicação de led verde (50 µmol m^{-2} s^{-1})	Melaço de cana e água de maceração de milho.	Rodrigues *et al.* (2024)
R. mucilaginosa CCT 7688	43,20	Cultivo à base de coprodutos agroindustriais e 144 h de cultivo	Glicerol bruto, melaço de cana e água de maceração de milho.	Rodrigues *et al.* (2022)
Rhodotorula paludigena CM33	37,65	Cultivo em batelada alimentada por 7 dias a 30 °C com fluxo de ar de 0,7 vvm	Glicerol bruto	Sriphuttha *et al.* (2023)
R. mucilaginosa	35,17	Cultivo em frascos agitados de 500 mL a 180 rpm e 25 ºC por 168h + aplicação de campo magnético	Meio YM	Silva (2021)
Rhodotorula glutinis	28,89	Cultivo em biorreator de 5L por 144 h a 20 °C e agitação constante (200 rpm + 2 vvm)	Água residual de batata	Gientka *et al.* (2022)

YM: *Yeast Malt*

Outras espécies, como *R. glutinis* e *Apiotrichum dulcitum* PR27, apresentaram teores intermediários de lipídios, variando de 46,00% a 45,3%, quando cultivadas em águas residuais e resíduos da vinificação, respectivamente.

Em estudos com *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688, observaram-se teores lipídicos de 42,90% e 43,20% ao utilizar coprodutos agroindustriais, como melaço de cana e água de maceração de milho (Rodrigues *et al*., 2024). A cepa *Rhodotorula paludigena* CM33 apresentou 37,65% de lipídios a partir de glicerol bruto em batelada alimentada por 168 h (Sriphutthikul *et al*., 2022).

Outros teores foram reportados em trabalhos com *R. mucilaginosa* cultivada em meio YM (Silva, 2021) que apresentou 35,17% e 28,89% em *R. glutinis* cultivada em águas residuais de batata (Gientka *et al*., 2022). Esses resultados evidenciam que a escolha do substrato, aliada às condições de cultivo, exerce influência na capacidade de produção de lipídios pelas leveduras, visto que os substratos são responsáveis por fornecer às leveduras quantidades de nutrientes necessárias para o acúmulo de biomoléculas.

Além disso determinadas condições como razão entre carbono e nitrogênio (C/N), temperatura e pH (Kot *et al.*, 2017) são modificadas para maximizar essa produção. A razão C/N foi estudada por Osorio-González *et al*. (2023) como parâmetro importante para maximizar a produção de lipídios. O estudo avaliou a influência de diferentes concentrações de carbono e nitrogênio no acúmulo de lipídios pela levedura *Rhodosporidium toruloides* -1588, usando uma mistura de dois hidrolisados de madeira como substrato, um contendo glicose e o outro xilose, tendo sidos cultivadas em agitador por 176 h. Foram avaliadas razões C/N de 20, 70 e 120 e proporções de glicose:xilose de 1:1, 1:2 e 2:1, respectivamente. As razões C/N de 20 e 120 não apresentaram diferença e obtiveram uma redução no acúmulo de lipídios. A razão C/N de 70 produziu o maior rendimento lipídico (40 %) sob razão inicial de glicose:xilose de 1:1.

Contrapondo o estudo de Osorio-González *et al*. (2023), Lopes *et al*. (2020) alcançaram maior rendimento lipídico na biomassa cultivada em xilose como fonte de carbono e razão C/N de 120, obtendo 0,6 g g^{-1} para a levedura *Rhodotorula toruloides,* tendo sido cultivada em frascos de agitados por 96 h. Portanto os dados evidenciam que a relação entre carbono e nitrogênio tem forte influência na síntese lipídica.

Outro ponto que favorece o uso e aplicação de óleos microbianos é a similaridade com óleos vegetais (Kot *et al.*, 2019). O perfil lipídico de óleo de levedura apresenta composição semelhante à do azeite de oliva (Arrieira *et al.*, 2024), com predominância de ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e poli-insaturados (PUFAs) (Nunes *et al.*, 2024). Além disso, o

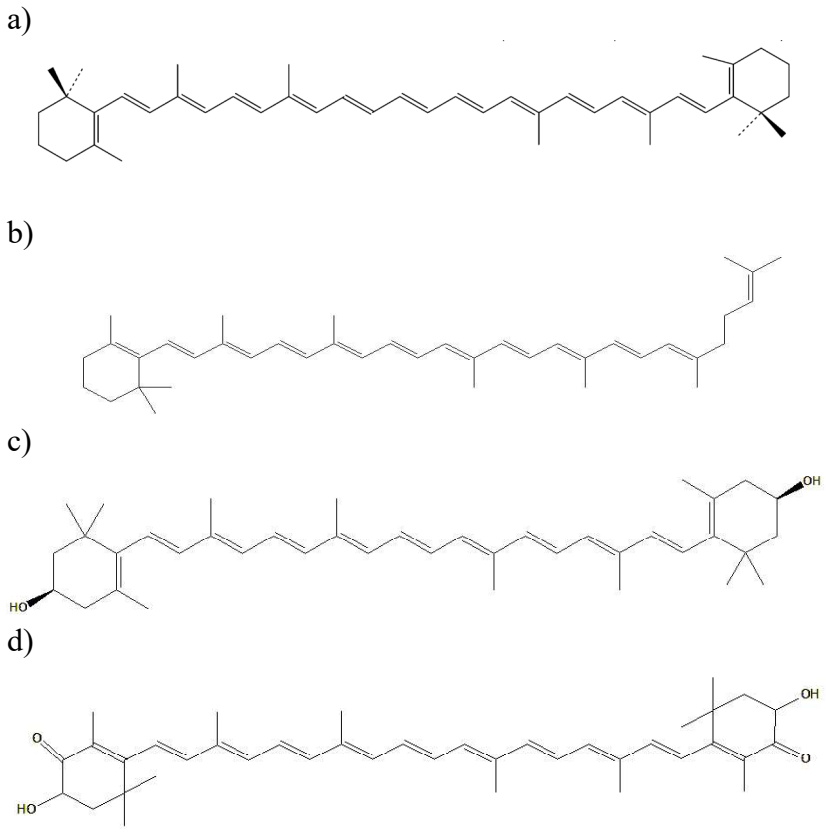
óleo produzido pela levedura *R. mucilaginosa* é explorado devido à presença natural de carotenoides, pigmentos que desempenham função antioxidante e que podem atuar como precursores da vitamina A. Essa composição confere ao óleo características nutricionais importantes e de alto valor agregado com potencial de aplicação nas indústrias de alimentos, cosméticos e fármacos.

3.2. CAROTENOIDES

Os carotenoides são pigmentos naturais produzidos por flores, frutos, sementes, fungos, leveduras e microalgas (Mapelli-Brahm *et al*., 2023; Paul *et al*., 2023; Rodriguez-Amaya *et al*., 2008). São lipossolúveis e precursores de substâncias importantes para o organismo, por isso são considerados compostos bioativos com propriedades diversas (Rodríguez-Concepción; Welsch, 2020).

Os carotenoides são formados por unidades de isopreno (C5) (Voet; Voet, 2013), contendo quarenta carbonos em sua estrutura básica (tetraterpeno) (Figura 2).

Figura 2 - Estrutura dos carotenos a) β-caroteno e b) γ-caroteno e das xantofilas c) luteína e d) astaxantina.



A presença apenas de carbono e hidrogênio em sua cadeia os define como carotenos (α-caroteno, β-caroteno, toruleno e licopeno), ou xantofilas (luteína, zeaxantina, violaxantina e neoxantina), quando há um constituinte oxigenado (Generalić *et al*., 2023). São pigmentos fotossintéticos e absorvem a luz, refletindo-a nos tons amarelo, laranja e vermelho, podendo ser observados em faixas de comprimento de onda entre 400 e 500 nm (Udensi *et al*., 2022).

Alimentos como vegetais, frutas, sementes e grãos concentram grandes quantidades de carotenoides, que podem aumentar à medida que esses alimentos amadurecem. Em humanos, não há produção de carotenoides, por isso a principal fonte de acesso é através da alimentação ou suplementação. No organismo, quando ingeridos, são degradados por enzimas digestivas (lipases), absorvidos pelas paredes intestinais e armazenados em micelas para posterior envio aos tecidos (Nelson; Cox 2022). Sua bioacessibilidade é maior quando estão dispersos em matrizes oleosas, para isso, parâmetros como tamanho das partículas, características físico-químicas, processo de digestibilidade e estabilidade devem ser analisados (Rahman *et al*., 2024).

Em geral, a suplementação de carotenoides é sintética, e são amplamente utilizados na indústria por oferecerem alta intensidade de cor além de serem de baixo custo (Dey; Nagababu, 2022). Entretanto, estudos tem mostrado que o uso excessivo está frequentemente associado à doenças, incluindo as mais comuns como alergias (Amchova; Siska; Ruda-Kucerova, 2024) alterações cognitivas em crianças, associados ao uso do amarelo de quinolina, e os corantes Vermelho 40, Amarelo 5 e Amarelo 6 associados aos efeitos carcinogênicos (Dey; Nagababu, 2022), além de alterações hematológicas e desencadeamento de processos inflamatórios no organismo.

Portanto, a substituição por corantes naturais torna-se uma alternativa viável uma vez que os corantes naturais possuem compostos bioativos como ação antioxidante e antimicrobiana (Paul; Kumari; Siddiqui, 2023), atuam na prevenção da foto-oxidação e nos alimentos podem contribuir com a coloração, substituindo corantes sintéticos potencialmente prejudiciais à saúde (Benbelkhir; Medjekal, 2022). Além disso, o β-caroteno, precursor do retinol (forma ativa da vitamina A), é um hormônio importante para o crescimento e regulação de processos celulares específicos, como reparação e controle interno dos tecidos (O'Connor; Varshosaz; Moise, 2022).

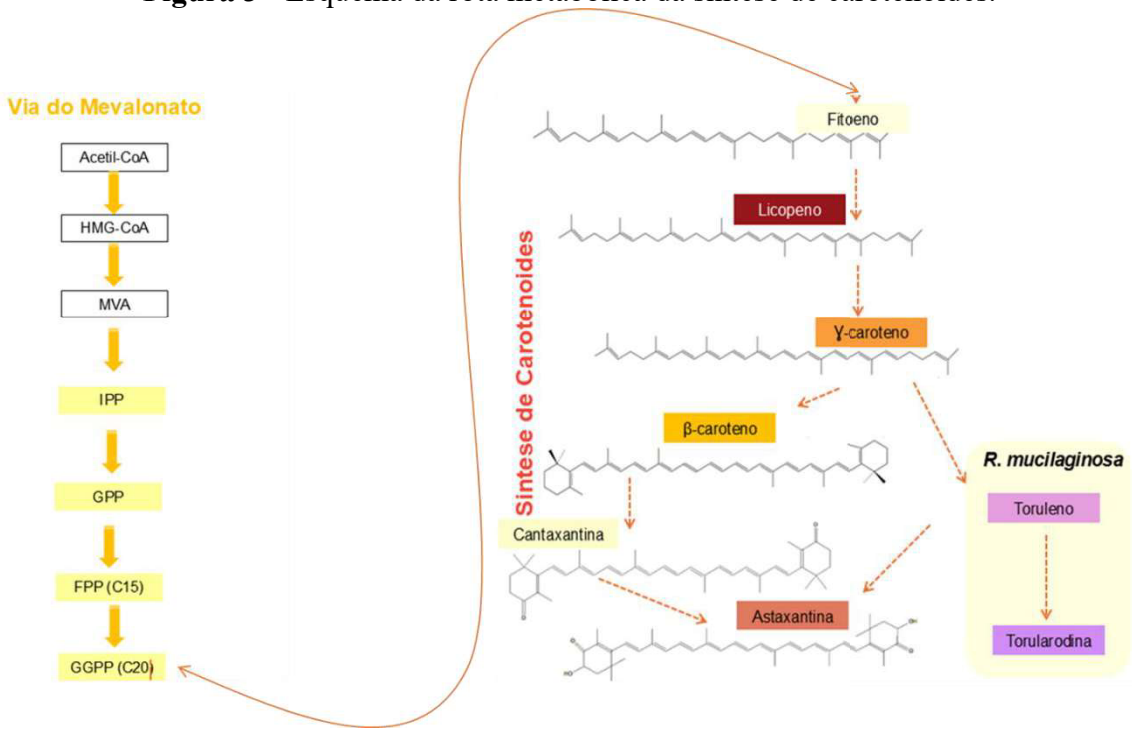
O banco de dados de carotenoides (CAROTENOIDS DATABASE, 2020), fornece informações de mais de 1.117 carotenoides provenientes de mais de 600 fontes (Yabuzaki, 2017). Esses carotenoides em sua maioria são tetraterpenos C40, que podem ser clivados na

oxidação por ação da luz de forma química (por ação de agentes oxidantes, como peróxidos) ou biológica (ação de enzimas) (Nagao, 2004).

De acordo com o relatório da empresa indiana Mordor Intelligence, o mercado de carotenoides até o ano de 2024 estava avaliado em US$ 1,84 bilhão e crescimento anual de 4,64%, englobando diversas áreas de aplicação (suplementos dietéticos, corantes alimentares, ração animal, produtos farmacêuticos e cosméticos). Os carotenoides comercialmente interessantes incluem astaxantina, β-caroteno, luteína e zeaxantina (Generalić Mekinić *et al.*, 2023).

Em microrganismos, os carotenoides, assim como os lipídios, são sintetizados a partir da degradação de fontes de carbono, em geral presentes nos meios de cultivo. A degradação do carbono gera um precursor importante no processo de acúmulo de lipídios e carotenoides pelas leveduras, o acetil-CoA (Embrapa, 2007). A biossíntese de carotenoides segue a via do mevalonato (Figura 3), também derivada do acetil-CoA. Nessa rota, três moléculas de acetil-CoA são condensadas para formar ácido mevalônico, que é convertido em isopentenil pirofosfato (Miziorko, 2011), unidade básica para a formação dos isoprenoides (Matsumoto *et al.*, 2022).

Figura 3 - Esquema da rota metabólica da síntese de carotenoides.



Ao final do ciclo metabólico os carotenoides convertidos apresentam coloração intensa, como β-caroteno, toruleno e torularodina, os quais são típicos de leveduras do gênero *Rhodotorula* (Ochoa-Viñals *et al.*, 2024). E são esses pigmentos que exercem funções

fotoprotetoras, eles protegem os constituintes celulares contra os efeitos oxidativos, como ação da luz.

Já a síntese de ácidos graxos é iniciada pela conversão do acetil-CoA em malonil-CoA, catalisada pela acetil-CoA carboxilase (Ahn *et al.*, 2023). A origem de diferentes cadeias de ácidos graxos é dada pelo alongamento da cadeia carbônica. Estes ácidos graxos são então esterificados com glicerol, formando triacilgliceróis (TAGs), que se acumulam em gotículas lipídicas. A produção lipídica é geralmente intensificada em condições de excesso de carbono e limitação de nitrogênio (alta razão C/N) (Sailwal *et al.*, 2023), quando o metabolismo celular é redirecionado para o armazenamento de lipídios.

Neste âmbito, a produção de carotenoides por leveduras, em especial, do gênero *Rhodotorula* surge como uma alternativa viável para a produção de óleos microbianos ricos em carotenoides.

3.2.1 Carotenoides microbianos

Em organismos unicelulares como as leveduras, a fotoproteção permite o acúmulo de carotenoides entre as membranas celulares. Em resposta a esse mecanismo de defesa, as leveduras tendem a produzir pigmentos mais intensos quando há excesso de exposição à luz ou estresse oxidativo para evitar possíveis danos (Li *et al*., 2022), em contrapartida se forem submetidos a instabilidades tendem a ser altamente suscetíveis em contanto com o oxigênio ou outros fatores externos como temperatura altas ou metais pesados (Generalić Mekinić *et al*., 2023).

Diferentes cepas de leveduras têm demonstrado a produção de carotenoides (Tabela 2) e a *R. mucilaginosa* tem se destacado com resultados promissores para a formação desses pigmentos. O mercado de carotenoides é crescente e a cada ano a população vem buscando novas fontes de substâncias com propriedades funcionais. Empresas como Kemin Industries (Estados Unidos), Algatech Ltd. (Israel), BASF SE (Alemanha), Chr. Hansen Holdings A/S (Dinamarca) e Allied Biotech Corporation (Alemanha) são referência no mercado de carotenoides (Future Market Insights (2022). Segundo Viana *et al*. (2024), os carotenoides produzidos pela microalga *Dunaliella* sp., tem estimativa de alcance até o ano de 2028 de U$ 122,9 milhões de dólares. Diante desse mercado promissor, a obtenção de carotenoides por microrganismos carotenogênicos tem sido evidenciada (Paul; Kumari; Siddiqui, 2023).

Tabela 2 - Produção de carotenoides por diferentes cepas microbianas

Levedura	Carotenoides volumétricos ($\mu g\ L^{-1}$)	Carotenoides específicos ($\mu g\ g^{-1}$)	Substratos	Referência
R. mucilaginosa CCT 7688	1068,50	93,90	YM	Cipolatti *et al*. (2019)
R. mucilaginosa CCT 7688	1248,50	152,50	AMM e MCA	Rodrigues *et al.* (2019)
R. mucilaginosa CCT 7688	623,07	96,20	MS	Pacheco (2025)
Pichia fermentans CCT 7677	201,60	19,30	AMM e Glicerol	Cipolatti *et al*. (2019)
Pichia fermentans	640,00	54,07	APA e MCA	Otero *et al.* (2019)
Phaffia rhodozyma	1189,81	167,66	YM + CM	Silva (2020)
Sporidiobolus pararoseus CCT 7689	830,30	68,10	AMM e MCA	Cipolatti *et al*. (2019)
Sporiodiobolus pararoseus	905,30	122,82	YM	Otero *et al.* (2019)
Sporidiobolus pararoseus CCT 7689	326,90	114,83	YM	Pacheco (2025)
Sporidiobolus pararoseus CCT 7689	1152,00	114,83	AMM, MCA + CM	Silva (2025)

YM: *Yeast Malt;* AMM: água de maceração do milho; MCA: melaço de cana de açúcar; APA: água de parboiliação do arroz; MS: melaço de soja
CM: campo magnético

O uso dos coprodutos agroindustriais como melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho têm se mostrado promissor como meios alternativos de fontes de carbono e nitrogênio. Rodrigues *et al*. (2022) otimizou a produção de lipídios no cultivo da levedura R. *mucilaginosa* CCT 7688, em um meio composto com 70 g L^{-1} de melaço de cana de açúcar e 3,4 g L^{-1} de água de maceração de milho com razão C/N inicial do meio de produção de 143,6, alcançando rendimento lipídico de 43,2% e teve como concentração volumétrica e específica de carotenoides de 1794,2 µg L^{-1} e 121,4 µg g^{-1}, respectivamente, durante 144 h.

Como mostrado na Tabela 2, diferentes espécies e condições de cultivo resultam em rendimentos bastante variados de carotenoides, tanto em termos volumétricos (µg L^{-1}) quanto específicos (µg g^{-1}).

Entre as leveduras, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Phaffia rhodozyma* se destacam por apresentarem maiores produtividades, podendo ultrapassar valores de 1000 µg L^{-1} (Cipolatti *et al*., 2019; Silva, 2020). *R. mucilaginosa* CCT 7688, por exemplo, alcançou 1248,5 µg L^{-1} quando cultivada em melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho (Rodrigues *et al*., 2019), enquanto *P. rhodozyma* obteve 1189,81 µg L^{-1} em meio contendo extrato de levedura e aplicação de campo magnético (Silva, 2020).

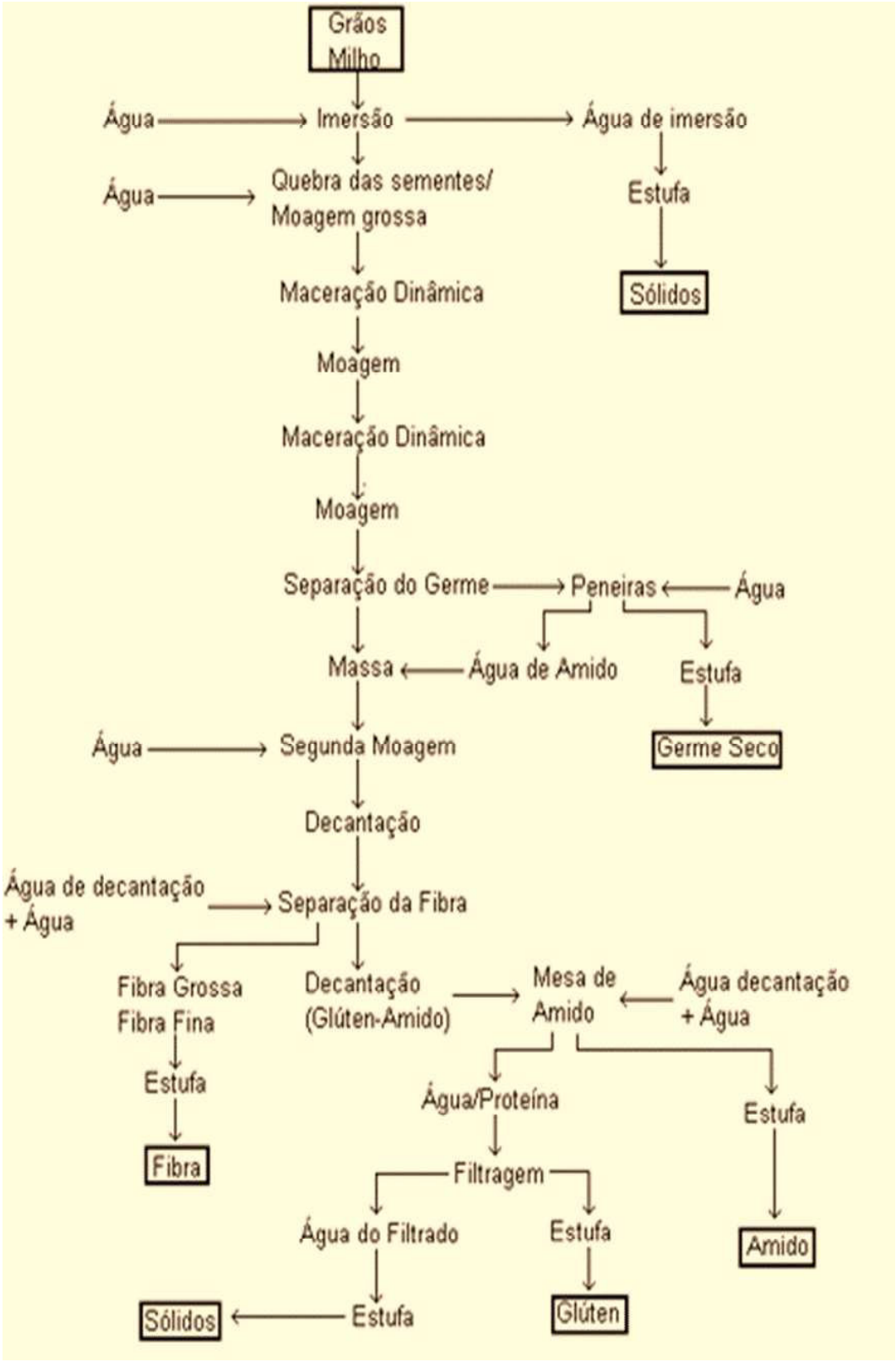
Substratos agroindustriais, como água de parboilização do arroz (APA), melaço de cana-de-açúcar (MCA), água de maceração do milho (AMM) e melaço de soja (MS), têm sido amplamente explorados por seu baixo custo e pela capacidade de fornecer carbono, nitrogênio e minerais em proporções que favorecem o metabolismo microbiano. Esses substratos não apenas reduzem os custos do processo, mas também promovem a valorização de coprodutos da agroindústria, alinhando-se aos princípios de economia circular e sustentabilidade.

A água de maceração ou água de imersão, por exemplo, é a água resultante logo após o amolecimento dos grãos de milho. O seu uso designado como coproduto, está atribuído ao fato dessa água carregar muitos compostos, como açúcares, aminoácidos livres, ácidos orgânicos, vitaminas do complexo B e minerais (Hull *et al*., 1996) o que a torna um produto de valor agregado.

Semelhantemente, o melaço de cana-de-açúcar também é considerado um coproduto, devido ao valor agregado atrelado a presença de vitaminas, sais minerais (ferro, cálcio, magnésio), aminoácidos e compostos fenólicos (Farmani *et al.*, 2025). E ambos compreendem uma fonte alternativa aos substratos convencionais.

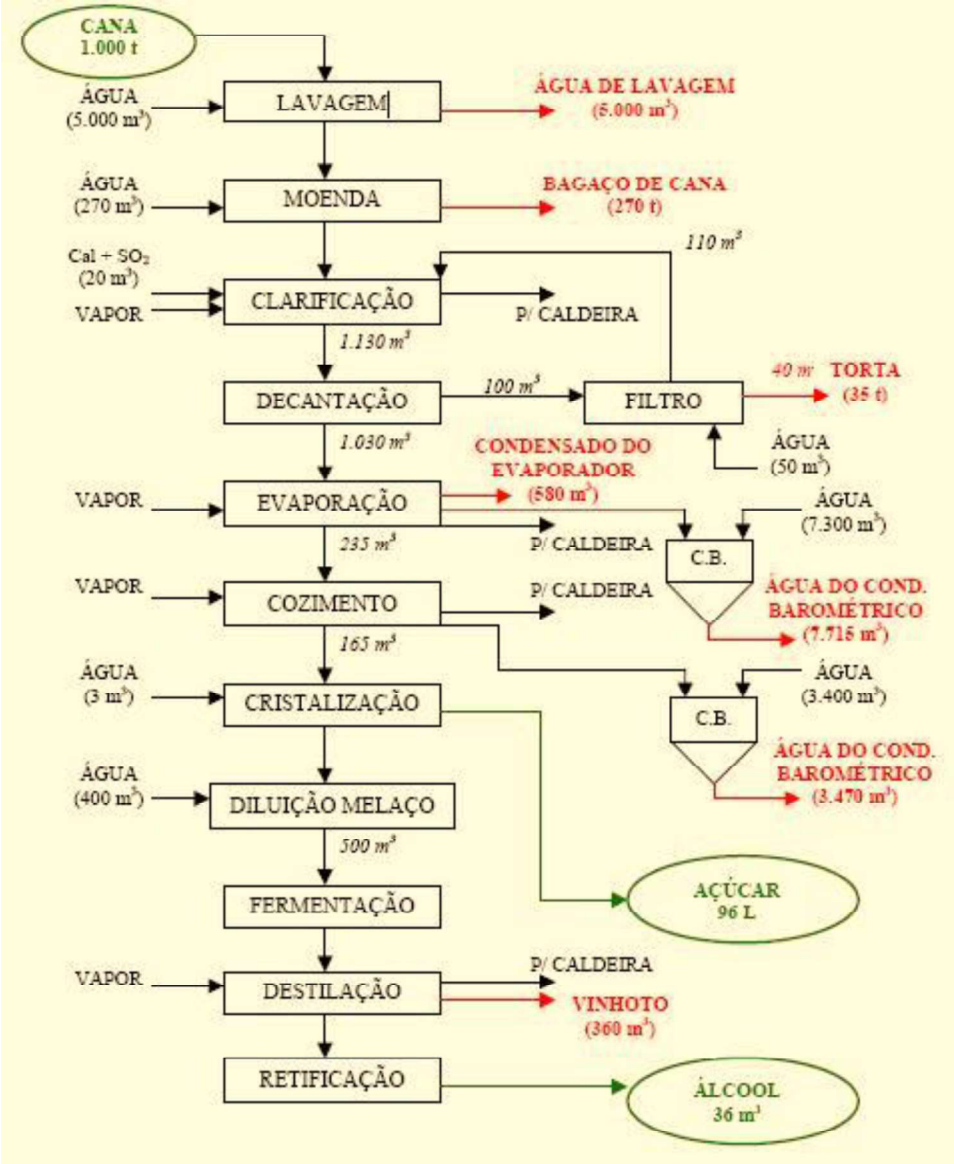
O processo de obtenção da água de maceração de milho e melaço de cana de açúcar é demonstrado na Figura 4 e 5, respectivamente

Figura 4 - Esquema simplificado da moagem de grãos de milho



Fonte: Lopes Filho (1999)

Figura 5 - Processamento da cana-de-açúcar.



Fonte: CETESB (2002)

3.3. *Rhodotorula mucilaginosa*

Dentre as leveduras produtoras de lipídios e carotenoides, destaca-se o gênero *Rhodotorula*. *R. mucilaginosa*, principal espécie desse gênero, é encontrada facilmente no solo, água doce, superfícies e ambientes costeiros, tem elevada taxa de crescimento, podendo se desenvolver em diferentes meios de cultivo (Li *et al*., 2022). A levedura *R. mucilaginosa* possui particularidades, dentre elas, a formação de compostos lipossolúveis denominados carotenoides. É uma levedura basidiomiceta (Yeeh, 1999) que forma colônias de coloração

vermelho-coral ou laranja-dourada (Figura 6), principais características visuais dessas leveduras. Seu metabolismo energético é oxidativo, por isso tende a acumular esses bioativos para evitar sua fotodegradação.

Figura 6 - Levedura *Rhodotorula mucilaginosa*.



A levedura *R. mucilaginosa* quando cultivada pode apresentar um rendimento de até 40% no acúmulo de lipídios intracelulares a partir da assimilação de diversos substratos. Diante da escassez de recursos naturais e necessidade por novas fontes lipídicas e carotenogênicas, trabalhos científicos têm concentrado seus esforços para obter bioprodutos de leveduras oleaginosas a partir de diferentes substratos (Tabela 1 e Tabela 2). Para tal feito, pesquisadores tem buscado estabelecer uma relação de custo-benefício, seja otimizando os processos e/ou utilizando substratos de baixo custo para concentrar biomassa rica em lipídios e carotenoides.

O melaço, bagaços e águas residuais são ricos em nutrientes, e por isso, são substratos interessantes para o cultivo da *R. mucilaginosa* visando a produção de lipídios. Alguns autores têm destacado a viabilidade e crescimento da *R. mucilaginosa* em diferentes meios de cultivo contendo coprodutos, a fim de obter o melhor rendimento de bioprodutos.

Diferentes linhagens de leveduras foram isoladas de biomas do Rio Grande do Sul, Brasil, e três microrganismos foram isolados como potenciais produtores de carotenoides por Otero *et al.* (2019). Dentre estes, a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688, usada neste estudo, isolada de flores em Encruzilhada do Sul - RS no sul do Brasil, mais precisamente na região do Bioma do Escudo Sul-Rio-Grandense. Cultivada em frascos agitados para produção

de carotenoides, durante 168 h, a 25 ºC, em meio extrato de malte e levedura (YM) com razão C/N de 6,20 teve identificada a produção de β- criptoxantina. Para reduzir os custos de produção, resíduos agroindustriais foram utilizados, com a mesma razão C/N que o meio YM, na formulação do meio A (39,91 g L^{-1} de água de arroz parboilizada e 17,31 g L^{-1} de glicerol bruto) e o meio B (44,01 g L^{-1} água de arroz parboilizada e 23,6 g L^{-1} melaço de cana-de-açúcar). O meio A apresentou a maior concentração de biomassa de 12,49 g L^{-1}, enquanto o meio B maior concentração de carotenoides de 360 μg L^{-1} (30,16 μg g^{-1}).

A mesma linhagem continuou sendo avaliada por Cipolatti *et al*., (2019), quanto ao seu potencial para a produção de carotenoides utilizando diferentes meios de cultivo à base de outros coprodutos agroindustriais. Nesse estudo, a levedura foi cultivada durante 168 h, a 25 °C, em frascos agitados, sob uma razão C/N de 6,20. Três formulações de meio foram testadas: (M1) água de maceração de milho e glicerol bruto; (M2) água de maceração de milho e melaço de cana-de-açúcar e YM. Os resultados mostraram que o meio YM apresentou a maior produção de carotenoides totais, atingindo 1068,5 μg L^{-1} (93,9 μg g^{-1}), seguido pelo meio M1 com 224 μg L^{-1} (68,1 μg g^{-1}), e pelo meio M2, com 150 μg L^{-1} (55,7 μg g^{-1}). Em todas as condições experimentais, o carotenoide majoritário identificado foi o β-caroteno seguido da luteína. O extrato carotenogênico desta levedura também mostrou interessante atividade antioxidante.

Rodrigues *et al*. (2019) otimizou a produção de carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688, utilizando dois planejamentos experimentais, alcançando no meio em batelada contendo 70 g L^{-1} de melaço de cana e 3,4 g L^{-1} de água de maceração de milho (razão C/N de 143,6) as maiores concentrações de carotenoides 1248 μg L^{-1} (152,5 μg g^{-1}) e com concentração de biomassa de 7,9 g L^{-1}, em 144 h, a 180 rpm e 25 °C. Este estudo também avaliou a produção em batelada alimentada com diferentes estratégias de alimentação com 30 g L^{-1} de melaço de cana-de-açúcar e 6,5 g L^{-1} de água de maceração de milho, atingindo uma produção total de carotenoides de 3726 μg L^{-1} e uma concentração de biomassa de 16 g L^{-1}.

Rodrigues *et al.* (2022) expandiu o potencial de *R. mucilaginosa* CCT 7688 na produção simultânea de lipídios e carotenoides em meios à base de subprodutos agroindustriais, ou seja, a obtenção de um óleo microbiano rico em carotenoides. Quatro combinações diferentes de modos de cultivo (batelada e batelada alimentada) e substratos alternativos (glicerol bruto, melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho) foram testadas. O ensaio M2-B, que compreende o uso de um meio à base de subprodutos agroindustriais sem qualquer suplementação (70 g L^{-1} de melaço de cana-de-açúcar e 3,4 g L^{-1} de água de maceração de milho) e o modo batelada otimizado previamente para produção de carotenoides por Rodrigues

et al. (2019), foi selecionado como o mais promissor para a produção de ambos os compostos. A produção total de carotenoides e o teor total de lipídios foram de 1794,2 μg L^{-1} e 43,2% (p/p), respectivamente, após 144 h de cultivo. O perfil de ácidos graxos apresentou predominância de ácido oleico (69,9%) e ácido palmítico (23,2%). Assim, esta cepa de levedura pode ser utilizada com sucesso na produção simultânea de lipídios e carotenoides, sendo seu perfil de ácidos graxos semelhante ao encontrado no azeite de oliva.

Rodrigues *et al*. (2024) investigou os efeitos de diferentes cores (azul, verde, vermelho e branco) e intensidades de LED (50 e 100 μmol m^{-2} s^{-1}) no conteúdo lipídico e na produção de carotenoides. A luz não foi um fator limitante para o crescimento e a biossíntese de carotenoides, mas a intensidade luminosa causou um aumento significativo na produção de carotenoides por *R. mucilaginosa* CCT 7688. A intensidade luminosa de 50 μmol m^{-2} s^{-1} afetou positivamente a produção de carotenoides em todas as cores estudadas, principalmente nas luzes verde e vermelha, cujas porcentagens de produção aumentaram 93 e 95%, respectivamente, em comparação com o ensaio sem iluminação. No entanto, a intensidade inadequada pode inibir a levedura de produzir ambas as biomoléculas. Neste estudo, uma redução muito significativa na produção com intensidade luminosa de 100 μmol m^{-2} s^{-1} inibiu a produção de carotenoides e lipídios em ambas as cores verde e vermelha. Neste processo, a maior produção de carotenoides foi obtida em LED vermelho, 3497,7 μg L^{-1}, em 192 h a 50 μmol m^{-2} s^{-1}, com teor lipídico de 32,1% (5,6 g L^{-1}), e o perfil lipídico encontrado foi principalmente de ácido oleico (47,4%) e ácido palmítico (27,2%). Sob iluminação LED verde, uma produção de carotenoides semelhante, 3473,0 μg L^{-1}, foi obtida, mas em 72 h, a 50 μmol m^{-2} s^{-1}, um teor lipídico superior a 42,9% (6,9 g L^{-1}) foi obtido na mesma condição; o perfil lipídico encontrado foi principalmente de ácido oleico (49,3%) e ácido palmítico (24,7%).

Rodrigues *et al.* (2025) estudou a cinética da biossíntese lipídica por *R mucilaginosa* CCT 7688 em meio agroindustrial previamente definido com 70 g L^{-1} de melaço de cana-de-açúcar e 3,4 g L^{-1} de água de maceração de milho, em batelada e batelada alimentada. O principal ácido graxo encontrado ao longo do cultivo foi o ácido oleico (média de 60 a 78%), seguido pelo ácido palmítico (média de 14 a 24%), em ambos os meios de produção. O perfil de ácidos graxos encontrado por este estudo não se alterou consideravelmente ao longo do cultivo e foi semelhante ao perfil de ácidos graxos essenciais do azeite de oliva, predominantemente os ácidos oleico (76,3%) e palmítico (17,9%) em 120 h de cultivo em batelada, tendo teor de lipídios de 46,7% (6,4 g L^{-1}) em 120 h.

Arrieira *et al.* (2024) objetivaram avaliar diferentes métodos de recuperação de óleo microbiano rico em carotenoides (OMRC) produzido por *R. mucilaginosa*, em condições previamente definidas de cultivo, com coprodutos agroindustriais renováveis para a obtenção de oleogéis à base de cera de carnaúba. O método convencional de Bligh & Dyer foi selecionado, pois este sistema manteve a estabilidade da cor. O OMRC extraído apresentou 41,1 μg g^{-1} de carotenoides totais e um teor de lipídios de 23,8%. Oleogéis à base de OMRC ou azeite de oliva (sistema de controle) e cera de carnaúba nas concentrações de 2,5, 5, 7,5 e 10% foram caracterizados e seu potencial de aplicação em sistemas alimentares foi destacado. Como resultado, o OMRC apresentou um perfil lipídico majoritariamente de ácido oleico (54,7%), ácido palmítico (17,8%) e ácido linoleico (16,1%). Quanto aos oleogéis que foram formulados com o OMRC e a cera de carnaúba como agente estruturante, os autores perceberam que o aumento da concentração do agente estruturante resultou na formação de uma rede cristalina capaz de imobilizar a fase oleosa, sugerindo que os oleogéis são um potencial substituto às gorduras *trans*, tendo características ideais (sendo semi-sólido e apresentando estabilidade visual para serem usados em produtos alimentícios como os de panificação e confeitaria, pois conferem textura macia e cremosa a esses alimentos.

Como observado, os lipídios e carotenoides microbianos são produzidos de forma intracelular, e considerando que a recuperação desses bioprodutos é uma etapa importante do processo, a escolha do método adequado é essencial para tornar a extração mais eficiente.

Santiago *et al.* (2024) por exemplo, estudou a otimização de dois métodos de ruptura celular, ou seja, homogeneização de alta velocidade (Ultra-turrax) e plasma frio para recuperar eficientemente lipídios microbianos de *R. mucilaginosa* CCT 7668. Em meio previamente definido por Rodrigues *et al.* (2022) para a produção de lipídios a 25 °C, 180 rpm por 144 h. Diferentes pré-tratamentos da biomassa (úmida, seca e/ou congelada) foram avaliados, onde 7,0% do teor de lipídios e 0,50 g L^{-1} de lipídios totais resultaram do uso de biomassa seca e congelada. Uma metodologia de planejamento experimental foi aplicada para estudar as seguintes variáveis razão biomassa:solvente (0,3:100–1,2:100), tempo de operação (0,6–7,4 min) e velocidade de rotação (9280–22720 rpm), quando utilizada a homogeneização de alta velocidade. Os teores de lipídios variaram de 9,6 a 35,2%, enquanto os lipídios totais variaram de 0,80 a 2,96 g L^{-1}. Em relação à tecnologia de plasma frio, foram avaliados a biomassa (0,5–0,7 g), o tempo de operação (20–40 min) e a potência (8–14 W). Os teores de lipídios variaram de 20,6 a 34,9%, enquanto os lipídios totais variaram de 1,81 a 3,06 g L^{-1}.

Sendo assim é necessário avaliar técnicas eficazes e seguras para a ruptura celular, garantindo a máxima liberação e recuperação do óleo microbiano rico em carotenoides e minimizando a degradação dos compostos termossensíveis.

3.4. TÉCNICAS DE RECUPERAÇÃO DE LIPÍDIOS E CAROTENOIDES MICROBIANOS

Lipídios e carotenoides são metabólitos secundários sintetizados por leveduras oleaginosas, geralmente sob condições de estresse, como limitação nutricional ou estresse oxidativo (Rocha *et al*., 2025). A recuperação desses compostos requer técnicas que preservem a estrutura e conteúdo intracelular, além de minimizar impactos ambientais.

O primeiro passo para a obtenção desses biocompostos é a ruptura celular, processo que promove o rompimento da parede celular e a liberação dos constituintes intracelulares (Gautério *et al*., 2023). A eficácia dessa etapa é importante, pois a parede celular de leveduras, é composta principalmente por β1,3 glucano, β1,6 glucano, manoproteínas e (Lipke; Ovalle, 1998), que atuma como barreira física seletiva (Sentandreu *et al*., 1991). Podendo variar a composição de acordo com a espécie de cada levedura (Ribeiro; Bourbon-Melo; Sá-Correia, 2022)

Entre os métodos mecânicos utilizados para a ruptura celular de leveduras, destaca-se o uso da moagem com esferas de vidro (Avramia; Amariei, 2022) ou aço inoxidável (Silva e*t al.,* 2024). Nessa técnica, células são rompidas por forças de cisalhamento. Outro método é a homogeneização por alta pressão (Lopes *et al*. 2017), no qual uma suspensão celular é forçada a passar por uma abertura estreita sob alta pressão, sendo depois liberada em uma câmara de baixa pressão (Gautério *et al.,* 2023). O moinho de facas também é considerado um método mecânico, muito empregado no processamento de biomassas, sua ação ocorre por força de cisalhamento entre facas estacionárias e rotativas (Grejtak *et al*., 2023).

A ultrassonicação também é um método mecânico usado para o rompimento da parede celular. A técnica consiste no uso de alta força de cisalhamento por ultrassom de alta frequência; as ondas sonoras de alta frequência provocam um fenômeno chamado cavitação, que faz com que bolhas de gás sejam criadas e implodidas gerando energia capaz de romper as células (Liu *et al*., 2013). Outras técnicas também incluem congelamento e liofilização, além dos métodos não mecânicos como rupturas químicas e enzimáticas, por exemplo (Duarte *et al*., 2017).

Essas técnicas, podem ser aplicadas isoladamente ou de forma combinada. Zainuddin *et al*. (2021) compararam diferentes leveduras oleaginosas quanto a recuperação de lipídios aplicando técnicas de ruptura mecânica. Os maiores percentuais de lipídios foram obtidos para

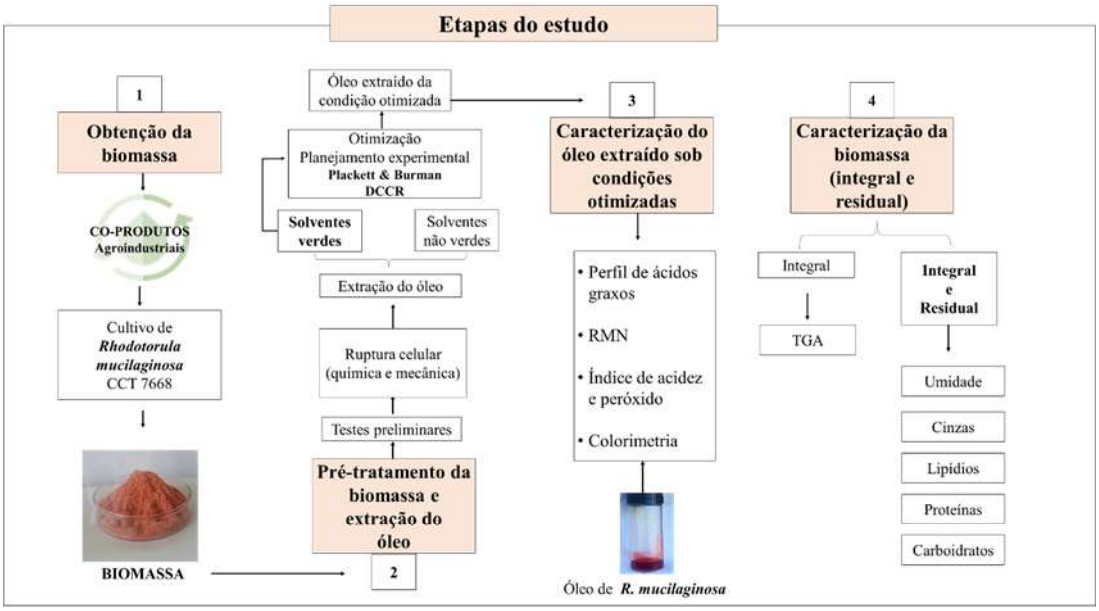
a levedura *Saitozyma podzolica* DSM 27.192, aplicando a ruptura por homogeneização de alta pressão por 20 min a 60 °C, onde alcançou 43,4% de lipídios, seguida da moagem com esferas de vidro de 425–600 μm, a 60 °C por 20 min, alcançando 32,3% de lipídios. Para as técnicas combinadas, o uso da esferas de vidro (0,2 mm) combinadas com a extração por Bligh & Dyer (clorofórmio:metanol:água (1:2:0,25, v v v^{-1}) resultaram em 35% do teor lipídico para a levedura *Pichia guilliermondii*, enquanto para a levedura *Rhodotorula glutinis* o resultado foi de 23,5% usando a mesma extração e esferas de vidro (0,5 g de esferas)

Dessa forma, a escolha da melhor técnica de ruptura celular dependerá de diversos fatores, como a espécie da levedura, a composição e espessura da parede celular, a presença de dos compostos intracelulares (como lipídios ou carotenoides), o tipo de extração, e ainda aspectos econômicos e ambientais envolvidos no processo (Gautério *et al*., 2023; Zainuddin *et al*., 2021). Portanto, a otimização da ruptura celular deve considerar a eficiência de liberação dos compostos de interesse e a viabilidade do método para aplicação em larga escala e a preservação da integridade dos compostos extraídos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A Figura 7 apresenta uma visão esquemática das etapas que compõem este estudo, iniciando pelo cultivo do microrganismo para obtenção da biomassa e seguindo até a otimização do processo de extração, a recuperação e a caracterização do óleo microbiano e das biomassas integral e residual.

Figura 7 - Representação esquemática das etapas desenvolvidas neste estudo



4.1. MICRORGANISMO, MANUTENÇÃO E REATIVAÇÃO

A levedura *R. mucilaginosa* CCT 7668 utilizada para este trabalho foi previamente isolada no Rio Grande do Sul, identificada por Otero *et al*. (2019) e encontra-se depositada na Coleção de Cultura André Toselo. O microrganismo está mantido em meio agar YM (*Yeast extract* – malt extract) a 4 °C, a partir de repiques trimestrais. Para a reativação, utilizando o mesmo meio de cultivo, foi realizado o repique e a incubação por 48 h a 25 °C.

4.2. PREPARO DO PRÉ-INÓCULO E INÓCULO

O pré-inóculo foi preparado realizando a raspagem da biomassa dos tubos de ensaio reativados, com auxílio de água peptonada. A água peptonada foi preparada com uma concentração de 0,1% m v^{-1} e autoclavada por 15 min a 121 ºC. Em seguida, 2 mL da água peptonada foram

adicionados a tubos de ensaio contendo a levedura. Após a raspagem, 1 mL da ressuspensão celular foi coletada e transferida para tubo de ensaio contendo 9 mL de meio YM (também previamente autoclavado) para incubação, nas condições anteriormente citadas (48 h a 25 °C).

Para o inóculo foram usados frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL do meio YM (Rios *et al.*, 2015) previamente esterilizado a 121 ºC por 15 min. Aos 90 mL do meio YM, foram adicionados os 10 mL do pré-inóculo, e incubado a 25 °C, 150 rpm por 48 h ou tempo suficiente para atingir $1x10^8$ células/mL, contadas em Câmara de Neubauer (Michelon *et al.*, 2012).

4.3. CULTIVO

As condições de cultivo foram previamente otimizadas por Rodrigues *et al.* (2019). A composição do meio de cultivo foi composta por 70 g L^{-1} de melaço de cana-de-açúcar (Melaços Brasileiros) e 3,4 g L^{-1} de água de maceração de milho (Corn Products), caracterizado previamente por Cipolatti *et al.* (2019). Frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL do meio agroindustrial e 10% de inóculo (v v^{-1}) foram usados para o cultivo, com concentração inicial de células de $1x10^7$ células/mL (Rios *et al.*, 2015), e pH ajustado para 6,0. Os frascos foram incubados em agitador orbital tipo *shaker* por 144h a 25 °C e 180 rpm (Rodrigues *et al.*, 2022). Após o cultivo, a biomassa foi recuperada, lavada e seca a 35 ºC por 48 h (Cipolatti *et al.*, 2019), peneirada em peneira de115 mesh e congelada 48 h a -18 °C (Cipolatti *et al.*, 2015).

4.4. ACOMPANHAMENTO DO CULTIVO

Para o acompanhamento da concentração de biomassa, pH, açúcares redutores totais e carotenoides totais, foram retiradas alíquotas a cada 24 h. Os parâmetros cinéticos avaliados foram: produtividade em carotenoides (Pc, μg L h^{-1}), produtividade em biomassa (Px, g L h^{-1}) e produtividade em lipídios (PL, μg L h^{-1}), sendo calculados e expressos nas Equações 1, 2 e 3, respectivamente.

$$Pc = \frac{Cm - Co}{tf} \quad (1)$$

$$Px = \frac{Xm - Xo}{tf} \quad (2)$$

$$P_L = \frac{\text{Total lipídios}}{tf} \quad (3)$$

Onde: Xm = máxima concentração de biomassa (g L^{-1}); X0 = concentração inicial de biomassa (g L^{-1}); Cm = máxima concentração de carotenoides (μg L^{-1}); C0 = concentração inicial de carotenoides (μg L^{-1}); e tf = tempo de cultivo (h) quando a concentração de biomassa ou carotenoides atingem seus valores máximos.

A concentração da biomassa foi estimada por leitura de absorbância em espectrofotômetro a 620 nm onde foi correlacionado a densidade óptica com a biomassa seca através da curva padrão de crescimento (Choi; Park, 2003). As determinações do pH foram realizadas em medidor de pHmetro devidamente calibrado em soluções tampão 4 e 7, de acordo com a AOAC (2000). Os açúcares redutores totais (ART) foram determinados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959) em leitura de absorbância de 540 nm utilizando curva de calibração de glicose. As amostras foram previamente hidrolisadas e centrifugadas de acordo com o protocolo descrito por Maldonade (2013).

Para determinar a concentração de carotenoides totais durante o cultivo 0,05 g de biomassa seca mantida por 48 h a 35 °C foi macerada, peneirada (Tyler 115) e congelada por 48 h a -18 °C (Cipolatti *et al.*, 2015). A primeira etapa consistiu na adição de 2 mL de DMSO previamente aquecido a 55 °C na biomassa. Após a adição do DMSO, a mistura foi homogeneizada em vórtex durante o período de 1 min em intervalos a cada 15 min até que o processo completasse 1 h. Após isso, foram adicionados 6 mL de acetona à amostra que em seguida foi centrifugada (1745 x g) durante 10 min. Esse processo foi repetido até o branqueamento da biomassa e recuperação do solvente. Posteriormente, foram adicionados 10 mL de NaCl 20% (m v^{-1}) e 10 mL de éter de petróleo, após a adição dos dois solventes pela parede do tubo, foi adicionado à amostra, sulfato de sódio (Na2SO4), aproximadamente 0,2 g, para auxiliar na remoção da água. Em seguida, os tubos foram levemente agitados e deixados em repouso até que ocorresse a separação de fases.

Após a obtenção do extrato, foi realizado a leitura em absorbância em espectrofotômetro a 448 nm (Rodrigues *et al.*, 2019). A concentração de carotenoides totais foi expressa em micrograma de carotenoides por grama de biomassa (μg g^{-1}) e calculada conforme a Equação 4 (Davies, 1976). A absortividade molar do β-caroteno em éter de petróleo foi de 2592 L mol cm^{-1}.

$$CT = \frac{A*V*10^{6}}{A_{1cm}^{1\%}*100*m_{amostra}} \quad (4)$$

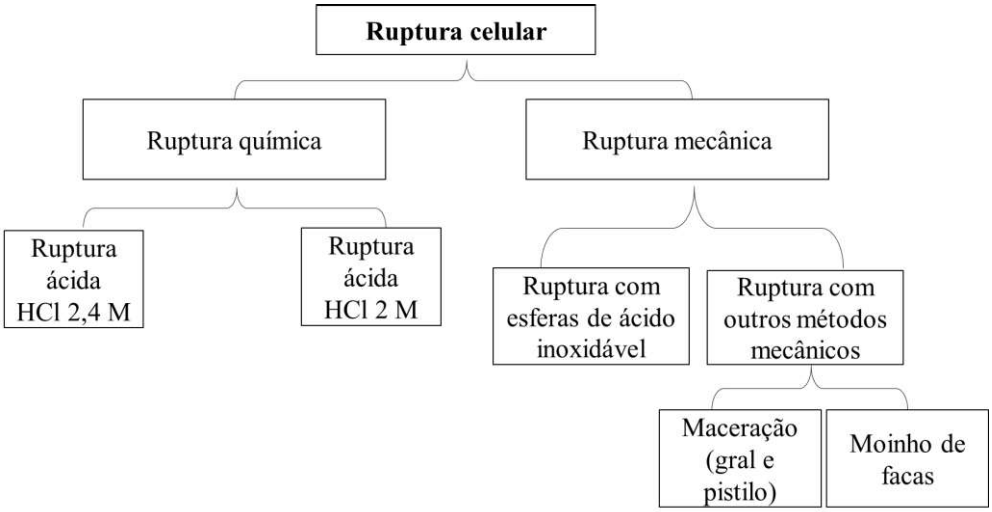
Onde: CT = concentração de carotenoides totais (μg g^{-1}); A = absorbância; V = volume (mL); $m_{amostra}$= massa celular seca (g); $A^{1\%}_{1cm}$ = absortividade molar.

4.5. AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO LIPÍDICA SOB DIFERENTES CONDIÇÕES

4.5.1. Testes preliminares de ruptura celular

A Figura 8 mostra o esquema geral dos testes realizados no processo de ruptura celular.

Figura 8 – Esquema geral do processo de ruptura celular.



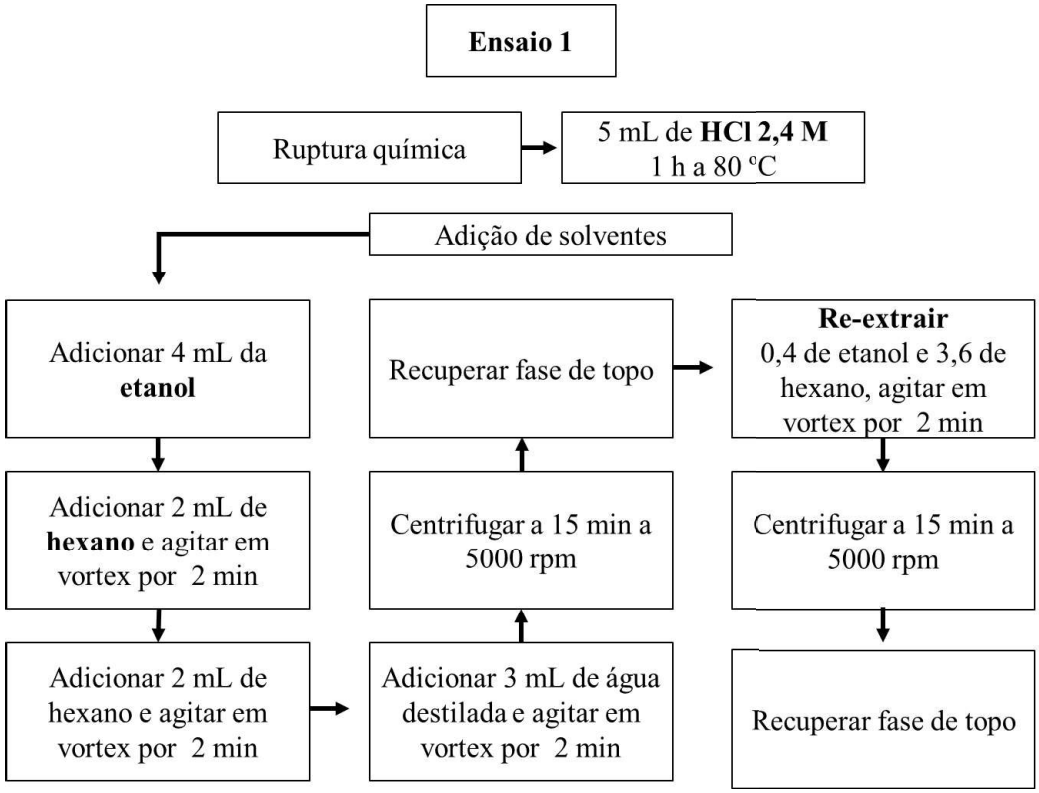
4.5.1.1. Ruptura química

A etapa de ruptura química usou o ácido clorídrico (HCl) com duas molaridades, 2 M e 2,4 M. Em ambos os ensaios que usaram o HCl na hidrólise ácida o processo foi realizado da seguinte forma: foram pesados 0,5 g de biomassa em tubo falcon de 50 mL. Em seguida foram adicionados 5 mL do HCl 2 M ou 2,4 M à biomassa pesada (de acordo com cada ensaio). Logo após a pesagem e adição do HCl, a amostra foi levada para o banho-maria a 80 °C por 1 h (Rodrigues *et al*., 2025) para o rompimento da parede celular. Após isso, os tubos foram colocados em banho de gelo até esfriarem, e então foi realizada a centrifugação por 15 min a 5000 rpm, após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado.

No primeiro grupo de testes (Ensaios 1 a 4) foi avaliada a ruptura química com HCl 2 ou 2,4 M. O ensaio 1 desse grupo de testes utilizou o ácido clorídrico (HCl) 2,4 M como pré-tratamento da biomassa. A hidrólise ácida foi realizada conforme mostrado na Figura 8. Após

a etapa de hidrólise ácida, foi realizada a extração dos lipídios com os solventes hexano e etanol e uma mistura de hexano e etanol na etapa de re-extração, nas condições descritas na Figura 9. Os solventes utilizados no ensaio 1 foram baseados na polaridade dos solventes usados no método Bligh & Dyer (1959). O etanol, solvente polar, foi usado em substituição ao metanol, e o hexano, solvente apolar, foi usado em substituição ao clorofórmio.

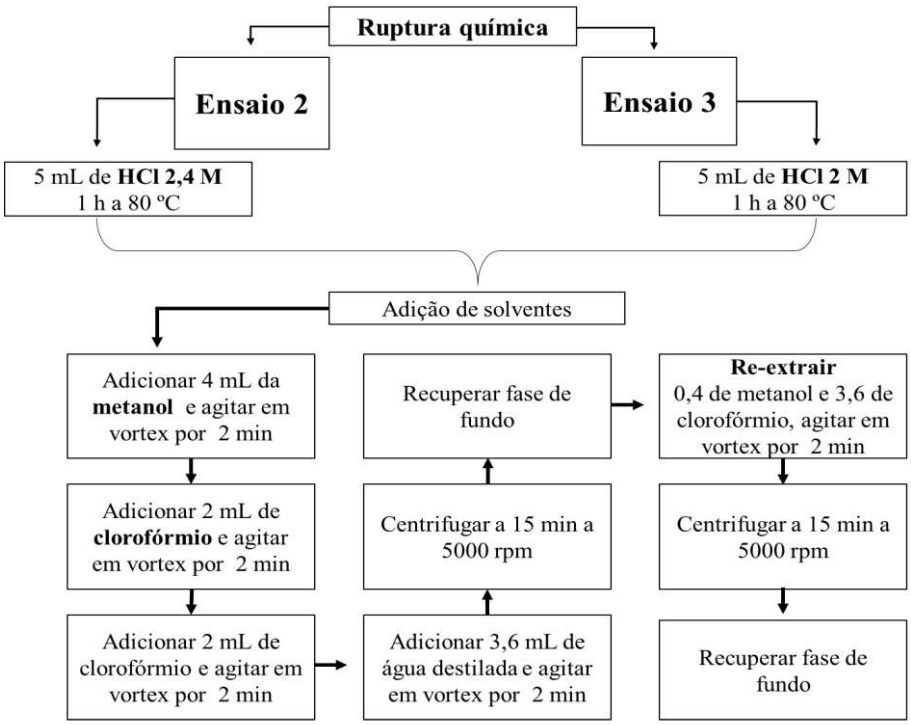
Figura 9 - Fluxograma de ruptura celular com HCl 2,4 M e extração com hexano e etanol do Ensaio 1



Após a primeira centrifugação, a fase de topo foi recuperada e colocada em balão tarado. À biomassa remanescente foi realizada uma re-extração usando 4 mL de etanol em hexano 10% (v v^{-1}). A fase de topo foi novamente recuperada e colocada em balão. O resultado foi calculado conforme a Equação 5.

Os ensaios 2 e 3, também realizaram a etapa de hidrólise ácida. O ensaio 2 usou o HCl 2,4 M, enquanto o ensaio 3 usou o HCl 2 M, ambos a 80 °C por 1 h. No entanto a etapa de extração foi realizada conforme o método Bligh & Dyer (1959). O método usou os solventes metanol e clorofórmio e as etapas do processo estão descritas na Figura 10.

Figura 10 - Fluxograma de ruptura celular com HCl 2,4 M e extração com metanol e clorofórmio do Ensaio 2



A etapa de hidrólise no ensaio 4 usou o HCl 2,4 M nas mesmas condições descritas nos outros ensaios. Os solventes usados foram acetato de etila e etanol. Após a ruptura química, a extração foi conduzida da seguinte maneira: primeiro foram adicionados 2 ml de acetato de etila, em seguida 2 min no vórtex (esse processo foi repetido 5x, completando 10 mL de acetato como volume final e 10 min de vórtex). Após, foram adicionados 4 mL de água destilada e a mistura foi centrifugada por 15 min a 5000 rpm. A fase de topo foi recuperada e colocada em balão (tarado). Foi realizada uma re-extração usando 0,4 mL de etanol e 3,6 mL de acetato de etila. A mistura foi centrifugada por 15 min a 5000 rpm. A fase de topo foi recuperada novamente e colocada em balão. O balão com extrato foi seco em estufa por 1h e 30 min a 70 ºC. O resultado foi calculado conforme a Equação 5.

4.5.1.2. Ruptura mecânica

Ruptura com esferas de aço inoxidável

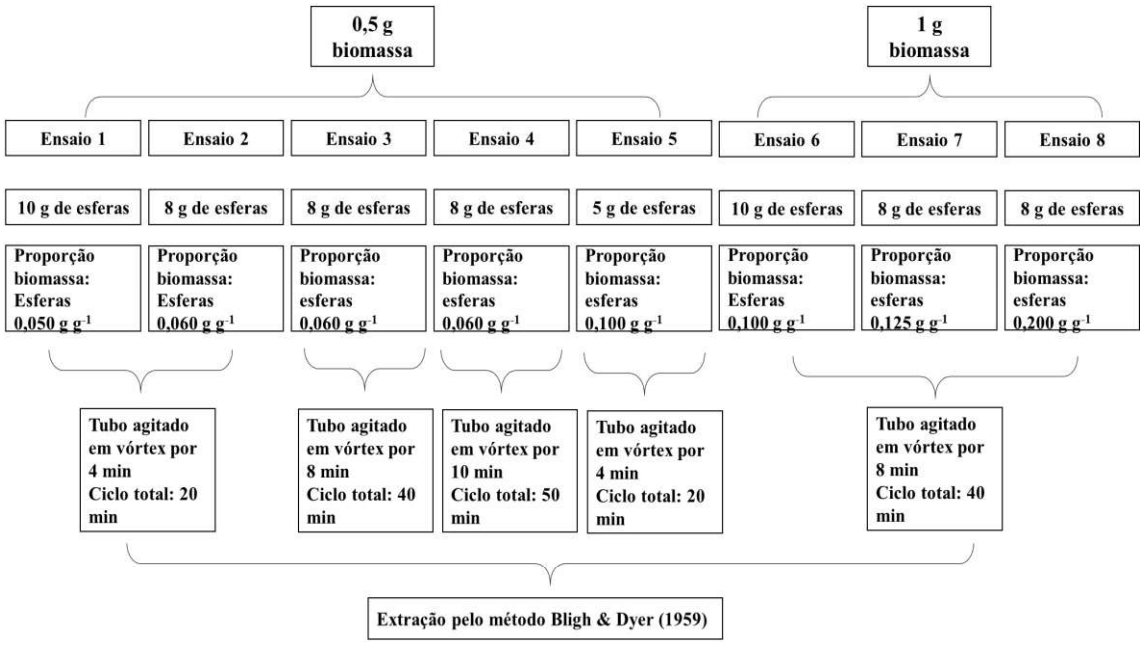
O segundo grupo de testes (Ensaios 1 a 8) diferentes proporções entre biomassa e esferas de aço inoxidável (0,3 mm) (ruptura celular), assim como diferentes tempos de ruptura foram

estudados. Todos os ensaios que usaram esferas de aço inoxidável utilizaram o método de extração por Bligh & Dyer (1959) para determinar o conteúdo lipídico.

A ruptura celular com as esferas foi realizada após a biomassa do final do cultivo ter sido macerada em gral e pistilo e congelada (48 h a -18 °C (Cipolatti *et al.*, 2015). Os Ensaios 1 ao 5 (Figura 11) usaram 0,5 g de biomassa e variaram na proporção de esferas e tempo de vórtex. Primeiro foi pesada em tubos falcon de 15 mL a quantidade de biomassa respectiva para cada ensaio. No mesmo tubo foram adicionadas as esferas. O tubo foi levado ao vórtex e agitado tendo uma pausa de 2 min entre uma agitação e outra, e isso sucedeu-se até que o ciclo total fosse finalizado. Em seguida a biomassa foi peneirada (115 mesh) e o processo de extração foi realizado conforme o método controle, Bligh & Dyer (item 4.5.2) e o conteúdo lipídico foi calculado pela Equação 5.

Os Ensaios 6 ao 8 usaram 1 g de biomassa e manteve o tempo de vórtex fixado em 40 min no total. O processo é ilustrado na Figura 11.

Figura 11 - Etapa de Ruptura celular com esferas de aço inoxidável usando diferentes proporção de biomassa:esfera (g g^{-1}) e extração com Bligh & Dyer

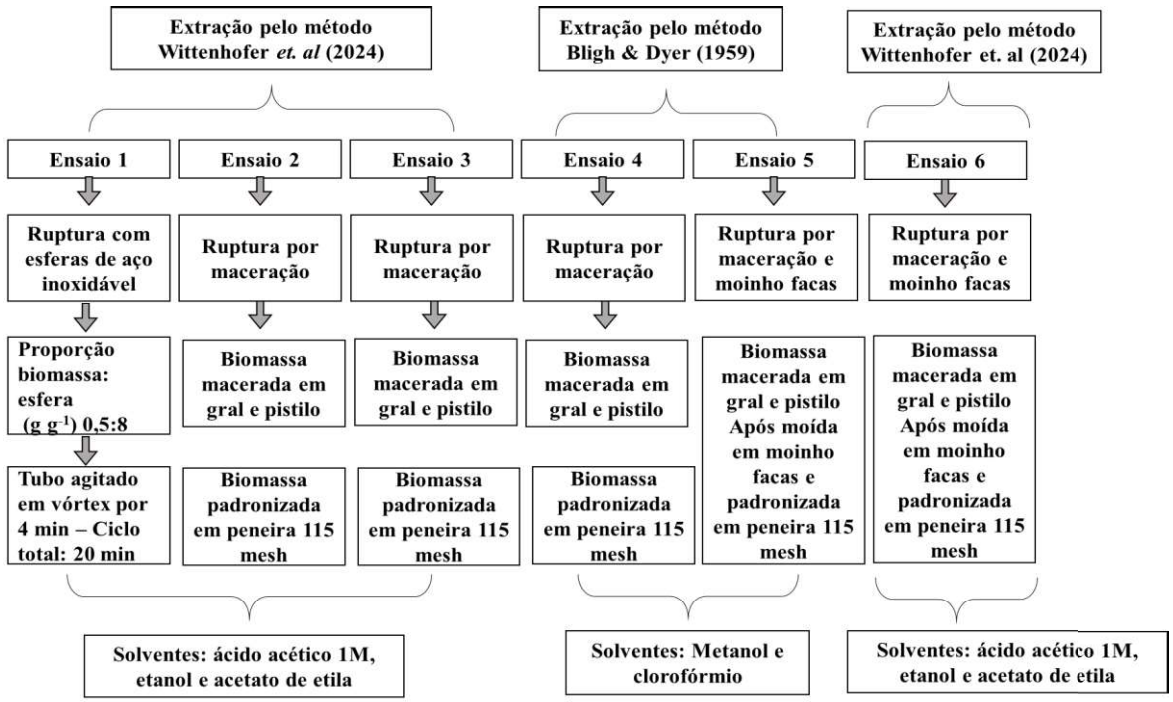


Ruptura com diferentes métodos mecânicos

Nestes testes diferentes métodos mecânicos e diferentes solventes foram usados. O processo é detalhado na Figura 12. O teste para extração com acetato de etila, etanol e ácido acético foi baseado na metodologia proposta por Wittenhofer *et al.* (2024), item 4.5.3.

Todos os ensaios usaram a maceração com gral e pistilo e padronização da biomassa em peneira 115 mesh como etapa de ruptura celular. O ensaio 1 avaliou novamente o uso de esferas de aço inoxidável e extração com solvenes alternativos (acetato de etila e etanol), o uso do moinho de facas foi aplicado no ensaio 5 e 6. A extração pelo método Bligh & Dyer foi aplicada nos ensaios 4 e 5 e metodologia de Wittenhofer *et al*. (2024) aplicada nos ensaios 1, 2, 3 e 6.

Figura 12 - Diferentes métodos mecânicos para a ruptura celular e extração com Bligh & Dyer e com a metodologia baseada em Wittenhofer *et al.* (2024).



4.5.2. Determinação de lipídios por Bligh & Dyer – método controle

A extração por Bligh & Dyer é o método analítico padrão para a extração de lipídios. Em geral, ele é precedido de uma etapa de pré-tratamento da biomassa, normalmente a hidrolise ácida, citada no item 4.5.1.1, e após essa etapa é feito o processo de extração que ocorre da seguinte maneira: à amostra foram adicionados 4 mL de metanol à mistura, em seguida a mistura foi agitada em vórtex por 2 min, logo após foram adicionados 2 mL de clorofórmio seguido de vórtex por 2 min. Após, mais 2 mL de clorofórmio foram adicionados e a mistura foi levada ao vórtex por 2 min, seguido da adição de 3,6 mL de água destilada e vórtex por 2 min. A mistura foi então centrifugada por 15 min a 5000 rpm. A fase de fundo foi recuperada

com pipeta de Pasteur de vidro e colocada em balão (tarado). Foi realizada uma re-extração do precipitado usando 0,4 mL de metanol e 3,6 mL de clorofórmio (metanol:clorofórmio 10%). A fase de fundo foi novamente recuperada e acrescida a fase de fundo anterior. O balão com o extrato foi colocado em estufa a 60-70 ºC por 1 h e 30 min ou até completa evaporação do solvente. O conteúdo lipídico foi determinado e calculado conforme Equação 5 e o resultado expresso em % m m^{-1} após a pesagem do balão com a amostra (AOCS, 2009).

$$\text{Conteúdo lipídico} = \left(\frac{(\text{mp+lipídios})-\text{mp}}{\text{mb}}\right) * 100 \quad (5)$$

Onde: mp+lipídios = massa total da amostra, incluindo os lipídios (g); mp = amostra antes da extração dos lipídios; mb = massa total da amostra após a extração dos lipídios.

4.5.3. Determinação de lipídios com extração por Wittenhofer *et al.* (2024)

4.5.3.1. Extração usando acetato de etila, etanol e ácido acético

A metodologia de extração usando acetato de etila, etanol e ácido acético de Wittenhofer *et al.* (2024) foi usada e adaptada para este estudo. Primeiro foi preparado uma solução de ácido acético 1M. Logo após foi feita a mistura de ácido acético 1M/etanol e acetato de etila nas proporções 2:20:30 v v v^{-1}. Em seguida foram pesados 0,5 g de biomassa em tubos falcon de 50 mL e adicionados 2 mL da mistura. Logo após os tubos foram agitados em vórtex por 5 min. Em seguida foram adicionados 4 mL de água destilada e novamente os tubos foram agitados em vórtex (5 min). Posteriormente foram adicionados 4 mL de acetato de etila e vórtex novamente (5 min). A mistura foi centrifugada a 4500 g por 5 min. A fase orgânica foi recuperada com pipeta de Pasteur de vidro e colocada em balão devidamente seco e pesado. Foi realizada uma re-extração, adicionando 3 mL de acetato e 1 mL água destilada, em seguida voltou-se a mistura ao vórtex (5 min) e após realizou-se a centrifugação e recuperação da fase orgânica, nas mesmas condições citadas anteriormente. Uma segunda re-extração foi realizada, adicionando 3 mL de acetato e 1 mL H2O seguidas de vórtex, centrifugação e recuperação da fase orgânica. O conteúdo lipídico foi determinado e calculado conforme Equação 5 e o resultado expresso em % m m^{-1} após a pesagem do balão com a amostra (AOCS, 2009).

A recuperação do solvente foi realizada por evaporação a vácuo em um rotaevaporador (Fisatom, modelo 801) (evaporador rotativo). O balão de fundo chato, contendo o óleo/solvente obtido pela extração, foi acoplado ao sistema e imerso em um banho-maria mantido a uma temperatura entre 50 a 60 ºC visando otimizar a evaporação sem degradar o óleo. A rotação contínua do balão permitiu que houvesse uma maior área superficial de contato. A etapa foi concluída quando o solvente parou de condensar, sendo o óleo remanescente no balão submetido a vácuo por um período adicional para garantir a remoção completa dos traços residuais de solvente. Após a recuperação do solvente, a amostra foi acondicionada em dessecador por 24 h antes da pesagem, visando prevenir a absorção de umidade.

4.5.3.2. Extração usando hexano e isopropanol

O hexano e isopropanol também foram solventes propostos por Wittenhofer *et al.* (2024) e a metodologia foi adaptada para este estudo. Primeiro foram pesados 0,5 g de biomassa em tubos falcon de 50 mL. Em seguida foram adicionados 2 mL de água destilada e a mistura levada ao vortex (5 min). Posteriormente, foram adicionados 5 mL da mistura de ácido acético 1M/ isopropanol/hexano (2:20:30 v v^{-1}) e novamente o vórtex foi usado por 5 min. Após foram adicionados 5 mL de hexano e vortex novamente (5 min). Ao final dessa etapa a mistura foi centrifugada por 5 min a 4500 g. A fase orgânica foi recuperada com pipeta de Pasteur de vidro e colocada em balão (devidamente seco e pesado). Duas re-extrações foram realizadas, adicionando 4 mL de hexano e 1 mL água destilada e vórtex por 5 min. A centrifugação e recuperação da fase orgânica foram realizadas conforme descritas anteriormente.

4.6. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS POR SOLVENTES VERDES

4.6.1. Delineamento experimental *Plackett-Burman*

Este delineamento baseou-se no protocolo de extração de Wittenhofer *et al.* (2024), item 4.5.3.1. E na etapa do rompimento celular, foi realizado a substituição da ruptura química (hidrolise ácida) pela ruptura usando a maceração e moinho de facas. O delineamento *Plackett Burman,* utilizado inicialmente neste estudo, foi composto por 12 ensaios com 4 repetições no ponto central, totalizando 16 ensaios, para estudar os efeitos de oito variáveis independentes do processo de recuperação de lipídios microbianos utilizando solventes verdes, tendo como resposta o conteúdo de lipídios percentual (m m^{-1}), cujos níveis estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Variáveis e níveis para o delineamento *Plackett-Burman*.

Variável	Código	Nível -1	Nível 0	Nível +1
Biomassa (g)	X1	0,2	0,5	0,8
Volume da mistura (mL) (ácido acético 1M, etanol e acetato de etila nas proporções 2/20/30 v v v^{-1})	X2	1	2	3
Água destilada(mL)	X3	2	4	6
Tempo de vórtex (min)	X4	3	5	7
Acetato de etila (mL)	X5	2	4	6
Velocidade de centrifugação (rpm)	X6	3000	4000	5000
Tempo de centrifugação (min)	X7	3	5	7
Número de extrações	X8	1	2	3

4.6.2. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Após a seleção das variáveis significativas identificadas no planejamento *Plackett-Burman,* foi proposto um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^4, com 8 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 27 ensaios, com o objetivo de otimizar a extração de lipídios, com método adaptado de Wittenhofer *et al.* (2024), usando o acetato de etila, etanol e ácido acético 1M como solventes. Os níveis estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Variáveis e níveis para o DCCR.

Variável	Código	Nível -2	Nível -1	Nível 0	Nível +1	Nível 2
Biomassa (g)	X1	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25
Volume da mistura (mL) (ácido acético 1M, etanol e acetato de etila nas proporções 2:20:30 v v v^{-1})	X2	2	3	4	5	6
Água destilada(mL)	X3	0	0,5	1	1,5	2
Acetato de etila (mL)	X4	2	3	4	5	6

Durante os ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR) as variáveis tempo de vórtex (min), velocidade de centrifugação (rpm), tempo de centrifugação (min) e número de extrações foram fixadas no nível -1 e corresponderam as variáveis X4 (tempo de

vórtex em minutos), X6 (velocidade de centrifugação em rpm), X7 (tempo de centrifugação em min) e X8 (número de extrações) do *Plackett Burman*.

4.6.3. Validação das Condições Otimizadas pelo DCCR

Para validar o modelo obtido com o DCCR do processo de extração de lipídios, foi realizado um ensaio com três repetições, nas condições preditas para recuperação de lipídios. Foram usados 0,1 g de biomassa (X1), 5 mL do volume da mistura de solventes (X2), 0,5 mL de volume de água destilada (X3) e 2 mL de acetato de etila (X4). As demais variáveis foram mantidas fixadas, conforme adotado no DCCR: tempo de vórtex = 3 min, velocidade de centrifugação = 3000 rpm, tempo de centrifugação = 3 minutos e número de extrações = 1.

4.7. CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO MICROBIANO

4.7.1. Perfil de ácidos graxos

Para a obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos, o conteúdo lipídico foi esterificado de acordo com o protocolo descrito por Metcalfe *et al*. (1966). O perfil de ácidos graxos foi analisado de 4 condições diferentes: do óleo obtido de *R. mucilaginosa*.

O primeiro óleo foi obtido dos pontos centrais do planejamento Plackett & Burman (método proposto por Wittenhofer *et al.* (2024) com adaptações após ruptura com moinho de facas, onde foram usados 0,5 g de biomassa, 2 mL do volume da mistura (ácido acético 1M, etanol e acetato de etila nas proporções 2/20/30 v v v^{-1}), 4 mL de água destilada, 5 min de vórtex, 4 mL de acetato de etila, velocidade de centrifugação (4000 rpm), tempo de centrifugação (5 min) e 2 extrações.

A segunda condição foi do óleo extraído da condição validada pelo DCCR após 24 h, a terceira, o óleo extraído foi da condição validada pelo DCCR após 144 h de armazenamento e a quarta condição, o óleo foi extraído pelo método Bligh & Dyer.

O perfil de ácidos graxos foi determinado por um cromatógrafo a gás (Shimadzu, modelo – 2010 Plus), equipado com injetor split/splitess, coluna capilar Zebron ZB-FAME (20 m x 0,18 mm ID x 0,15 μm) e detector de ionização de chama (FID). A temperatura do injetor foi de 250 °C e do detector 260 °C. O gás de arraste utilizado foi N2. As condições cromatográficas da coluna foram temperatura inicial de 80 °C por 1,5 min, sendo então elevada a 160 °C a uma taxa de aquecimento de 40 °C min^{-1}, em seguida foi a 185 °C a uma taxa de 5

°C min^{-1} e finalizando até 260 °C a uma taxa de 30 °C min^{-1}, totalizando 11 min de tempo total. A identificação dos picos foi feita por comparação dos tempos de retenção das amostras com os padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (Supelco 37 componentes FAME MIX – Sigma-Aldrich Products), e a quantificação foi obtida por normalização das áreas dos picos.

4.7.2. Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os índices de iodo, saponificação, peso molecular foram medidos utilizando um espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN) (Bruker High Field, modelo 400 MHz Ascend, Rheinstetten, Alemanha) equipado com um ímã de 9,4 T, correspondente a 400 MHz para ^{1}H, e uma sonda de 5 mm de diâmetro. Para adquirir os espectros de RMN, 20 mg do lipídio foram dissolvidos em 0,7 mL de $CDCl_3$ e colocados no espectrômetro. Foi utilizada uma sequência padrão ^{1}H, consistindo em um pulso de 90°, com um tempo de aquisição de 9,109 s, 8 varreduras e uma janela espectral de 3597.12 Hz (equivalente a 9 ppm). Os picos foram identificados conforme Carneiro, Reda e Carneiro (2005).

4.7.3. Índice de acidez e peróxido por titulometria

A determinação do índice de acidez foi realizada de acordo com o método oficial da AOCS (AOCS Official Method Cd 5a-40, 1980). A solução obtida foi titulada com KOH até o aparecimento de coloração rosada persistente por no mínimo, 30 s. O índice de acidez foi calculado com base no volume de KOH gasto na titulação e expresso em g/ 100 g em ácido oleico e o índice de peróxido foi realizado de acordo com o método oficial da AOCS (AOCS Official Method Cd 8-53, 1980) e o resultado foi expresso em miliequivalentes de oxigênio ativo por quilograma de óleo (meq O_2/kg).

4.7.4. Carotenoides totais no óleo microbiano

A quantificação de carotenoides totais foi realizada pelo método proposto por Maldonade *et al.* (2021) e a concentração de carotenoides totais foi calculada a partir da Equação 4. A quantificação dos carotenoides no óleo de *R. mucilaginosa* envolveu as seguintes etapas: pesagem do óleo, adição de solvente orgânico (acetona em temperatura inferior a 8 °C), centrifugação (10 min a 4000 rpm em temperatura de 4 °C) para separação do sobrenadante e

extração com éter de petróleo. Após, a amostra foi agitada gentilmente e acondicionada em geladeira por 2 h. Na etapa seguinte foi realizado a saponificação com hidróxido de potássio (KOH 10% (m v^{-1})), em metanol com adição de terc-butil-hidroquinona (0,1%) para liberação e dissolução dos ácidos graxos e separação da fase aquosa, a mistura permaneceu no escuro por 2 h em temperatura ambiente e na sequência, foi centrifugada por 30 min a 8307 g a 4 °C. Após a lavagem com água destilada (até atingir o pH neutro) e descarte da fase aquosa, 2 mL da amostra foi usada para a leitura em espectrofotômetro a 450 nm tendo o éter de petróleo como solução de referência (branco).

4.7.5. Identificação de carotenoides no óleo

Os carotenoides presentes no óleo microbiano foram identificados por cromatógrafo líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu LC-10, Kyoto, Japão) equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) e uma coluna Discovery C8 (5 μm, 15 cm × 4,6 mm). Os extratos foram previamente rotaevaporado por 10 mim a 40 °C, a eluição em gradiente foi realizada utilizando três solventes: acetonitrila (A), metanol (B) e acetato de etila (C), mantidos à temperatura ambiente (20 °C), com um fluxo de 1 mL min^{-1} e tempo total de análise de 17 min. O controle do equipamento e a aquisição dos dados foram realizados por meio do software LC Solution. Para a identificação, os tempos de retenção foram comparados com curvas padrão previamente construídas, utilizando os padrões cromatográficos de astaxantina, β-caroteno e luteína (Cipolatti *et al.*, 2015).

4.7.6. Acompanhamento da coloração do óleo durante o armazenamento

As amostras de óleo foram armazenadas por 9 dias em placa de petri recorberta com papel alumínio, a fim de evitar a exposição à luz. A cor das amostras de óleo foi avaliada a partir da medida das coordenadas L*, a* e b* do sistema CIELab em colorímetro (Konica Minolta CM-600d). Em que L* indica a luminosidade, a* indica cromaticidade do verde (-) ao vermelho (+) e b* indica a cromaticidade do amarelo (+) ao azul (-). Também foram calculados o Croma (C*) que mediu a diferença nas distâncias entre cada ponto de cores no eixo de luminosidade indicando a saturação ou intensidade da cor, o ângulo Hue (h^o) mediu a diferença angular (em graus) entre os caminhos dos vetores associados com as duas cores (amostra do dia 1 e amostra do dia 9) e o ΔE* mediu distância total entre as duas cores (amostra do dia 1 e

amostra do dia 9). As medidas foram realizadas nos dias 0 ao dia 9, em quintoplicata e submetidas a tratamento estatístico.

4.8. CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA INTEGRAL E RESIDUAL

4.8.1. Composição proximal

As análises de composição proximal foram realizadas conforme AOAC (2000) em ambas as biomassas, integral e residual. A biomassa integral usada fora a do final do cultivo, após ter sido seca, macerada, peneirada e congelada, conforme está descrito no item 4.3. Já as biomassas residuais foram analisadas após terem passado pelo processo de extração de lipídios, tendo obtidas pela condição validada no DCCR. Também foram secas até completa evaporação dos solventes e acondicionadas em dessecador para evitar a absorção de umidade.

O teor de umidade foi determinado pela secagem da amostra em estufa. As amostras foram pesadas em capsulas de alumínio e secas a 105 ºC secas por 6 h. Após o período de 6 h, as amostras foram colocadas em dessecador até que atingissem a temperatura ambiente para e posteriormente serem pesadas. A pesagem foi realizada até peso constante. O percentual de umidade foi calculado conforme a Equação 6.

$$\%\text{Umidade} = \frac{M_{\text{úmida}} - M_{\text{seca}}}{M_{\text{úmida}}} \; x \; 100 \qquad (6)$$

Onde M úmido = massa da amostra úmida. M seca = massa da amostra seca

O teor de lipídios foi determinado por Bligh & Dyer (1959) conforme é detalhado no item 4.5.2. O extrato lipídico foi evaporado em estufa a 70ºC por 1 h e 30 min e os lipídios foram medidos por gravimetria conforme a Equação 7.

$$\text{Conteúdo lipídico (\%)} = \frac{mpL - mp}{mb} \; . \; 100 \qquad (7)$$

Onde mp é a massa da placa de petri, mpL a massa da placa de petri contendo os lipídios e mb a massa inicial de biomassa.

O teor de nitrogênio proteico foi determinado pelo método Kjeldahl e conversão de nitrogênio em proteína pelo fator 6,25. O teor de cinzas foi determinado pela queima da

biomassa em forno mufla a 560 °C por 4 h. Após o período de 4 h, o cadinho com as cinzas foram acondicionados em dessecador até que atingissem temperatura ambiente. O teor foi calculado pela Equação 8. Os carboidratos foram determinados por diferença.

A concentração de proteínas solúveis foi determinada segundo a metodologia descrita por Lowry *et al.* (1951), A leitura da absorbância foi realizada a 750 nm em espectrofotômetro, utilizando curva padrão construída com albumina bovina (0,02 a 0,16 μg mL^{-1}). Os resultados foram expressos em mg de proteína solúvel por grama de amostra seca. E os carboidratos por diferença.

$$\text{Nitrogênio proteico} = \frac{\text{V xN x } 0{,}0014}{\text{PA}} \qquad (8)$$

Onde V= volume gasto da titulação, N= normalidade padronizada do HCl, PA = peso da amostra. O resultado final = nitrogênio proteico x fator de correção

A análise da composição proximal realizada para a biomassa residual fora após a extração de lipídios extraídos pela condição validada pelo DCCR.

4.8.2. Análise termogravimétrica (TGA)

Para analisar o comportamento da biomassa integral da levedura *R. mucilaginosa* em relação ao aquecimento foi realizada a TGA, utilizando analisador termogravimétrico modelo TGA-50 (Shimadzu, Japão). A amostra seca foi colocada em cadinhos de platina e submetida a aquecimento controlado, com rampa de aquecimento de 10 °C min^{-1}, no intervalo de temperatura de 20 ºC a 650 ºC. A análise foi conduzida em atmosfera inerte de nitrogênio, com fluxo contínuo de 50 mL min^{-1}, a fim de evitar a oxidação dos constituintes da biomassa. A análise de decomposição térmica foi processada usando o software OriginPro 8.5.

4.8.3. Microscopia de varredura (MEV)

As biomassas foram previamente liofilizadas e acondicionadas em dessecador até o momento da análise, a fim de evitar reabsorção de umidade. A morfologias da superfície das biomassas integrais, biomassas após a ruptura celular usando o moinho de facas e as biomassas residuais, foram examinadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram fixadas sobre suportes metálicos utilizando fita de carbono condutiva. As amostras secas

foram revestidas com uma fina camada de Au/Pd em um revestidor de pulverização "Sputtering" de ouro e de carbono - Denton Vacuum Desk V (Angstrom Engineering, Cambridge, Canadá) e observadas por Microscópio Eletrônico de Varredura (Jeol, JSM - 6610LV, USA) em diferentes ampliações.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

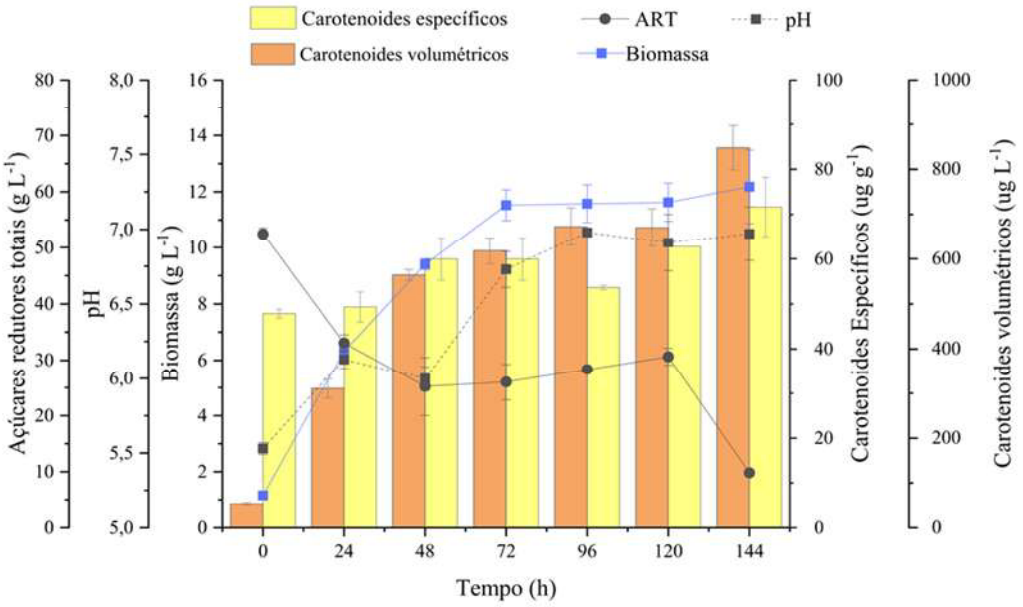
Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3) e as diferenças significativas a um nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$) foram verificadas a partir de análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Tukey. O delineamento experimental *Plackett-Burman*, e o DCCR foram avaliados com nível de confiança de 90% ($p<0,1$) e 95% ($p < 0,5$), respectivamente. Os dados foram tratados utilizando o *software* Statistica 7.0 (StartSoft Inc., Tulsa. OK, EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CRESCIMENTO MICROBIANO

Os cultivos com a levedura *R. mucilaginosa* CCT 7688 foram realizados sob condições anteriormente estabelecidas por Rodrigues *et al.* (2019) e descritas detalhadamente no item 4.3. A Figura 13 representa o acompanhamento do pH, concentração de biomassa, concentração de açúcares redutores totais, concentração específica e volumétrica de carotenoides.

Figura 13 - Acompanhamento do cultivo de *R. mucilaginosa* utilizando meio agroindustrial.



A concentração máxima e a produtividade biomassa foi de 12,18 ± 1,33 g L^{-1} e 0,08 (g L^{-1} h^{-1}), respectivamente e a concentração máxima de carotenoides foi de 847,6 µg L^{-1} (71,64 µg g^{-1}), ambos obtidos em 144 h de cultivo. Conforme é ilustrado na Figura 13, nas primeiras 24 h de cultivo (fase logarítmica), foi observado o consumo dos açúcares redutores, com a concentração reduzindo de 52,52 ± 1,06 g L^{-1} para 33,07 ± 1,47 g L^{-1} e produção de biomassa aumentando de 1,15 g L^{-1} ± 0,07 para 6,31 ± 0,43 g L^{-1}. Essa fase é caracterizada por intensa atividade metabólica, rápido consumo dos açúcares disponíveis no meio e aumento da biomassa. Ao final de 144 h de cultivo, o teor de açúcares redutores caiu para 9,81 g L^{-1}, representando uma redução de aproximadamente 71% em relação ao valor observado em 24 h, o consumo desse açúcar está relacionado ao aumento da concentração de biomassa, visto que a levedura utiliza os açucares do meio para realizar seu crescimento.

A presença em excesso dos carboidratos que compõem o melaço de cana-de-açúcar (predominantemente sacarose e açúcares redutores) (Zhang *et al.*, 2024) associado ao baixo teor de nitrogênio, presente na água de maceração do milho, permitiu que os açúcares presentes nesses substratos fossem metabolizados e convertidos em Acetil-CoA, precursor essencial para a biossíntese dos lipídios e carotenoides (Sailwal *et al.*, 2023). Corroborando com este fato, os coprodutos utilizados neste trabalho foram caracterizados previamente por Cipolatti *et al.* (2019), e a relação C/N = 143,6 do meio de produção foi otimizada por Rodrigues *et al.* (2019) para produção de carotenoides e avaliada na produção de lipídios (Rodrigues *et al.,* 2022).

Outros autores também relatam a importância da razão C/N. Para Sailwal *et al*. (2023), por exemplo, razões próximas ou inferiores a 20 favoreceram o aumento da produção de biomassa pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* (RMIIPL32) (MTCC 25056), alcançando 13,7 g L^{-1} de biomassa em 67 h de cultivo em meio contendo glicerol e outros constituintes como sulfato de amônio, fosfato de hidrogênio dissódico, fosfato de di-hidrogênio de potássio, sulfato de magnésio e extrato de levedura. Enquanto, razões maiores de carbono e nitrogênio combinadas com diferentes condições de estresse (pH, temperatura e aeração) e limitação de nitrogênio, favoreceram o acúmulo de lipídios e carotenoides principalmente em leveduras consideradas oleaginosas.

No estudo de Fonseca *et al.* (2025), linhagens de *Rhodotorula spp* foram cultivadas em meio contendo diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Dentre as fontes de carbono estudadas pelos autores, a que continha glicose promoveu o maior rendimento de biomassa ($9,5 \pm 0,475$ g L^{-1}) e a maior concentração de carotenoides (600 ± 60 μg g^{-1}) em comparação aos meios contendo sacarose, frutose e amido que alcançaram menos de 4 g L^{-1} de biomassa e menos 300 μg g^{-1} de carotenoides. Do mesmo modo, foi observado que o meio que continha peptona como fonte de nitrogênio apresentaram os melhores resultados de biomassa e carotenoides ($6,6 \pm 0,33$ g L^{-1} e $370 \pm 18,5$ μg g^{-1}, respectivamente). Isso reforça que a fonte de carbono e nitrogênio utilizada no meio de cultivo influencia diretamente no processo metabólico de leveduras.

Considerando a importância de substituir fontes convencionais por alternativas de baixo custo, observou-se que os coprodutos agroindustriais utilizados neste estudo, sendo o meio composto por 70 g L^{-1} de melaço de cana-de-açúcar e 3,4 g L^{-1} de água de maceração de milho com razão C/N = 143,6 favoreceram a produção de biomassa e carotenoides, assim como observado nas condições otimizadas por Rodrigues *et al*. (2019), 7,9 g L^{-1} e 1248 μg L^{-1} (152,5 μg g^{-1}) de biomassa e de carotenoides, respectivamente, para a mesma levedura e nas

mesmas condições de cultivo, entretanto as concentrações de biomassa e carotenoides foram determinadas em 168 h.

Em relação ao pH, observou-se que após as 24 h houve um aumento do valor de 5,5 para 6,1, mantendo-se próximo a neutralidade (6,7-6,9) a partir das 72 h durante a fase estacionária (72 h – 120 h). Estes resultados foram observados por Kot *et al*. (2017) que cultivaram *Rhodotorula glutinis* em diferentes faixas de pH e alcançaram valores máximos de biomassa (19,4 g L^{-1}) em meio contendo glicerol, para pH 5,0. Apesar disso, as concentrações de biomassa obtidas em pH 4,0, 6,0 e 7,0 (17,3, 18,0 e 17,2 g L^{-1}, respectivamente) não apresentaram diferenças significativas. Além disso, os autores observaram que quando o pH estava mais ácido (4,0 e 5,0), *Rhodotorula glutinis* produziu mais proteínas (%) (40,4 ± 1,3 e 40,5 ± 2,0, respectivamente), enquanto valores mais próximos a neutralidade (6,0 e 7,0), promoveram maior conteúdo lipídico (%), 10,2 ± 2,1 e 10,8 ± 0,7 para pH 4,0 e 5,0, respectivamente e 11,3 ± 1,3 e 12,7 ± 1,4 de conteúdo lipídico para pH 6,0 e 7,0, respectivamente.

Durante o cultivo observou-se que, entre o período de 72 h a 120 h, houve estabilidade na produção de carotenoides assim como os demais parâmetros avaliados. Entre esse período as concentrações de carotenoides permaneceram entre 618,01 µg L^{-1} (59,98 µg g^{-1}) e 670,62 µg L^{-1} (62,74 µg $g^{-1)}$. No entanto, ao final do cultivo foi registrado um aumento desses compostos, atingindo 847,62 µg L^{-1} (71,64 µg g^{-1}) de carotenoides e a produtividade volumétrica e especifica calculadas em 5,9 µg L^{-1} h^{-1} e 0,5 µg g^{-1} h^{-1}, respectivamente,

R. mucilaginosa é conhecida por ser uma levedura oleaginosa (Li *et al.*, 2022) e produtora de carotenoides. Utilizando o método de ruptura química com HCl 2,4 M (Rodrigues *et al*., 2022) e extração de lipídios proposto por Bligh & Dyer foram obtidos 26,3% de conteúdo lipídico totalizando 3,21 g L^{-1} de lipídios, o que está de acordo com valores esperados para leveduras oleaginosas, que normalmente acumulam lipídios acima de 20% (de Castro *et al.*, 2025) em condições de limitação de nitrogênio.

Os lipídios totais foram de 3,21 g L^{-1} enquanto a produtividade lipídica foi calculada em 0,02 g L^{-1} h^{-1}, Tabela 5. Rodrigues *et al*. (2025) avaliou a produtividade lipídica da *R. mucilaginosa* em cultivo utilizado meio agroindustrial (70 g L^{-1} de melaço de cana-de-açúcar e 3,4 g L^{-1} de água de maceração de milho) em batelada alimentada e obteve uma produtividade que variou de 0,02 g L^{-1} h^{-1} em 24 h de cultivo a 0,04 g L^{-1} h^{-1} em 144 h de cultivo.

Tabela 5 - Parâmetros do cultivo de *R. mucilaginosa* cultivada em meio agroindustrial (70 g L^{-1} de melaço de cana-de-açúcar e 3,4 g L^{-1} de água de maceração de milho) por 144 h

Parâmetro	
Conteúdo lipídico (%)	26,3
Lipídios totais (g L^{-1})	3,21
Carotenoides volumétricos (µg L^{-1})	847,6
Carotenoides específicos (µg g^{-1})	71,6
Biomassa (g L^{-1})	12,18
Produtividade em biomassa (g L^{-1} h^{-1})	0,08
Produtividade lipídica (g L^{-1} h^{-1})	0,02
Produtividade específica de carotenoides (µg g^{-1} h^{-1})	0,5
Produtividade volumétrica específica de carotenoides (µg L^{-1} h^{-1})	5,9

Quanto ao conteúdo lipídico (%), Arrieira *et al.* (2024) também realizou um estudo para a mesma levedura e nas mesmas condições otimizadas por Rodrigues *et al.* (2019) e encontrou percentuais próximos observados neste estudo, segundo os autores, o conteúdo lipídico usando o mesmo processo de extração foi de 23,8 %. Apesar da eficiência observada com a ruptura química, esse método apresenta limitações relacionadas ao uso de reagentes agressivos, por isso outras alternativas como métodos físicos capazes de promover a ruptura celular foram explorados.

5.2. EXTRAÇÃO LIPÍDICA

5.2.1. Testes preliminares de ruptura

5.2.1.1. Ruptura química

A Tabela 6 apresenta o conteúdo lipídico da biomassa de *R. mucilaginosa*. As biomassas receberam tratamento prévio com hidrólise ácida (ácido clorídrico) em duas concentrações como estudado por Rodrigues *et al*. (2023) sob uma temperatura de 80 ºC por 1 h.

Os ensaios buscaram comparar a eficiência da concentração do ácido clorídrico no rompimento celular e na recuperação de lipídios. Os resultados mostraram que os ensaios 1, 2 e 3 não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$), indicando que variações na concentração de HCl e nos solventes testados não comprometeram a eficiência da extração, dentro dos limites avaliados.

Os ensaios buscaram comparar a eficiência da concentração do ácido clorídrico no rompimento celular e na recuperação de lipídios. Os resultados mostraram que os ensaios 1, 2 e 3 não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$), indicando que variações na

concentração de HCl e nos solventes testados não comprometeram a eficiência da extração, dentro dos limites avaliados.

Tabela 6 - Testes de ruptura química.

Ensaio	Ruptura celular	Solventes	Conteúdo lipídico % (m m^{-1})
1	Ruptura HCl 2,4 M	Hexano e etanol.	25,0±2,0[a]
2	Ruptura HCl 2,4 M[BD]	Metanol e cloroformio	23,0±0,5[a]
3	Ruptura HCl 2 M[BD]	Metanol e cloroformio	21,0±2,1[a]
4	Ruptura HCl 2,4 M	Acetato de etila e etanol	13,9
5	Ruptura HCl 2,4 M	Hexano e isopropanol	11,6

Valores médios ± desvio padrão (n=3). Ruptura química com HCl 2,4 M a 80ºC (controle) = 23,0±0,5. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Os ensaios buscaram comparar a eficiência da concentração do ácido clorídrico no rompimento celular e na recuperação de lipídios. Os resultados mostraram que os ensaios 1, 2 e 3 não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$), indicando que variações na concentração de HCl e nos solventes testados não comprometeram a eficiência da extração, dentro dos limites avaliados.

Rodrigues *et al.* (2023) também realizaram um estudo com a levedura *R. mucilaginosa*, nas mesmas condições desse trabalho e utilizaram delineamento experimental para avaliar concentrações de ácido usados para ruptura celular. A concentração de ácido que apresentou melhor resultado foi de 2,4 M em comparação com a concentração controle que foi de 2 M. Para Rodrigues *et al.* (2023) a concentração mais alta favoreceu a recuperação de lipídios e carotenoides. A biomassa submetida a ruptura com ácido clorídrico com concentração de 2,4 M sob temperatura de 80 ºC obteve 119,4 de rendimento lipídico e 302,9 μg g^{-1} de carotenoides.

Banerjee *et al.* (2024) relata ter alcançado 109,5 ± 1,9 % (p p^{-1}) de conteúdo lipídico da levedura *Rhodotorula toruloides* Y-6987 usando tratamento térmico e ácido clorídrico. No estudo, a suspensão de células (7% p v^{-1}) foi submetida ao tratamento térmico usando a autoclave a 121 ºC por 60 min e diferentes rupturas foram avaliadas. O tratamento usando ácido foi o que obteve maior resultado, seguido do tratamento térmico (30 ºC por 5 min) e sonicação com 99,8 ± 0,03% (p p^{-1}) e extração com hexano e isopropanol e só o tratamento térmico (121 ºC por 60 min) obteve aproximadamente 84 % (p p^{-1})

Os ensaios 4 e 5, foram testes realizados sem repetição e embora tenham utilizado a mesma concentração de HCl (2,4 M) aplicada no ensaio controle, apresentaram os menores

teores de lipídios (13,9% e 11,6%, respectivamente), entretanto nesses testes, foram empregados solventes alternativos, como acetato de etila e etanol (ensaio 4), e hexano e isopropanol (ensaio 5), em substituição ao sistema tradicional de Bligh & Dyer.

O sistema Bligh & Dyer usou solventes de duas polaridades diferentes. Lu *et al.* (2015) demonstraram que a polaridade dos solventes influencia diretamente a eficiência de extração. No estudo, o etanol e o acetato de etila (solventes usados no ensaio 4) foram classificados como polar e apolar respectivamente, assim como o metanol o clorofórmio, usados no sistema Bligh & Dyer. No estudo de Lu *et al.* (2015) A combinação entre ambos na proporção 1:1 (v v^{-1}) resultou na maior eficiência de extração lipídica (4,57%) da microalga *Chlorella sp*. Entretanto a proporção 2:1 (v v^{-1}) reduziu em mais de 50% o rendimento, demonstrando que proporções adequadas entre solventes polares e apolares foi importante para maximizar a extração de lipídios, os valores de extração só foram inferiores ao método usando clorofórmio e metanol, que alcançou o percentual de 7,08%.

A Figura 14 mostra o aspecto visual dos balões contendo solvente e lipídios (a) e os lipídios após a evaporação do solvente (b). A extração com hexano (ensaio 1) (representado pelo balão 10), apesar de recuperar os lipídios de maneira eficiente, não manteve a coloração avermelhada do óleo rico em carotenoides. Esse fenômeno também foi observado nas extrações de lipídios conduzidos por Arrieira *et al.* (2024), onde houve uma perda de cor após 4 dias de extração com hexano, ocorrendo uma mudança no parâmetro b* da cor, variando de 58,5 imediatamente após a extração para -1,7 no 8° dia, indicando que o óleo ficou mais amarelado. Dessa forma, a utilização do hexano foi desconsiderada em função da baixa estabilidade dos carotenoides.

Além disso, o hexano é obtido de fonte não renovável. Segundo o guia de solvente (ICH Q3C) disposto pela FDA (2017)), o hexano é um solvente orgânico de classe 2 e seu uso e aplicação é estritamente controlada pelas Diretivas Europeias de Registro, Avaliação, Autorização e Restrição de Produtos Químicos (REACH) (Yara-Varón *et al.*, 2016), devido a seu risco toxicológico. Adicionalmente, o hexano frequentemente é alvo de investigação, pois está associado a efeitos adversos ao organismo e neuropatologias (Cravotto *et al*., 2022; Graham *et al*., 1995).

Lohani *et al*. (2015) compararam hexano e acetato de etila na extração de óleo de sementes oleaginosas. O óleo das sementes foi extraído com extratores utilizando aquecedores sob pressão (ASE 350, Dionex) e pelo método de Soxhlet. O maior rendimento foi obtido por Soxhlet com óleo de canola (42,96 ± 0,71%), seguido do acetato de etila (40,38 ± 1,39%) no

ASE a 120 °C por 90 min. Os autores observaram que não houve diferença significativa entre os solventes quanto à densidade, viscosidade e perfil de ácidos graxos dos óleos. Além disso, o uso de acetato de etila representou uma economia de 31,68 $ L^{-1} em relação ao hexano.

Figura 14 - Lipídios antes (a) e após (b) a evaporação do solvente.



Balão 4: Ruptura com HCl 2,4 M e extração com clorofórmio e metanol (Bligh & Dyer);
Balão 7: Ruptura com HCl 2,4 M e extração com acetato de etila e etanol;
Balão 10: Ruptura com HCl 2,4 M e extração com hexano e etanol. Imagens referentes aos testes à ruptura controle (Tabela 6, ensaios 2, 4 e 5, respectivamente).

Deste modo, para que a extração de lipídios seja realizada de forma ambientalmente amigável, é importante adotar medidas que reduzam o uso de solventes tóxicos. Nesse contexto, destaca-se a importância do uso de solventes verdes, como o etanol e o acetato de etila usados no ensaio 4. Ambos são considerados biossolventes, possuem baixa toxicidade e seu uso é recomendável pelo guia de solvente (IMI)-CHEM21 (Prat *et al.*, 2016).

5.2.1.2. Ruptura mecânica

Ruptura com esferas de aço inoxidável

Para avaliar a eficiência das esferas de aço inoxidável no rompimento da parede celular e extração do conteúdo lipídico da biomassa de *R. mucilaginosa* (Tabela 7), foram realizados testes com aplicação de diferentes proporções quantidade de biomassa (g) e de esferas (g), e o método Bligh & Dyer (1959) para o processo de extração de lipídios, utilizando os solventes metanol e clorofórmio (método controle).

Tabela 7 - Conteúdo lipídico com diferentes condições de ruptura mecânica com esferas de aço inoxidável usando extração com metanol e clorofórmio

Ensaios	Biomassa (g)	Esferas (g)	Proporção biomassa:esferas (g g^{-1})	Tempo de vórtex (min)	Conteúdo lipídico (%)
1	0,5	10,0	0,050	5 ciclos de 4 min	6,7
2	0,5	8,0	0,060	5 ciclos de 4 min	8,0
3	0,5	8,0	0,060	5 ciclos de 8 min	9,4
4	0,5	8,0	0,060	5 ciclos de 10 min	8,1
5	0,5	5,0	0,100	5 ciclos de 4 min	6,6
6	1,0	10,0	0,100	5 ciclos de 8 min	2,5
7	1,0	8,0	0,125	5 ciclos de 8 min	4,0
8	1,0	5,0	0,200	5 ciclos de 8 min	6,3

Os ensaios 2 a 4 (Tabela 7) usaram a mesma relação biomassa:esfera para a recuperação de lipídios de 0,06 g g^{-1}, diferindo apenas da variável, tempo de vórtex (min), que foram, respectivamente de 20, 40 e 50 min no total. Para estes ensaios a recuperação lipídica foi superior aos demais e variou de 8,0 a 9,4%, indicando que nestas condições são necessárias cerca de 17x mais esferas (0,3 mm) do que biomassa para que ocorra a ruptura celular e recuperação de lipídios. Isso faz com que aumente a relação entre a área superficial da célula em contato com área de esfera, favorecendo que a ruptura ocorra. Kot *et al*. (2020b) avaliaram diferentes métodos de ruptura celular para recuperação de lipídios de *Rhodotorula glutinis* LOCKR13, dentre eles, a homogeneização com pedras de zircônia (13,5 ± 0,7%) e hidrólise ácida (21,2 ± 1,7%). Em relação ao controle (ausência de ruptura), houve um aumento de aproximadamente 52% com a hidrólise ácida e redução de aproximadamente 3% com as pedras de zircônia.

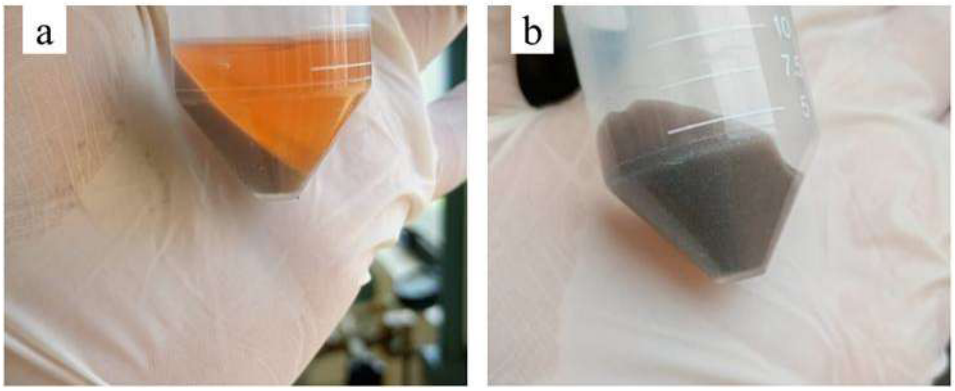
Os ensaios 5 e 1 confirmaram que menores cargas de esferas não foram efetivas para a ruptura celular. O ensaio 6 pode ser comparado ao ensaio 5, visto que teve a mesma proporção entre biomassa e esferas, com o dobro de tempo de vórtex. Nessas condições, houve redução de aproximadamente 60% na recuperação de lipídios, indicando que, mesmo que a proporção entre biomassa e esfera seja mantida, é preferível utilizar menor carga de biomassa e menor tempo de vórtex, como no caso do ensaio 5.

A ruptura mecânica por moinho de bolas usando esferas de aço inoxidável, entre outras técnicas de ruptura celular, foi estudada por da Silva *et al*. (2024). A técnica foi aplicada na microalga *Tetradesmus obliquus* para recuperação de proteínas e lipídios. O teor de proteína recuperado com essa técnica foi de 29,7 ± 1,2% valor inferior ao encontrado em outros estudos para a mesma microalga, segundo os autores, o teor encontrado para lipídios foi de

4,23 ± 0,21%. Os autores atribuíram o baixo percentual de lipídios à composição do meio de cultura (BG11), mas salientaram que a força de cisalhamento das bolas aglomerou a biomassa dificultando identificar se as células haviam sido rompidas ou não.

O aspecto visual do processo de ruptura com as esferas de aço inoxidável (em todos os ensaios) neste trabalho (Figura 15) apresentou no processo de cisalhamento, muitos resíduos, que podem ter interferido na recuperação de lipídios e consequentemente inviabilizando a possível aplicação futura em alimentos, uma vez que demandaria mais energia para purificar e separar esses resíduos do óleo microbiano. Diante deste fato optou-se por não selecionar o método de ruptura celular por meio das esferas de aço inoxidável para sequenciamento do trabalho.

Figura 15 -Aspecto visual da extração após ruptura com esferas de aço inoxidável a) tubo contendo solvente b) após a retirada do solvente.



Ruptura da parede celular com diferentes tratamentos e diferentes solventes

Após a realização dos testes preliminares, foram realizados alguns ensaios a fim de comparar as diferentes rupturas e diferentes solventes no rendimento lipídico. Foram realizados a ruptura com esferas de aço inoxidável combinadas com extração usando acetato de etila e etanol como solventes verdes, bem como a combinação de técnicas de ruptura mecânica, maceração com gral e pistilo e moinho de facas. A maceração da biomassa, poderia promover uma redução da granulometria e favorecer a interação com as esferas de aço, promovendo maior ruptura, e por consequência, maior extração dos lipídios. Além disso, a interação entre as esferas e os solventes utilizados poderiam ser responsáveis pela coloração escura da biomassa, por isso, outros solventes como o acetato de etila, etanol, hexano e isopropanol foram testados. Os experimentos estão demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Conteúdo lipídico com diferentes condições de ruptura mecânica usando diferentes solventes de extração.

Ensaios	Tratamento	Conteúdo lipídico % (m/m)
1	Esferas de aço inoxidável*	16,0±0[b]
2	Maceração *	16,0±0,7 [c]
3	Maceração **	15,63±0,1 [c]
4	Maceração[BD]	14,6±1,5 [c]
5	Maceração, moinho de facas[BD]	18,0±1 [b]
6	Maceração, moinho de facas***	24,0±0,34[a]

Valores médios ± desvio padrão (n=3). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey. *Extração com acetato de etila e etanol. **Extração com hexano e isopropanol. BD método de extração Bligh & Dyer. ***Extração com acetato de etila, etanol e ácido acético (Wittenhofer *et al.*, 2024).

A metodologia adaptada de Wittenhofer *et al.* (2024), utilizando os solventes acetato de etila, etanol e ácido acético foi aplicada no ensaio 1 e resultou em um rendimento lipídico de 16,0 ± 0,0 %. Nesse ensaio, a ruptura celular foi realizada com esferas de aço inoxidável, que apresentaram desempenho superior àquele observado nos testes descritos na Tabela 7 onde o mesmo tipo de ruptura foi utilizado, mas com menores teores de lipídios.

As biomassas que foram apenas maceradas em gral e pistilo e padronizadas em peneira 115 mesh (ensaios 2, 3 e 4) com diferentes solventes de extração como acetato de etila e etanol, hexano e isopropanol e método Bligh & Dyer não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) e obtiveram 16,0; 15,63; e 14,6%, de conteúdo lipídico, respectivamente.

A inserção do moinho de facas no processo de ruptura celular promoveu um incremento de cerca de 23%, ao comparar o ensaio 4 com o ensaio 5. Porém, com a utilização do moinho de facas e a extração de acordo com a metodologia de Wittenhofer *et al*. (2024) Adaptada usando os solventes acetato de etila, etanol e ácido acético (ensaio 6), foi obtida a maior recuperação de lipídios (24,0±0,34 %), 33% superior ao ensaio 5, que utilizou os solventes cloroformio e metanol segundo Bligh & Dyer.

O bom rendimento lipídico observado está relacionado à eficiência do moinho de facas, equipamento amplamente utilizado nas indústrias alimentícia e farmacêutica. O equipamento usa lâminas que funcionam sob agitação de um motor e promovem rompimento da parede celular por cisalhamento (Williams *et al.*, 2017) e consequentemente, a liberação dos compostos

intracelulares. Essa ação mecânica potencializa a eficiência de extração, especialemte quando é associada ao uso de solventes verdes, promovendo baixo impacto ambiental.

A biomassa empregada no ensaio 1 foi previamente macerada em gral e pistilo e padronizada com peneira de 115 mesh, procedimento também realizado nos ensaios 2, 3 e 4. Esse pré-tratamento pode ter favorecido a eficiência da ruptura quando combinada às esferas de aço inoxidável, ao contrário do que foi observado nos testes realizados da Tabela 7, em que o mesmo tipo de ruptura não alcançou resultados satisfatórios.

Além da técnica de ruptura, os solventes utilizados podem ter contribuído para a maior recuperação lipídica. Diferentemente da mistura clorofórmio:metanol usada no método de Bligh & Dyer, os solventes verdes utilizados (acetato de etila e etanol) apresentam menor densidade, o que favorece a separação de fases e facilita a recuperação dos solventes com lipídios, visto que eles se concentram na fase de topo.

Essa mesma granulometria (115 mesh) foi padronizada por Cipolatti *et al*. (2015) para a extração de carotenoides de *P. rhodozyma*. Portanto, a operação mecânica de maceração foi selecionada como etapa para a ruptura celular visando a recuperação de lipídios naturalmente enriquecidos com carotenoides obtidos na biomassa de *R*. *mucilaginosa*. Adicionalmente, essa seleção fornece suporte a um processo que venha a utilizar os aspectos da química verde, desejado pelo atual mercado consumidor de produtos potencialmente funcionais. Outro aspecto positivo é a possibilidade de escalonamento industrial utilizando moinhos aplicados em layout industrial na área de alimentos e minimização de custos de processos ao utilizar uma única operação unitária no processo para esta etapa.

Portanto, neste processo de ruptura, a biomassa seca e macerada em gral e pistilo, moída em moinho de facas e padronizada em peneira 115 mesh (Cipolatti *et al.*, 2019), utilizando acetato de etila e etanol, alcançando 24,0±0,34 % de conteúdo lipídico, foi similar ao alcançado pelo método padrão com Bligh & Dyer realizado no acompanhamento do cultivo (26,3%), quanto aos testes com ruptura química (23,0%). Assim, visando obter o método mais ambientalmente amigável, a etapa de ruptura por processos mecânicos (maceração e biomassa moída em moinho de facas) e o uso de solventes verdes (acetato de etila e etanol) foram os métodos escolhidos para dar prosseguimento ao estudo e otimizar a recuperação de lipídios a partir dessas etapas por meio de planejamento experimental.

5.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

5.3.1. *Plackett-Burman*

O planejamento experimental é uma ferramenta estatística aplicada para aprimorar metodologias analíticas, além de otimizar e controlar processos em diversas áreas da ciência e da indústria. Conforme discutido por Rodrigues; Iemma, (2014), essa metodologia permite investigar de forma sistemática os efeitos de múltiplas variáveis independentes (ou fatores) sobre uma ou mais variáveis resposta, reduzindo o número de experimentos necessários e maximizando a obtenção de informações confiáveis.

Assim, um planejamento de *Plackett-Burman* foi elaborado para avaliar oito variáveis independentes com um total de 16 ensaios, sendo 4 deles repetições do ponto central, utilizando adaptações da condição de extração de lipídios de acordo com a metodologia proposta por Wittenhofer *et al.* (2024) detalhada no item 4.5.3. Este delineamento *Plackett-Burman* (Tabela 9) foi realizado para selecionar as variáveis mais importantes na recuperação de lipídios.

Tabela 9 - Níveis codificados e valores reais (entre parênteses) do *Plackett-Burman* e conteúdo lipídico como resposta.

Ensaio	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	Y (%)
1	1(0,8)	-1(1)	1(6)	-1(3)	-1(2)	-1(3000)	1(7)	1(3)	2
2	1(0,8)	1(3)	-1(2)	1(7)	-1(2)	-1(3000)	-1(3)	1(3)	19
3	-1(0,2)	1(3)	1(6)	-1(3)	1(6)	-1(3000)	-1(3)	-1(1)	17
4	1(0,8)	-1(1)	1(6)	1(7)	-1(2)	1(5000)	-1(3)	-1(1)	3
5	1(0,8)	1(3)	-1(2)	1(7)	1(6)	-1(3000)	1(7)	-1(1)	18
6	1(0,8)	1(3)	1(6)	-1(3)	1(6)	1(5000)	-1(3)	1(3)	12
7	-1(0,2)	1(3)	1(6)	1(7)	-1(2)	1(5000)	1(7)	-1(1)	18
8	-1(0,2)	-1(1)	1(6)	1(7)	1(6)	-1(3000)	1(7)	1(3)	24
9	-1(0,2)	-1(1)	-1(2)	1(7)	1(6)	1(5000)	-1(3)	1(3)	21
10	1(0,8)	-1(1)	-1(2)	-1(3)	1(6)	1(5000)	1(7)	-1(1)	15
11	-1(0,2)	1(3)	-1(2)	-1(3)	-1(2)	1(5000)	1(7)	1(3)	26
12	-1(0,2)	-1(1)	-1(2)	-1(3)	-1(2)	-1(3000)	-1(3)	-1(1)	17
13	0(0,5)	0(2)	0(4)	0(5)	0(4)	0(4000)	0(5)	0(2)	14
14	0(0,5)	0(2)	0(4)	0(5)	0(4)	0(4000)	0(5)	0(2)	15
15	0(0,5)	0(2)	0(4)	0(5)	0(4)	0(4000)	0(5)	0(2)	18
16	0(0,5)	0(2)	0(4)	0(5)	0(4)	0(4000)	0(5)	0(2)	14

X1: Biomassa (g). X2 Vol. Mistura (mL) (ácido acético 1M, etanol e acetato de etila nas proporções 2/20/30 v v v-1). X3 Água destilada (mL) X4: Vórtex (min). X5: Acetato de etila (mL). X6: Velocidade de centrifugação (rpm). X7: Tempo de centrifugação (min). X8: Nº de extrações. Y (%): Conteúdo lipídico

De acordo com a Tabela 9, é possível observar que a variável resposta alcançou o valor máximo de lipídios no ensaio 11, com 26 %, e o valor mínimo no ensaio 1, com 2 %. Os ensaios que usaram a biomassa (variável X1) no menor nível (-1), apresentaram maiores percentuais de lipídios quando comparados aos ensaios em que a biomassa estava no maior nível (+1). Por exemplo, os ensaios 11, 8, e 9 tiveram 26, 24 e 21 % de conteúdo de lipídios, respectivamente, e ambos usaram 0,2 g de biomassa. Enquanto, os ensaios 1 e 4 tiveram 2 e 3 % de conteúdo lipídico e usaram 0,8 g de biomassa.

O ensaio 10 obteve o percentual de lipídios semelhante aos ensaios dos pontos centrais (13, 14, 15 e 16), com 15% de conteúdo lipídico, embora tenha usado uma quantidade de volume total de solvente inferior. Enquanto o ensaio 10 usou 18 mL de volume total de solventes, os pontos centrais usaram 30 mL de volume total em cada ensaio, quase o dobro da quantidade.

5.3.2. Análise de efeitos principais

A resposta do planejamento experimental (conteúdo lipídico) foi obtida nos ensaios do planejamento PB (*Plackett-Burman*), com o objetivo de verificar o efeito principal de cada variável estudada. Os efeitos de cada variável na resposta, juntamente com seu erro padrão, valor t e nível de significância (*p*-valor), estão apresentados na Tabela 10, e as variáveis significativas para um nível de confiança de 90% ($p<0,1$) estão representadas em negrito.

Tabela 10 - Efeitos estimados utilizando o conteúdo lipídico como variável dependente com análise de curvatura.

Nome	Efeito (%)	Erro padrão	*t* (6)	*p*-valor
Média	**15,82**	**0,95**	**16,63**	**>0,0001**
Curvatura	-1,03	3,81	-0,27	0,7951
Biomassa (X1)	**-9,07**	**1,90**	**-4,77**	**0,0031**
Volume da mistura (X2)	**4,73**	**1,90**	**2,49**	**0,0473**
Água destilada (X3)	**-6,40**	**1,90**	**-3,36**	**0,0152**
Vortex (X4)	2,10	1,90	1,10	0,3120
Acetato de etila (X5)	**3,43**	**1,90**	**1,80**	**0,1212**
Velocidade de centrifugação (X5)	-0,50	1,90	-0,26	0,8015
Tempo de centrifugação (X7)	2,60	1,90	1,37	0,2208
Número de extrações (X8)	2,50	1,90	1,31	0,2368

O valor do efeito indica o quanto uma mudança na variável independente em estudo, do nível inferior (-1) para o nível superior (+1) provoca alterações significativas na variável

dependente. Assim, fatores com elevado valor de efeito produzem as mudanças mais significativas em uma resposta, sendo então, considerados como os mais importantes (Rodrigues; Iemma, 2014).

A coluna do, *p*-valor, indica qual a probabilidade de uma variável independente não produzir efeito sobre as variáveis resposta. Dessa forma, baixos valores de *p* significam que existe alta probabilidade de que alterações na variável independente produzirão mudanças significativas na variável dependente (Rodrigues; Iemma, 2014). Em um planejamento PB as mudanças significativas são consideradas a um nível de confiança de 90%, o que determina que alterações nos fatores estudados só serão significativas na resposta se seu valor de *p* for menor que 0,1 ($p<0,1$).

Após a realização dos experimentos conforme o delineamento PB, foram estimados os efeitos principais que influenciaram significativamente no conteúdo lipídico (Y%), os quais estão apresentados na Tabela 10. Das 8 variáveis estudadas, a quantidade de biomassa (X1), o volume da mistura (X2) e a quantidade de água destilada (X3) influenciaram significativamente ($p<0,1$) a recuperação de lipídios. A quantidade de biomassa apresentou o efeito mais significativo e negativo, com *p*-valor de 0,0031, ou seja, ao passar do nível -1 para o nível +1, reduziu em média 9% do conteúdo de lipídios.

A variável X2 (volume da mistura) teve um efeito positivo significativo (*p*-valor de 0,0473) ao passar do nível inferior (-1) para o maior nível (+1), incrementou a recuperação lipídica em torno de 4,7%. A variável X3 (água destilada) também apresentou efeito negativo significativo (*p*-valor de 0,0152) diminuindo em média 6,40% no conteúdo lipídico. A presença de água forma o mesmo sistema de extração do Bligh & Dyer, um solvente polar, apolar e a água. De acordo com Lu *et al*. (2015), o acetato de etila possui maior afinidade por lipídios neutros enquanto o etanol possui afinidade por fosfolipídios (lipídios anfifílicos), a água facilita para que substâncias sejam mais fáceis de serem distribuídas entre as fases como ocorre no sistema Bligh & Dyer, em que a água facilita a separação da fase metanólica (polar) da fase apolar. Contudo, em excesso, a água pode deslocar lipídios para a fase polar, reduzindo a eficiência da extração e explicando o efeito negativo observado.

As demais variáveis como tempo de vórtex (X4), velocidade de centrifugação (X5) tempo de centrifugação (X7) e número de extrações (X8) não apresentaram efeitos significativos ($p>0,10$) dentro da faixa de variação estudada. Portanto, para a sequência de otimização do processo de recuperação de lipídios estas variáveis foram fixadas no menor nível

(-1). Tempo de vórtex foi fixado em 3 min, velocidade de centrifugação em 3000 rpm, tempo de centrifugação em 3 min e número de extração de 1 vez.

A variável X5 (volume do acetato de etila) apresentou um efeito positivo, porém, não significativo (p>0,1). Porém, como se trata da quantidade de solvente extrator que participa de um sistema com uma mistura extratora (X2, X3 e X4), foi estudada sequencialmente no próximo delineamento.

5.3.3. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Após a triagem das variáveis mais importantes pelo *Plackett-Burman* que tiveram maior influência no conteúdo de lipídios, foi proposto um DCCR 2^4 (Tabela 11), para otimizar a recuperação dos lipídios da biomassa de *R. mucilaginosa*.

As variáveis biomassa (X1), volume da mistura (X2), água destilada (X3) e acetato de etila (X5) foram estudadas. A biomassa (g) foi reduzida de 0,2 a 0,8 g para 0,05 a 0,25 g; o volume da mistura (mL) foi aumentado de 1 a 3 para 2 a 6 mL; a água destilada (mL) foi reduzida de 2 a 6 para 0 a 2; e o acetato de etila (mL) foi mantido de 2 a 6. A Tabela 11 mostra a matriz do planejamento, os valores reais e codificados das variáveis investigadas com a respectiva resposta de recuperação de lipídios.

Os ensaios apresentaram recuperação lipídica com valores variando entre 13,5% (ensaio 17) e 29,3% (ensaio 7). De modo geral, os resultados indicaram que a eficiência do processo de extração foi favorecida pela combinação de uma menor quantidade de biomassa, maior volume da mistura de solventes e menores volumes de acetato de etila e água.

A avaliação do modelo de segunda ordem foi realizada com base na resposta de recuperação lipídica, considerando os efeitos das variáveis independentes: concentração de biomassa, volume da mistura de solventes e volume de acetato de etila. Para validar o modelo, foram estimados o coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP), valor t, valor p (Tabela 12) e a análise de variância (ANOVA) (Tabela 13).

Para a resposta de recuperação lipídica é possível verificar que os efeitos referentes à biomassa, volume da mistura e acetato de etila foram significativos ($p \leq 0,05$), (Tabela 12). Todos os parâmetros que não tiveram efeito significativo foram adicionados à falta de ajuste para o cálculo da ANOVA (Tabela 13). O coeficiente de correlação (R) de 0,7572 assim como a relação $F_{calculado}/F_{tabelado}$ de 3,39 foram calculados (Tabela 13).

Tabela 11 - Níveis codificados e valores reais (entre parênteses) do DCCR 2^4 com 27 ensaios.

Ensaios	X1	X2	X3	X4	Y(%)	Valor predito	DR*
1	-1(0,1)	-1(3)	-1(0,5)	-1(3)	25,6	22,73	11,21
2	1(0,2)	-1(3)	-1(0,5)	-1(3)	22,5	22,73	-1,02
3	-1(0,1)	1(5)	-1(0,5)	-1(3)	29,0	27,35	5,69
4	1(0,2)	1(5)	-1(0,5)	-1(3)	25,0	27,35	-9,40
5	-1(0,1)	-1(3)	1(1,5)	-1(3)	25,1	22,73	9,44
6	1(0,2)	-1(3)	1(1,5)	-1(3)	20,9	22,73	-8,24
7	-1(0,1)	1(5)	1(1,5)	-1(3)	29,2	27,35	6,66
8	1(0,2)	1(5)	1(1,5)	-1(3)	25,7	27,35	-6,42
9	-1(0,1)	-1(3)	-1(0,5)	1(5)	20,5	19,65	4,61
10	1(0,2)	-1(3)	-1(0,5)	1(5)	19,1	19,65	-2,34
11	-1(0,1)	1(5)	-1(0,5)	1(5)	23,4	24,27	-3,72
12	1(0,2)	1(5)	-1(0,5)	1(5)	24,2	24,27	-0,29
13	-1(0,1)	-1(3)	1(1,5)	1(5)	19,0	19,65	-3,20
14	1(0,2)	-1(3)	1(1,5)	1(5)	17,1	19,65	-14,31
15	-1(0,1)	1(5)	1(1,5)	1(5)	28,4	24,27	14,63
16	1(0,2)	1(5)	1(1,5)	1(5)	26,0	24,27	-10,00
17	-2(0,05)	0(4)	0(1)	0(4)	13,7	19,51	-42,30
18	2(0,25)	0(4)	0(1)	0(4)	23,9	19,51	18,67
19	0(0,15)	-2(2)	0(1)	0(4)	18,5	20,21	-9,01
20	0(0,15)	2(6)	0(1)	0(4)	25,8	29,45	-14,01
21	0(0,15)	0(4)	-2(0)	0(4)	20,5	24,83	-20,94
22	0(0,15)	0(4)	2(2)	0(4)	22,4	24,83	-10,65
23	0(0,15)	0(4)	0(1)	-2(2)	28,2	27,92	1,13
24	0(0,15)	0(4)	0(1)	2(6)	22,2	21,71	2,47
25	0(0,15)	0(4)	0(1)	0(4)	26,5	24,83	6,34
26	0(0,15)	0(4)	0(1)	0(4)	27,1	24,83	8,55
27	0(0,15)	0(4)	0(1)	0(4)	27,9	24,83	11,29

*Desvio Relativo (%) X1: Biomassa (g). X2 Vol. Mistura (mL). X3 Água destilada (mL) X4: Acetato de etila (mL). Variáveis fixadas: tempo de vórtex (3 min), velocidade de centrifugação (3000 rpm) tempo de centrifugação (3 min) e número de extrações (1 extração)

O erro puro, foi baixo, indicando boa reprodutibilidade dos dados experimentais. 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 (Equação 9), sendo o mesmo usado para gerar as curvas de contorno (Figura 16) que descrevem a recuperação lipídica (%).

$$Y(\%) = 24,83 - 1,33\ X1^2 + 2,31\ X2 - 1,54\ X4 \quad (9)$$

Onde Y(%) é o rendimento de lipídios, X1 é a biomassa em g, X2 é o volume da mistura em mL e X4 é o acetato de etila em mL

Tabela 12 - Resultados do coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP), valor t, valor *p*.

Variável	CR	EP	t (12)	*p*-
Média	27,21	1,71	15,86	2,05
X1	0,03	0,60	0,06	0,94
$X1^2$	**-1,77**	**0,64**	**-2,76**	**0,01**
X2	**2,31**	**0,60**	**3,80**	**<0,01**
$X2^2$	-0,94	0,64	-1,46	0,16
X3	0,25	0,606	0,42	0,68
$X3^2$	-1,11	0,64	-1,73	0,10
X4	**-1,54**	**0,60**	**-2,54**	**0,02**
$X4^2$	-0,17	0,64	-0,27	0,78
$X1.X_2$	0,08	0,74	0,10	0,91
X1.X3	-0,26	0,74	-0,35	0,72
X1.X4	0,62	0,74	0,83	0,41
X2.X3	0,84	0,74	1,13	0,27
X2.X4	0,70	0,74	0,94	0,36
X3.X4	0,27	0,74	0,36	0,72

As variáveis significativas para um nível de confiança de 95% (p<0,05) estão representadas em negrito.

É possível observar que os desvios relativos variaram de 18,67% no ensaio 18 a -42,30% no ensaio 17 na Tabela 11 do DCCR.

Tabela 13 - Análise de variância (ANOVA) do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

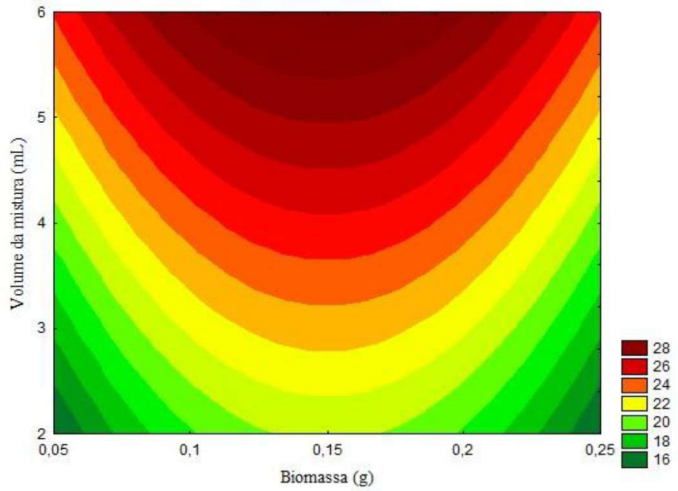
Fonte de variação	**Soma dos quadrados**	**Graus de liberdade**	**Quadrado médio**	**Fcal**	***p*-valor**
Regressão	232,3	3	77,4	10,30	0,00017
Resíduos	172,8	23	7,5		
Falta de Ajuste	171,7	21	8,2	14,8	0,06495
Erro Puro	1,1	2	0,6		
Total	405,2	26			

Com base no modelo preditivo, foram construídas as superfícies de resposta e suas respectivas curvas de contorno (Figura 16).

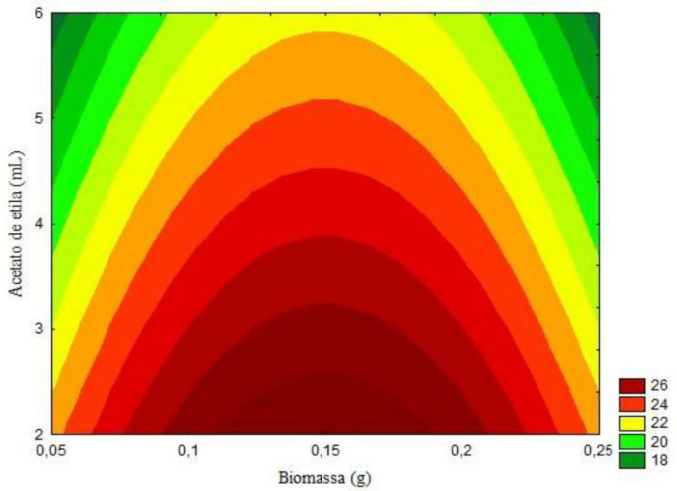
A análise dos gráficos de superfície de resposta e suas respectivas curvas de contorno permitiram visualizar as interações entre as variáveis biomassa (X1), volume da mistura (X2), acetato de etila (X4) e sua influência sobre o rendimento de lipídios. Nos três gráficos apresentados, observa-se que as regiões em vermelho correspondem às condições experimentais que proporcionaram os maiores rendimentos de lipídios.

Figura 16 - Curvas de contorno da recuperação de lipídios: a) biomassa versus volume da mistura, b) biomassa versus acetato de etila c) volume da mistura versus acetato de etila. As variáveis: tempo de vórtex, tempo de centrifugação, velocidade da centrifugação e nº de extrações foram fixas no ponto central

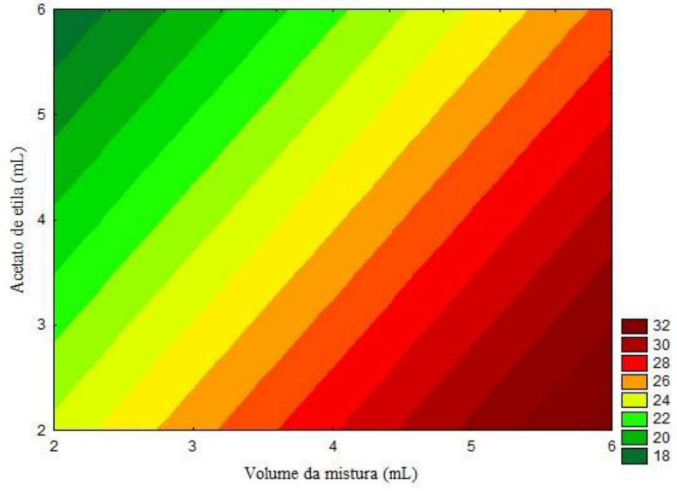
a)



b)



c)



Na Figura 16a, é possível observar que os maiores rendimentos lipídicos foram obtidos na faixa de 0,1 a 0,2 g de biomassa quando o volume da mistura se encontrava maiores que 4 mL. Isso pode ser atribuído ao fato de que um volume maior de solvente melhora o sistema de extração e o contato com a biomassa.

Enquanto na Figura 16b, na mesma faixa de quantidade de biomassa de 0,1 a 0,2 g e baixos volumes de acetato de etila (<3 mL) foram recuperados maiores conteúdos lipídicos. Isso infere que a eficiência da extração está relacionada à proporção adequada entre biomassa e solvente.

A Figura 16c, mostra que a combinação de maiores volumes da mistura de 4 a 6 mL com menores volumes de acetado de etila 2 a 3 mL favoreceram maiores recuperações de lipídios. O sistema entre solventes polares, apolares consequentemente potencializam a recuperação de lipídios. Esse sistema de extração maximizou a recuperação de lipídios. Esse fato pode ser explicado pela diferença de polaridade entre os solventes, que permite maior seletividade na solubilização dos diferentes tipos de lipídios presentes na biomassa. Enquanto o solvente apolar solubiliza preferencialmente lipídios neutros, o solvente polar auxilia na extração de lipídios anfifílicos, como também é relatado em sistemas tradicionais de extração, como Bligh & Dyer (1959).

Portanto, a partir da análise das curvas de contorno geradas pelo modelo preditivo, foram definidas as faixas ótimas para as variáveis independentes do processo de extração: biomassa (0,1 a 0,2 g), volume da mistura 4 a 6 mL e volume de acetato de etila (2 a 3 mL). O volume da água destilada não foi significativo (p>0,1) portanto, não constou da equação do modelo, consequentemente não representado nas curvas de contorno. Porém, tais superfícies em duas dimensões mantiveram as demais variáveis no ponto central (0).

5.3.4. Validação Experimental

Para a validação do modelo, foi escolhida uma condição experimental referente a 0,1 g de biomassa (nível -1), 5 mL de mistura extratora (nível +1), 0,5 mL água destilada (nível -1) e 2 mL de acetato de etila (nível -2). As demais variáveis do processo, foram fixadas no níveis -1, como estratégia para redução dos custos e de geração de resíduos de processo. Essas variáveis foram: tempo de vórtex (3 min), velocidade de centrifugação (3000 rpm), tempo de centrifugação (3 min) e número de extrações (1 re-extração). A escolha da condição experimental priorizou menores custos operacionais e menor geração de resíduos.

Na extração de validação foi alcançado 26,00 ± 1,7% de recuperação lipídica e o modelo predito estimou um 28,89%, portanto, apresentou um desvio relativo de aproximadamente 10% (-11,11%).

5.4. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO MICROBIANO

5.4.1. Perfil de ácidos graxos

Os perfis de ácidos graxos do óleo extraído de *R. mucilaginosa* CTT 7688 utilizando diferentes condições de extração: com solventes verdes (acetato de etila e etanol) e pelo método controle o Bligh & Dyer estão descritos na Tabela 14.

Os perfis de ácidos graxos do óleo de *R. mucilaginosa* foram obtidos sob três diferentes condições com solventes verdes, utilizando uma combinação de acetato de etila, etanol e ácido acético e comparados com uma condição controle usando metanol e clorofórmio (Bligh & Dyer).

Tabela 14 - Perfil de ácidos graxos do óleo da levedura *R. mucilaginosa*.

Perfil de ácidos graxos % (m m^{-1})					
Ácido graxo		**Condição 1**	**Condição 2**	**Condição 3**	**Condição 4**
Ácido mistírico (C14:0)		0,64	0,71	0,67	0,64
Ácido palmítico (C16:0)		17,85	17,10	17,21	17,52
Ácido palmitoleico (C16:1)		1,10	0,98	0,99	1,04
Ácido heptadecanoico (C17:0)		0,32	0,26	0,31	0,24
Ácido cis-10-heptadecanoico (C17:1)		0,24	0,20	0,21	0,21
Ácido esteárico (C18:0)		5,06	5,55	5,67	5,02
Ácido oleico (C18:1)		51,87	53,41	53,61	51,79
Ácido linoleico (C18:2)		16,68	15,66	15,15	16,95
Ácido linolenico (C18:3)		5,04	4,69	4,56	5,29
Ácido behênico (C22:0)		0,41	0,50	0,51	0,45
Ácido lignocerico (C24:0)		0,75	0,94	1,12	0,80
Total	Ácidos graxos saturados	24,04	25,06	25,49	24,69
	Ácidos graxos insaturados	75,59	75,65	75,19	75,94

Condição 1: Óleo extraído da condição descrita dos pontos centrais do planejamento *Plackett-Burman* (método proposto por Wittenhofer *et al.* (2024) com adaptações após ruptura com moinho de facas.0 Condição 2: Óleo extraído da condição validada pelo DCCR após 24 h. Condição 3: Óleo extraído da condição validada pelo DCCR após 144 h de armazenamento Condição 4: Óleo extraído pelo método Bligh & Dyer

Dos ácidos graxos obtidos na extração usando acetato de etila, etanol e ácido acético tanto pela condição proposta por Wittenhofer *et al.* (2024) quanto pelas condições validadas

pelo DCCR e a condição controle (Bligh & Dyer), 75% correspondem as frações de ácidos monoinsaturados e poliinsaturados (MUFAs e PUFAs), dentre eles estão o ácido oleico (C 18:1), ácido palmitoleico (C 16:1), ácido linolênico (C 18:3) e ácido linoleico (C 18:2), que são ácidos graxos de grande importância para a indústria alimentícia (Dar *et al.*, 2024), bem como para indústria farmacêutica e cosmética (Kunik *et al*., 2022).

Em todas as condições avaliadas, observou-se predominância dos ácidos graxos oleico (C18:1), palmítico (C16:0) e linoleico (C18:2). Dentre esses, o ácido oleico foi o mais abundante, com teores variando entre 51,7 % e 53,6 %, demonstrando que mesmo após as 144 h de armazenamento, o perfil lipídico do óleo se manteve estável.

Mussagy *et al*. (2021) propuseram um sistema de extração usando acetato de etila, etanol e água, para recuperar lipídios e carotenoides da levedura *Rhodotorula glutinis,* cultivada em biorreator de 7 L, em meio contendo glicose (10 g L^{-1}) como fonte de carbono e NH_4NO_3 (4 g L^{-1}) e asparagina (10 g L^{-1}) como fontes de nitrogênio, além de sais minerais como KH_2PO_4 e $MgSO_4$. A natureza polar e apolar dos solventes foi crucial para a recuperação lipídica. Em contraste a este estudo, os ácidos graxos encontrados foram predominantemente saturados de cadeia longa, onde 75 % corresponderam ao ácido margárico (C17:0), 10 % ao ácido esteárico (C18:0) e 8% ao ácido pentadecílico (C15:0).

Diferentemente ao que foi relatado por Mussagy *et al*. (2021), este estudo demonstrou que ambas as extrações incluindo a condição controle, apresentaram perfis lipídicos semelhantes, com predominância dos ácidos graxos oleico (C18:1) e linoleico, (C18:2). Tanto nas condições validadas pelo DCCR, quanto para o método controle, usando metanol e clorofórmio, os teores C18:1 e C18:2 foram respectivamente 53,41% e 53,61%, e 15,66% e 15,15%.

Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Arrieira *et al*. (2024) para os ácidos oleico (54,67 %), palmítico (17,8 %) e linoleico (16,6 % %). Os ácidos graxos C24:0 (ácido lignocerico) C22:0 (ácido behenico) e C14:0 (ácido mirístico), totalizaram um percentual de ácidos graxos superior a 1,5 % para ambos os métodos, resultado semelhante encontrado por Rodrigues *et al*. (2025) para a mesma levedura (*R. mucilaginosa* CTT 7688) e nas mesmas condições de cultivo desse estudo, no entanto, fizeram uso de solventes tradicionais como clorofórmio e metanol no processo de extração.

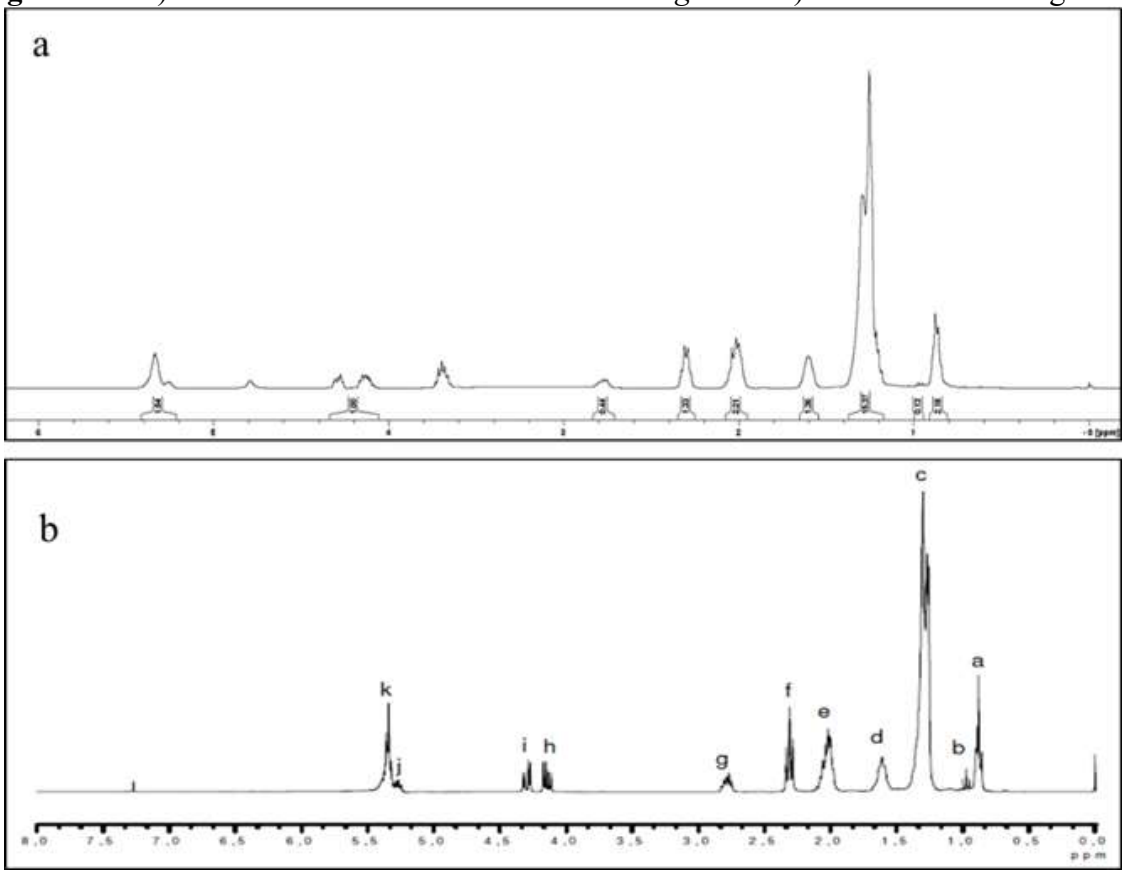
Portanto, o uso de solventes verdes como acetato de etila, etanol e ácido acético não comprometeu o perfil lipídico do óleo de *R mucilaginosa*. A estabilidade do óleo mesmo após 144 h de armazenamento reforça que a combinação desses solventes verdes compreende uma

alternativa viável ao uso de solventes tóxicos, permitindo futuras aplicações industriais, incluindo a de alimentos.

5.4.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de RMN de ^{1}H foi usada para caracterizar a composição lipídica do óleo extraído da levedura *R. mucilaginosa*, fornecendo informações sobre a presença de insaturações e o estado de degradação do óleo. O espectro de ^{1}H da amostra do óleo de *R. mucilaginosa* é demonstrado na Figura 17 a) RMN do óleo extraído de *R. mucilaginosa* na condição validada e b) padrão de triacilglicerol.

Figura 17 – a) ^{1}H RMN do óleo extraído de *R. mucilaginosa.* b) ^{1}H RMN do triacilglicerol



Os prótons de hidrogênio são sinais identificados no espectro pela faixa em que ocorre o deslocamento químico. A faixa varia entre 5,40 a 0,88 ppm e corresponde a determinados tipos de grupos funcionais (Alonso-Salces *et al.*, 2021). O sinal dos grupos metílicos pode ser usado para identificar a presença de ácidos graxos, como o oleico e linolênico, que em geral se encontram em faixas < 2 ppm.

Com base nas integrais (calculadas conforme a literatura descrita por Carneiro, Reda e Carneiro (2005) dos sinais específicos (picos) observados no espectro de RMN de 1H dos hidrogênios alifáticos e olefínicos, foram determinados o índice de iodo, índice de saponificação, peso molecular com base no índice de saponificação, acidez livre, Roa (olefínicos/alifáticos) e ácidos graxos livres.

O índice de iodo (II), calculado em 74,00 g I_2/100 g óleo, reflete um grau moderado de insaturação. O sinal olefínico referente aos prótons de hidrogênio ligados a carbono com dupla ligação, corresponde a região do espectro entre 5.40 e 5.26 ppm (Carneiro, Reda e Carneiro, 2005). Na Figura 17b (Carneiro, Reda e Carneiro, 2005), essa região é identificada pelas letras k+j. Os picos presentes nessa faixa reforçam a presença de insaturações na estrutura lipídica, devido à presença de ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados.

O índice de saponificação (IS), de 185,60 mg KOH/g, está dentro da faixa esperada (172,8 a 185,1 mg KOH/g) (Yeboah *et al.*, 2017) para óleos com TAGs de cadeias médias a longas. Segundo Yeboah *et al*. (2017) quanto menor for o índice de saponificação, maior o peso molecular médio (ou comprimento da cadeia) dos ácidos graxos presentes, indicando que a massa molecular média dos ácidos graxos presentes no óleo de *R. mucilagionsa* está coerente com o peso molecular obtido.

A massa molecular média (PM g mol^{-1}) dos triacilgliceróis (TAGs) foi estimado em 902,55 g mol^{-1}. O alto peso molecular caracteriza a presença de ácidos graxos de cadeia longa, como o oleico (C18:1) e o palmítico (C16:0), comuns em leveduras oleaginosas e observados em maior predominância no perfil de ácidos graxos descritos nesse estudo, item 5.4.1.

O Roa é um indicador de oxidação. A razão entre hidrogênios olefínicos e alifáticos equivale ao valor de Roa (2,43), para óleos vegetais esse valor não deve ser inferior a 0,66, segundo Carvalho dos Santos *et al.* (2017). De acordo com Vlahov (1999) a degradação oxidativa de óleos insaturados como o azeite de oliva, leva à formação de compostos voláteis como aldeídos (hexanal, *trans*-2-hexenal), que podem ser detectados por RMN de ^1H em regiões específicas (>9 ppm). Embora esses sinais não tenham sido detectados na amostra atual, sua futura identificação pode ser útil como marcador de degradação do óleo durante o armazenamento ou processamento.

A determinação da acidez livre do óleo extraído *de R. mucilaginosa* foi realizada por titulação conforme a norma AOCS (1980), e obteve o valor de 8,42 g/ 100 g em ácido oleico ou 5,23 mg KOH/g, valor acima do que indica a legislação para óleos prensados a frio que é de 4 mg KOH/g (Instrução Normativa nº 87/2021). O tempo de armazenamento pode contribuir

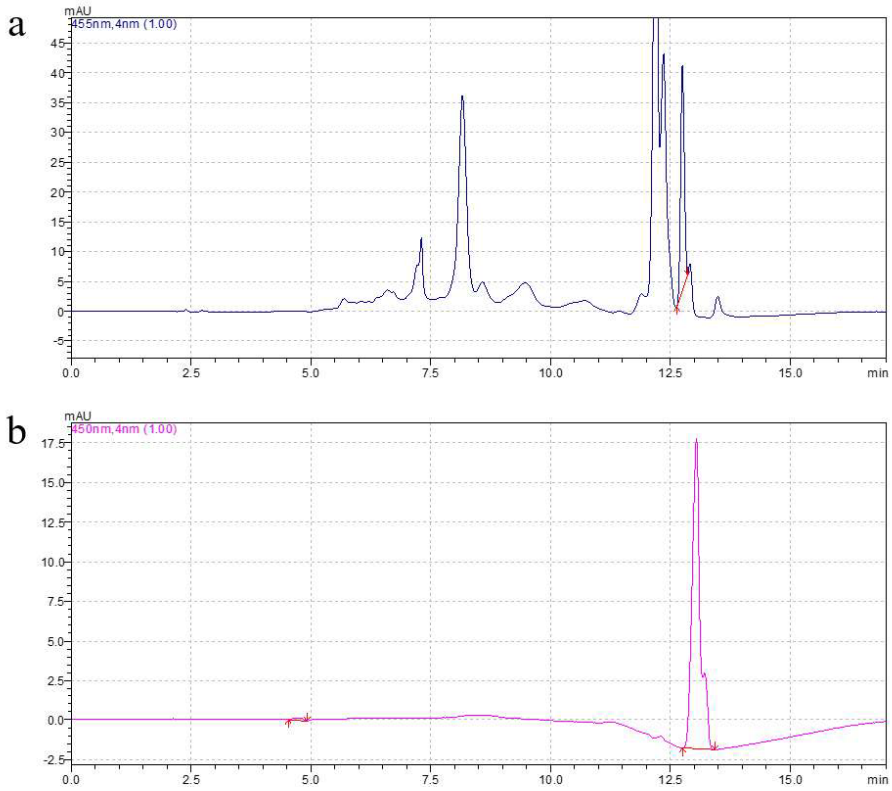
para o aumento da acidez, visto que a hidrólise de TGAs aumenta a presença de ácidos graxos livres (AGLs) e consequentemente contribui para a sua degradação.

O índice de peróxido do óleo extraído de *R. mucilaginosa* foi de 2,61 mEq O_2//kg, valor que indica baixa formação de peróxidos e, portanto, pouca oxidação lipídica. De acordo com a legislação brasileira vigente, a Instrução Normativa nº 87/2021, óleos comestíveis devem apresentar valores inferiores a 15 mEq O_2/kg, o que demonstra que o óleo microbiano analisado apresenta estabilidade inicial satisfatória, similar à de óleos vegetais frescos.

5.4.3. Determinação e identificação de β-caroteno no óleo

O cromatograma da determinação de β-caroteno no óleo de *R. mucilaginosa* é apresentado a seguir. Figura 18.

Figura 18 - Cromatograma representativo da determinação de β-caroteno em óleo de *R. mucilaginosa*: a) análise cromatográfica do óleo b) padrão β-caroteno de referência



A análise cromatográfica da amostra de óleo microbiano obtido de *R. mucilaginosa* revelou a presença de alguns picos indicando a presença de um ou mais compostos. Ao

comparar o cromatograma da amostra de óleo como padrão de referência, confirmou-se a presença de um pico, correspondente ao β-caroteno, identificado e quantificado em 5,4 μg g^{-1} de óleo. Os demais picos não foram identificados devido à ausência de padrão de referência.

A determinação da concentração de carotenoides totais no óleo foi realizada segundo a metodologia proposta por Maldonade *et al*. (2021) resultando em 48,80 μg g^{-1}, concentração semelhante ao observado por Arrieira *et al*. (2024) que encontrou 41,1 μg g^{-1} para o óleo de *R. mucilaginosa* cultivada nas mesmas condições desse trabalho e seu óleo extraído pelo método Bligh & Dyer, com clorofórmio e metanol, enquanto o óleo de *R. mucilaginosa* analisado nesse trabalho foi extraído com os solventes verdes, ácido acético, etanol e acetato de etila.

A literatura relata poucos estudos voltados especificamente para a quantificação de carotenoides em óleos microbianos. Em geral, os carotenoides totais são determinados em extratos celulares. Santos *et al.* (2021) também observaram predominância do β-caroteno no óleo de *R. toruloides*, representando 87,09% dos carotenoides detectados.

Portanto, a identificação de β-caroteno confere ao óleo de *R. mucilaginosa* características de valor agregado devido ao seu conhecido potencial antioxidante e aplicação em alimentos e cosméticos (Cipolatti *et al.*, 2019).

5.4.4. Estabilidade do óleo de *Rhodotorula mucilaginosa* ao armazenamento

A medida das coordenadas L*, a* e b* que indicam a luminosidade, cromaticidade do verde (-) ao vermelho (+) e cromaticidade do amarelo (+) ao azul (-), respectivamente, o Croma (C*) e o ângulo Hue (hº) estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Estabilidade do óleo de *Rhodotorula mucilaginosa* ao armazenamento

Dia	L*	a*	b*	Croma (C*)	Hue (h°)	ΔE^*_{ab} (Dia 1)
Dia 1	$58,4 \pm 1,5^a$	$42,0 \pm 2,2^a$	$47,9 \pm 0,5^a$	63,8	48,7	-
Dia 9	$68,4 \pm 1,3^b$	$32,3 \pm 1,5^b$	$44,9 \pm 1,8^b$	55,4	54,2	14,2

O óleo de *Rhodotorula mucilaginosa* apresentou um Ângulo Hue (hº) ou matiz com valores entre 48,7 no primeiro 1º e 54,2 ao 9º dia, situando a cor na região do amarelo-avermelhado (laranja) em ambos os dias (Tabela 15). Este aumento (5,5) no hº é consistente com a perda na cromaticidade vermelha (a*), indicando que a tonalidade se moveu ligeiramente em direção ao amarelo, indicando a presença de carotenoides produzidos pela levedura, como

o beta-caroteno, mesmo comportamento observado por Arrieira *et al*. (2024), que observou redução na cromaticidade (a*), ao 8º dia de armazenamento em relação ao dia 0, confirmando que a extração foi eficiente na recuperação desses biocompostos, produzido pela levedura, mesmo observando degradação dos pigmentos ao longo do tempo.

Quanto à intensidade da cor, calculada pelo parâmetro Cromaticidade (C*), obteve-se valores entre 63.8 e 55.4 do 1º ao 9º dia, respectivamente. Embora o valor inicial ateste uma cor vibrante e saturada, reflexo da alta concentração de carotenoides, o decréscimo de 8.4 unidades em C* indica uma perda significativa na saturação e intensidade da cor ao longo do armazenamento, reforçando a hipótese de degradação dos pigmentos.

O parâmetro L* demonstrou um aumento na luminosidade ao longo do armazenamento, variando de 58.4 ± 1.5 no primeiro dia para 68.4 ± 1.3 ao 9º dia. Este aumento na clareza (luminosidade) é um indicador da degradação dos pigmentos coloridos (carotenoides) que conferem cor e, consequentemente, menor luminosidade ao óleo. Em relação aos parâmetros de cromaticidade a* e b* que indicam uma cor predominantemente mais vermelha e mais amarela/laranja, respectivamente, notou-se que a tonalidade vermelha (a*) reduziu, de 42.0 ± 2.2 para 32.3 ±1.5 no 9º dia, o que representa uma perda de 23% na tonalidade vermelha. A cor laranja (b*) também sofreu uma leve redução, variando de 47.9 ± 0.5 para 44.9 ± 1.8. A redução significativa em ambos os parâmetros, a* e b*, é uma forte evidência da degradação oxidativa dos carotenoides ao longo dos nove dias de armazenamento."

Referente ao parâmetro Total Color Difference (ΔE*ab) que quantificou a diferença total entre a amostra do 9º dia e a amostra de referência do 1º dia, observou-se um valor de 14.2 (Tabela 15). Este valor é muito superior ao limite de percepção visual de cor (geralmente aceito como ΔE*ab ≈ 1.0), o que confirma a deterioração perceptível do óleo de *R. mucilaginosa* ao longo do armazenamento. Sendo assim, torna-se necessário um estudo mais aprofundado de técnicas viáveis para a conservação desse óleo, a fim de retardar sua deterioração e aumentar sua vida útil.

5.5. CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA INTEGRAL E A RESIDUAL

5.5.1. Composição proximal

A Tabela 16 apresenta os parâmetros de composição proximal da biomassa de *R. mucilaginosa:* biomassa integral (não extraído os lipídios) e biomassa residual (pós-extração

lipídica). Observam-se variações significativas após o processo de extração, impactando nos teores de lipídios, proteínas e carboidratos, refletindo a composição final da biomassa.

Tabela 16 - Composição proximal da biomassa integral e residual de *R. mucilaginosa.*

Parâmetros	**Média ± desvio padrão (%)**	
	Integral	**Residual**
Proteína	16,0 ± 1,0	10,34 ± 0,19
Lipídios*	26,3 ± 0,5	12,5 ± 2,1
Umidade	11,1 ± 2,0	1,9 ± 0,0
Cinzas	2,4± 0,4	6,4 ± 0,05
Carboidratos	55,8**	67,8 **

*Método Bligh Dyer **Carboidratos por diferença

O conteúdo de lipídios da biomassa integral foi de 26,3 ± 0,5%, conforme observado nas demais análises desse estudo. Após a extração dos lipídeos (extraídos na condição validada), o teor residual foi de 12,5%, indicando uma remoção parcial dos lipídios totais. A presença de frações lipídicas na biomassa residual sugere que há lipídios ligados ou que um pré-tratamento na biomassa integral ainda é necessário.

Quanto a fração proteica, a biomassa integral apresentou 16,0 ± 1,0% e a biomassa residual 10,34 ± 0,19%. Esse decréscimo pode indicar que o processo de extração promoveu a solubilização de proteínas de baixo peso molecular ou a perda de compostos nitrogenados voláteis. Apesar disso, o perfil proteico da *R. mucilaginosa* destacou-se pela predominância de albuminas (35,2 ± 1,5 mg g^{-1}), seguidas por gluteninas (21,58 ± 0,21 mg g^{-1}) e globulinas (16,1 ± 0,4 mg g^{-1}) indicando que essa biomassa pode ser explorada na indústria de alimentos, pois a presença significativa de albuminas sugere boa solubilidade e potencial aplicação na indústria de bebidas proteicas (Amara *et al*., 2023).

O teor de carboidratos foi a fração predominante em ambas as biomassas, especialmente na biomassa residual, onde representou 67,8%, em comparação com 55,8% na biomassa integral. Esse aumento proporcional ocorre como consequência da remoção parcial de lipídios e proteínas, elevando o percentual relativo dos carboidratos. Esses dados indicam que a biomassa residual ainda possui valor nutricional, podendo ser aproveitada para outros fins.

O teor de umidade na biomassa integral foi de 11,1 ± 2,0%, e reduziu-se significativamente após a extração para 1,9%, uma redução de aproximadamente 83%. A

redução do teor de umidade da biomassa residual após a extração pode ser atribuída à ação dos solventes verdes com a água. Solventes polares, como etanol e ácido acético, apresentam alta miscibilidade com a água, favorecendo a sua remoção e a dos compostos orgânicos durante a extração (Martins *et al.*, 2013). Além disso, a entrada dos solventes na parede celular contribui para o arraste de umidade, promovendo uma secagem parcial da biomassa. A baixa umidade descreve um aspecto importante para o armazenamento e estabilidade do produto.

Por fim, os teores de cinzas foram de 2,4 ± 0,4% na biomassa integral e 6,4 ± 0,05% na biomassa residual. Esse aumento pode ser explicado pela concentração de minerais após a remoção dos compostos orgânicos (lipídios e proteínas), ou ainda pela presença residual de sais provenientes da extração.

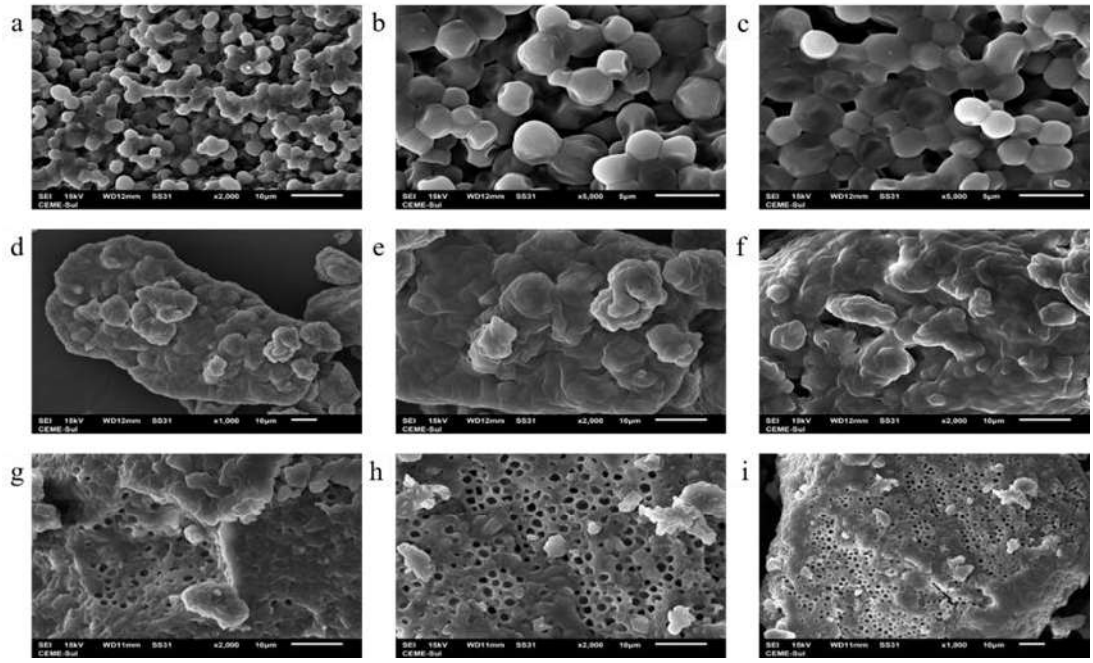
Portanto a biomassa de *R. mucilaginosa* compreende uma importante fonte de lipídios, proteínas e compostos bioativos como os carotenoides. Assim como em outros microrganismos, como microalgas (Zheng, 2024) a presença de proteínas permite seu uso em dietas vegetarianas e veganas ou em suplementos alimentares, por exemplo. Podem ser aplicadas também na indústria cosmética e farmacêutica, como base proteica, agente bioativo ou fonte de aminoácidos essenciais. O aproveitamento integral dessa biomassa contribui também para a sustentabilidade de processos biotecnológicos, promovendo a valorização de coprodutos agroindustriais e a redução de resíduos industriais.

5.5.2. Microscopia de varredura (MEV)

O MEV é um instrumento usado para a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos em alta resolução (Dedavid, 2007). A Figura 19 mostra as micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em três condições distintas da biomassa de *R. mucilaginosa*: integral (a–c), pré-tratada com moinho de facas (d–f) e biomassa residual após extração lipídica (g–i).

No presente estudo, a análise por MEV foi aplicada para observar as alterações morfológicas da biomassa de *R. mucilaginosa* em diferentes etapas do processo. Nas imagens da biomassa integral (a, b e c), observa-se a morfologia característica de leveduras, com células de formato ovalado, superfície lisa e estruturas intactas, indicativas de uma biomassa que não foi processada mecanicamente, mesmo aspecto observado por Has *et al*. (2020) para a biomassa das leveduras *Hanseniaspora uvarum e Hanseniaspora guilliermondii* que para sua preservação foram congeladas (-80 ºC) e liofilizadas.

Figura 19 - Microscopia de varredura da parede celular da biomassa de *R. mucilaginosa*. a, b, c: biomassa integral. d, e, f : biomassa pré-tratada. g, h, i: biomassa residual.



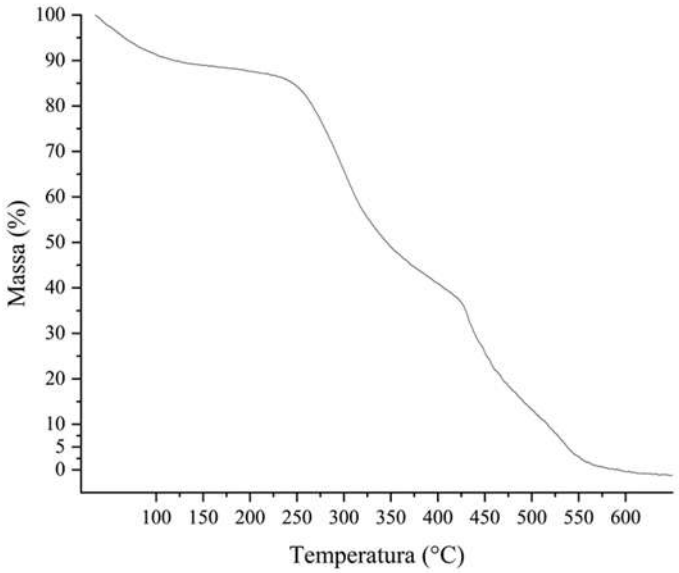
Nas imagens da biomassa processada pelo moinho de facas (Figura 19 d, e, f), observou-se uma leve degradação na estrutura, com sinais superficiais de deformações celulares, sugerindo o início da ruptura mecânica. Apesar disso, algumas células ainda mantêm parte de sua estrutura morfológica, o que pode estar relacionado a ruptura promovida por esse tipo de moagem.

Por fim, nas imagens da biomassa após ruptura e extração (biomassa residual) (Figura 19 g, h e i), observa-se uma estrutura celular com aparência deformada e a presença de vacúolos, indicando espaços intracelulares vazios. Essas estruturas sugerem que o conteúdo celular, principalmente os lipídios, foram removidos durante a etapa de extração. A perda do conteúdo interno e a degradação da parede celular são consistentes com um processo eficiente de ruptura e extração.

5.5.3. Análise termogravimétrica (TGA)

A TGA também foi feita para estudar o efeito do aumento da temperatura na biomassa integral de *R. mucilaginosa*. Na Figura 20 é possível observar que houve comportamento da biomassa em uma faixa de temperatura que compreendeu os 100 ºC a 600 ºC.

Figura 20 - Perfil de decomposição térmica da biomassa de *R. mucilaginosa*



A partir da Figura 20 é possível observar que a curva de TGA apresentou 3 eventos de perda de massa. A primeira etapa ocorre em torno de 100 °C, correspondente à evaporação da água livre presente na biomassa, com uma perda de massa próxima de 10%. Esse valor é coerente com o teor de umidade determinado gravimetricamente em estufa a 105 °C (11,1%).

A segunda região, entre 250 °C e 400 °C, é atribuída à decomposição dos principais constituintes orgânicos da biomassa como lipídios, carboidratos e proteínas e correspondeu cerca de 60 % de perda de massa, teor semelhante ao encontrado por Benerjee *et al*. (2021), que obteve o teor de 63% onde caracterizou essa fase pela de liberação de compostos voláteis. A terceira etapa, iniciada após 400 °C, refere-se à formação de resíduos inorgânicos, com estabilização da massa a partir de 550 °C, indicando o conteúdo de cinzas residuais, estimado em aproximadamente 2,5%, mesmo valor obtido a caracterização da biomassa integral.

Dessa forma, os resultados da TGA confirmam a degradação térmica em diferentes faixas de temperatura dos principais componentes químicos e demonstram que a biomassa integral de *R. mucilaginosa* é rica em fração orgânica podendo ser usada para extração de compostos orgânicos ou usada integralmente em processos biotecnológicos

6. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688 foi capaz de produzir biomassa rica em lipídios e carotenoides, a partir de co-produtos agroindustriais, como melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho, onde atingiu a produção máxima de biomassa de $12{,}18 \pm 1{,}33$ g L^{-1}. A técnica de ruptura com esferas de aço resultou em teores lipídicos de 2,5 a 9,4%, enquanto a aplicação de moinho de facas promoveu incremento de aproximadamente 23% na recuperação de lipídios.

O uso do delineamento experimental como estratégia para aumentar a recuperação lipídica também mostrou resultados satisfatórios. A condição otimizada pelo DCCR alcançou o percentual de 26,00 ± 1,7 de recuperação lipídica apresentado um desvio relativo de aproximadamente 10 %, tendo usado 0,1 g de biomassa, 5 mL de mistura extratora, 0,5 mL água destilada, 2 mL de acetato, 3 min de tempo de vórtex, 3000 rpm da velocidade de centrifugação, 3 min de tempo de centrifugação e uma re-extração, demonstrando que o modelo teve uma boa capacidade preditiva, visto que o valor encontra-se dentro da margem aceitável de variação experimental.

O perfil lipídico do óleo microbiano avaliado sob diferentes condições apresentou predominância dos ácidos graxos oleicos, palmítico e linoleico. O ácido oleico foi o mais abundante, com teores variando entre 51,7 % e 53,6 %. A análise cromatográfica confirmou a presença de β-caroteno (5,4 μg g^{-1}) e a concentração total de carotenoides no óleo extraído com solventes verdes foi de 48,80 μg g^{-1}.

A avaliação da composição proximal revelou que a biomassa integral apresentava $26{,}3 \pm 0{,}5$% de lipídios, $16{,}0 \pm 1{,}0$% de proteínas e 55,8% de carboidratos. Após a extração validada, observou-se redução dos teores de lipídios e proteínas, com aumento proporcional da fração de carboidratos (67,8%) e de cinzas ($6{,}4 \pm 0{,}05$%). A redução da umidade de 11,1% para 1,9% (aproximadamente 83%) contribui para a estabilidade e conservação da biomassa, ampliando suas possibilidades de aplicação industrial.

Portanto, o desenvolvimento de um processo sustentável baseado no uso de solventes menos tóxicos e co-produtos agroindustriais, aliado à recuperação eficiente de compostos como lipídios, reforça o potencial da *R. mucilaginosa* na biotecnologia para a produção de ingredientes funcionais, contribuindo para a valorização de resíduos e para a bioeconomia circular.

RESÍDUOS GERADOS E DESTINO

Os resíduos gerados foram separados, identificados e posteriormente acondicionados, aguardando atingir a quantidade mínima para solicitação de recolhimento pela Coordenação de Gestão Ambiental (PROINFRA-FURG).

SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

- Determinar a estabilidade oxidativa do óleo extraído nas condições otimizadas durante o armazenamento e/ou processamento térmico;
- Investigar o potencial antioxidante, antimicrobiano do óleo microbiano extraído em condições otimizadas;
- Avaliar o potencial da biomassa residual como ingrediente funcional rico em fibras e proteínas em formulações alimentícias e suplemento
- Avaliar aspectos microbiológicos e toxicológicos da biomassa residual para uso seguro em alimentos, bem como aplica-la e matrizes alimentícias
- Avaliar a bioacessibilidade e biodisponibilidade dos carotenoides presentes no óleo em modelos de digestão simulada.

REFERÊNCIAS

AĞAGÜNDÜZ, D.; ICER, M. A.; YESILDEMIR, O.; KOÇAK, T.; KOCYIGIT, E.; CAPASSO, R. The roles of dietary lipids and lipidomics in gut-brain axis in type 2 diabetes mellitus. **Journal of Translational Medicine**, 21(1), 240. 2023. doi.org/10.1186/s12967-023-04088-5

AHN, J. H.; JUNG, K. H.; LIM, E. S.; KIM, S. M.; HAN, S. O.; UM, Y. Recent advances in microbial production of medium chain fatty acid from renewable carbon resources: a comprehensive review. **Bioresource technology**, 381, 129147. 2023. doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129147

ALBERTS, B; JOHNSON, A; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WALTER. **Biologia molecular da célula,** (6a). 2017.

ALONSO-SALCES, R. M.; GALLO, B.; COLLADO, M. I.; SASÍA-ARRIBA, A.; VIACAVA, G. E.; GARCÍA-GONZÁLEZ, D. L.; GALLINA TOSCHI, T.; SERVILI, M.; BERRUETA, L. Á. 1H–NMR fingerprinting and supervised pattern recognition to evaluate the stability of virgin olive oil during storage. **Food control**, 123, 107831. 2021. doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107831

AMAROWICZ, R. **Squalene: a natural antioxidant? European journal of lipid science and technology.** 111(5), 411–412. 2009. doi.org/10.1002/ejlt.200900102

AMCHOVA, P.; SISKA, F.; RUDA-KUCEROVA, J. Food safety and health concerns of synthetic food colors: an update. **Toxics**, 12(7), 466. 2024. doi.org/10.3390/toxics12070466

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official Method Cd 8-53: Peroxide value, acetic acid-chloroform method. **Champaign**, IL: AOCS, 1980.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official Method Cd 3d-63: Acid value – titration method. **Champaign**, IL: AOCS, 1980.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction**. 2009

ARRIEIRA, N. M.; DE ÁVILA, M. T.; FLORES, W. H.; MICHELON, M.; DUARTE, S. H.; BURKERT, J. F. DE M. Oleogels based on carotenoid-rich microbial oil produced by *R. mucilaginosa* in agro-industrial by-products. **Bioprocess and biosystems engineering**. 2024. doi.org/10.1007/s00449-024-03108-y

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of AOAC (17 ed. Arlington). **AOAC International**, 2000

AVRAMIA, I.; AMARIEI, S. A simple and efficient mechanical cell disruption method using glass beads to extract β-glucans from spent brewer's yeast. **Applied Sciences**, 12(2), 648. 2022. doi.org/10.3390/app12020648

BANERJEE, A.; VITHUSHA, T.; KRISHNA, B.; KUMAR, J.; BHASKAR, T.; GHOSH, D. Pyrolysis of de-oiled yeast biomass of *Rhodotorula mucilaginosa* IIPL32: Kinetics and thermodynamic parameters using thermogravimetric analysis. **Bioresource Technology,** v. 340, p. 125534, Nov. 2021. doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125534

BENBELKHIR, F. Z.; MEDJEKAL, S. Microalgal carotenoids: a promising alternative to synthetic dyes. **Algal Research**, 66, 102823. 2022. doi.org/10.1016/j.algal.2022.102823

BLIGH, E. G.; DYER, J. W. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37(8), p. 911-917, 1959.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 14, de 28 de março de 2014. **Dispõe sobre matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, seus limites de tolerância e dá outras providências.** Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, n. 61, p. 31 mar. 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 332, de 23 de dezembro de 2019. **Dispõe sobre os requisitos para uso de gorduras *trans* industriais em alimentos**. *Diário Oficial da União: seção 1*, Brasília, DF, 24 dez. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 632, de 24 de março de 2022. **Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Produtos para Saúde**. *Diário Oficial da União: seção 1*, Brasília, DF, ed. 57, p. 160-161, 28 mar. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 87, de 15 de março de 2021**. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 16 mar. 2021.

CARNEIRO, P. I. B.; REDA, S. Y.; CARNEIRO, E. B. B. ^{1}H NMR characterization of seed oils from rangpur lime (citrus limonia) and 'sicilian' lemon (citrus limon). In: encontro de usuários de ressonância magnética nuclear; iii encontro luso-brasileiro de rmn; i encontro ibero-americano de rmn, 10., angra dos reis, rj, **Anais.** p. 124. 2005.

CETESB. A produção mais limpa (P+L) no setor sucroalcooleiro: Informações gerais. São Paulo, 2002.

CHEN, Q.; CHEN, Z.; ZHANG, J.; WANG, Q.; WANG, Y. Application of lipids and their potential replacers in plant-based meat analogs. **Trends in Food Science & Technology,** 138, 645–654. 2023. doi.org/10.1016/j.tifs.2023.07.007

CHOI, M. H.; PARK, Y. H. Production of yeast biomass using waste chinese cabbage. **Biomass and Bioenergy**, 25(2), 221–226. 2003. doi.org/10.1016/s0961-9534(02)00194-0

CIPOLATTI, E. P.; BRUNA, A. B.; SANTOS, C. S. DOS; CARLOS, A. V. B.; ELIANA, B. F.; BURKERT, J. F. DE M. Carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: antioxidant activity and stability of extracts. **African Journal of Biotechnology**, 14(23), 1982–1988. 2015. doi.org/10.5897/ajb2015.14682

CIPOLATTI, E. P.; REMEDI, R. D.; SÁ, C. DOS S.; RODRIGUES, A. B.; GONÇALVES RAMOS, J. M.; VEIGA BURKERT, C. A.; FURLONG, E. B.; FERNANDES DE MEDEIROS BURKERT, J. Use of agroindustrial byproducts as substrate for production of carotenoids with antioxidant potential by wild yeasts. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology,** 20, 101208. 2019. doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101208

CRAVOTTO, C.; FABIANO-TIXIER, A.-S.; CLAUX, O.; ABERT-VIAN, M.; TABASSO, S., CRAVOTTO, G.; CHEMAT, F. Towards substitution of hexane as extraction solvent of food products and ingredients with no regrets. **Foods,** 11(21), 3412. 2022. doi.org/10.3390/foods11213412

DA SILVA, C. A. S.; SIBAJA, K. V. M.; DE RAMOS CIZILIO, S.; MIRANDA JÚNIOR, J. R., DE CASTRO SANTANA, R.; MARTINS, M. A.; DE OLIVEIRA LEITE, M.; DE OLIVEIRA, E. B.; COIMBRA, J. S. DOS R. Evaluation of cell rupture techniques for the extraction of proteins from the microalgae *Tetradesmus obliquus*. **Phycology**, 4(1), 87–103. 2024. doi.org/10.3390/phycology4010005

DE CASTRO, A. T.; DE SOUZA, A. C.; SILVA, C. F.; MARTINEZ, S. J.; SCHWAN, R. F.; DIAS, D. R. Biotechnological valorization of yeast strains for lipids and carotenoids production from renewable resources. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology,**64, 103499. 2025. doi.org/10.1016/j.bcab.2025.103499

DEDAVID, B. A; GOMES. I. C; MACHADO. G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras – materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. 2007.

DEY, S.; NAGABABU, B. H. Applications of food color and bio-preservatives in the food and its effect on the human health. **Food Chemistry Advances,** 1, 100019. 2022 doi.org/10.1016/j.focha.2022.100019

DIETARY GUIDELINES ADVISORY COMMITTEE. **Dietary Guidelines Advisory Committee Report,** 2005.

DINH, T. T. N.; TO, K. V.; SCHILLING, M. W. Fatty acid composition of meat animals as flavor precursors. Meat and muscle biology, 5(1). 2021. doi.org/10.22175/mmb.12251

DOUGHTY, K. H.; MIDDLETON, J. A.; SALINI, M. J.; KRAGT, M. E.; PARTRIDGE, J. C.; HEMMI, J. M.; MARTIN, B. C. Food for thought: valuable bioproduction pathways emerge in a circular food production model. **Cleaner and Circular Bioeconomy,** 2024. doi.org/10.1016/j.clcb.2024.100102

DUARTE, S. H.; SANTOS, P. DOS; MICHELON, M.; OLIVEIRA, S. M. DE P.; MARTÍNEZ, J.; MAUGERI, F. Recovery of yeast lipids using different cell disruption techniques and supercritical co 2 extraction. **Biochemical Engineering Journal,** 125, 230–237. 2017. doi.org/10.1016/j.bej.2017.06.014

EMBRAPA. **Biossíntese e degradação de lipídios, carboidratos e proteínas em oleaginosas.** 2007.

FARMANI, B.; DJORDJEVIĆ, M.; MOHAMMADKHANI, S.; DJORDJEVIĆ, M. Assessing sugarcane molasses' bioactive compound content upon ultrasound-assisted hydroethanolic extraction at various pH values. **Agriculture,** 15(2), 158. 2025. doi.org/10.3390/agriculture15020158

FONSECA-ALANIZ, M. H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M. I. C.; LIMA, F. B. **O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo.** Arquivos brasileiros de endocrinologia & metabologia, 50(2), 216–229. 2006. doi.org/10.1590/s0004-27302006000200008

FONSECA, R. S. K.; LOTAS, K. M.; CORTEZ, A. C. A.; FERNANDES, F. DA S.; DE SOUZA, É. S.; DUFOSSÉ, L.; DE SOUZA, J. V. B. Exploration of carotenoid-producing *Rhodotorula* yeasts from amazonian substrates for sustainable biotechnology applications. **Current research in microbial sciences,** 8, 100373. 2025. doi.org/10.1016/j.crmicr.2025.100373

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Final Determination Regarding Partially Hydrogenated Oils**. Silver Spring, MD: U.S. FDA, 2015. Disponível em: https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/final-determination-regarding-partially-hydrogenated-oils.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Q3C — Tables and List Guidance for Industry: Residual Solvents in Pharmaceuticals. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH).** FDA. 2023.

FUTURE MARKET INSIGHTS. BETA CAROTENE MARKET. (2025) https://www.futuremarketinsights.com/reports/beta-carotene-market

GAUTÉRIO, G. V.; DA SILVA, R. M.; KARRAZ, F. C.; COELHO, M. A. Z.; RIBEIRO, B. D.; LEMES, A. C. Cell disruption and permeabilization methods for obtaining yeast bioproducts. **Cleaner chemical engineering,** 6, 100112. 2023. doi.org/10.1016/j.clce.2023.100112

GEBAUER, S. K.; BAER, D. J. Trans-fatty acids: health effects, recommendations, and regulations. In encyclopedia of human nutrition (pp. 648–652). **Elsevier,** 2023. doi.org/10.1016/b978-0-12-821848-8.00105-0

GENERALIĆ MEKINIĆ, I.; ŠIMAT, V.; RATHOD, N. B.; HAMED, I.; ČAGALJ, M. Algal carotenoids: chemistry, sources, and application. **Foods**, 12(14), 2768. 2023 doi.org/10.3390/foods12142768

GIENTKA, I.; WOJDYŁA, M. W.; LIGĘZA, E. O.; JANOWICZ, M.; RECZEK, L.; SYNOWIEC1, A.; BŁAŻEJAK, S. Enhancing Red Yeast Biomass Yield and Lipid Biosynthesis by Using Waste Nitrogen Source by Glucose Fed-Batch at Low Temperature. **Microorganisms**, v. 10, n. 6, p. 1253, 20 jun. 2022. doi.org/10.3390/microorganisms10061253.

GRAHAM, D. G.; AMARNATH, V.; VALENTINE, W. M.; PYLE, S. J.; ANTHONY, D. C. Pathogenetic studies of hexane and carbon disulfide neurotoxicity. **Critical reviews in toxicology,** 25(2), 91–112. 1995. doi.org/10.3109/10408449509021609

GREJTAK, T., LACEY; J. A.; KUNS, M. W.; HARTLEY, D. S.; THOMPSON, D. N.; FENSKE, G.; AJAYI, O. O.; QU, J. Improving knife milling performance for biomass preprocessing by using advanced blade materials. **Wear,** 522, 204714. 2023. doi.org/10.1016/j.wear.2023.204714

GURR, M. I.; HARWOOD, J. L. The nature of lipids and their place in living things. In lipid biochemistry (pp. 1–9). **Springer,** 1991. doi.org/10.1007/978-1-4615-3862-2_1

HAS, M.; FACCO, L. N.; ROSA, M. D. P.; PIETROWSKI, G. D. A. M. Caracterização morfológica e fisiológica de leveduras submetidas à preservação prolongada por congelamento a -80 ºC e liofilização. **Revista brasileira de tecnologia agroindústria,** 14(1). 2020. doi.org/10.3895/rbta.v14n1.11003

HULL, S. R.; YANG, B. Y.; VENZKE, D.; KULHAVY, K.; MONTGOMERY, R. Composition of corn steep water during steeping. **Journal of agricultural and food chemistry,** 44(7), 1857–1863.1996. doi.org/10.1021/jf950353v

JIA-WEI, K.; FU, M.; ASYRUL-IZHAR, A. B.; SURYANINGSIH, L.; UTAMA, D. T.; ALIREZALU, K.; ISMAIL-FITRY, M. R. The role of plant oils/lipids as innovative fat replacers in various food products: a review. **Applied food research,** 5(1), 101010. 2025. doi.org/10.1016/j.afres.2025.101010

JORGE, N. **Química e tecnologia de óleos vegetais**. 2009.

KENT, J. A. Animal and vegetable fats, oils, and waxes. In riegel's handbook of industrial chemistry (pp. 243–328). **Springer,** 2003. doi.org/10.1007/0-387-23816-6_8

KJELDAHL, J. **New Method for the Determination of Nitrogen**. 1883. doi:10.1038/scientificamerican10061883-6470bsupp

KOT, A. M., BŁAŻEJAK, S., KIELISZEK, M., GIENTKA, I.; BRYŚ, J. Simultaneous production of lipids and carotenoids by the red yeast *Rhodotorula* from waste glycerol fraction and potato wastewater. **Applied biochemistry and biotechnology,** 189(2), 589–607. 2019. doi.org/10.1007/s12010-019-03023-z

KOT, A. M.; BŁAŻEJAK, S.; KURCZ, A.; BRYŚ, J.; GIENTKA, I., BZDUCHA-WRÓBEL, A.; MALISZEWSKA, M.; RECZEK, L. Effect of initial pH of medium with potato wastewater and glycerol on protein, lipid and carotenoid biosynthesis by *Rhodotorula glutinis.* **Electronic journal of biotechnology,** 27, 25–31. 2017. doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.01.007

KUNIK, O.; SARIBEKOVA, D.; LAZZARA, G.; CAVALLARO, G. Emulsions based on fatty acid from vegetable oils for cosmetics. **Industrial crops and products,** 189, 115776. 2022. doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115776

LEE, W. J.; QIU, C.; LI, J.; WANG, Y. Sustainable oil-based ingredients with health benefits for food colloids and products. **Current opinion in food Science,** 43, 82–90. 2022. doi.org/10.1016/j.cofs.2021.10.004

LEI, Y.; WANG, X.; SUN, S., HE, B.; SUN, W.; WANG, K.; CHEN, Z.; GUO, Z.; LI, Z. A review of lipid accumulation by oleaginous yeasts: culture mode. **Science of the total environment,** 919, 170385. 2024 doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.170385

LENAZ, G. The role of lipids in the structure and function of membranes. In subcellular biochemistry (pp. 233–343). **Springer,** 1979. doi.org/10.1007/978-1-4615-7945-8_5

LIPKE, P. N.; OVALLE, R. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. **Journal of Bacteriology,** 180(15), 3735–3740. doi.org/10.1128/jb.180.15.3735-3740. 1998.

LIU, D.; ZENG, X. A.; SUN, D.W.; HAN, Z. Disruption and protein release by ultrasonication of yeast cells. **Innovative food science & emerging Technologies,** 18, 132–137. 2013. doi.org/10.1016/j.ifset.2013.02.006

LIU, X.; MAROUN, E.-R.; HARITOS, V. S. Valorization solutions for diverse commercial winery biomass wastes via sustainable processing. **Resources, conservation and recycling**, 215. 2025. doi.org/10.1016/j.resconrec.2025.108126

LI, Z.; LI, C.; CHENG, P.; YU, G. *Rhodotorula mucilaginosa*—alternative sources of natural carotenoids, lipids, and enzymes for industrial use. **Heliyon**, 8(11), e11505. 2022. doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11505

LODISH, H. **Biología celular y molecular**. Ed. Médica pan-americana. 2005.

LOHANI, U. C., FALLAHI, P., & MUTHUKUMARAPPAN, K. Comparison of ethyl acetate with hexane for oil extraction from various oilseeds. **Journal of the American Oil Chemists' Society,** 92(5), 743–754. 2015. doi.org/10.1007/s11746-015-2644-1

LOPES F. J. F. Avaliação da maceração dinâmica do milho após um curto período de hidratação e subseqüente quebra do pericarpo do grão. **Ciência e tecnologia de alimentos,** 19(3), 322–325. 1999. doi.org/10.1590/s0101-20611999000300005

LOPES, H. J. S.; BONTURI, N.; KERKHOVEN, E. J.; MIRANDA, E. A.; LAHTVEE, P.-J. C/N ratio and carbon source-dependent lipid production profiling in *Rhodotorula toruloides.* **Applied microbiology and biotechnology,** 104(6), 2639–2649. 2020. doi.org/10.1007/s00253-020-10386-5

LOPES, N. A.; REMEDI, R. D.; DOS SANTOS SÁ, C.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M DE. Different cell disruption methods for obtaining carotenoids by *Sporidiobolus pararoseus* and *Rhodothorula mucilaginosa*. **Food science and biotechnology**, 26(3), 759–766. 2017. doi.org/10.1007/s10068-017-0098-y

LOWERY, L. M. Dietary fat and sports nutrition: a primer. **Journal of sports science & medicine**, 3(3), 106–117. 2004.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J**.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry,** v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LU, W.; WANG, Z.; YUAN, Z. Characteristics of lipid extraction from chlorella sp. Cultivated in outdoor raceway ponds with mixture of ethyl acetate and ethanol for biodiesel production. **Bioresource technology,** 191, 433–437. 2015 doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.069

MACHADO. W. R. C. **Otimização da produção de carotenoides por *Sporodiobolus pararoseus* e influência de pré tratamentos nos meios de cultivos agroindustriais**. (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) Universidade Federal do Rio Grande. 2013.

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.

MALDONADE, I. R.; LOZADA, M. I. O.; DE OLIVEIRA, L. L.; RODRIGUES, D. B. Comunicado técnico 85: Metodologia para determinação de carotenoides totais e β-caroteno em óleo. **Brasília: Embrapa Hortaliça**, 2021.

MAOKA, T. Carotenoids as natural functional pigments. **Journal of natural medicines,** 74(1), 1–16. 2020. doi.org/10.1007/s11418-019-01364-x

MAPELLI-BRAHM, P.; GÓMEZ-VILLEGAS, P.; GONDA, M. L.; LEÓN-VAZ, A.; LEÓN, R.; MILDENBERGER, J.; REBOURS, C.; SARAVIA, V.; VERO, S.; VILA, E.; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. Microalgae, seaweeds and aquatic bacteria, archaea, and yeasts: sources of carotenoids with potential antioxidant and anti-inflammatory health-promoting actions in the sustainability era. **Marine drugs,** 21(6), 340. 2023. doi.org/10.3390/md21060340

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. Solubilidade das substâncias orgânicas. **Química Nova,** São Paulo, v. 36, n. 8, p. 1248–1255, ago. 2013. DOI: 10.1590/S0100-40422013000800026

MATSUMOTO, T.; OSAWA, T.; TANIGUCHI, H.; SAITO, A.; YAMADA, R.; OGINO, H. Mitochondrial expression of metabolic enzymes for improving carotenoid production in *Saccharomyces cerevisiae***. Biochemical Engineering Journal**, 189, 108720. 2022. doi.org/10.1016/j.bej.2022.108720

MENSINK, R. P.; KATAN, M. B. Effect of dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. **New england journal of medicine,** 323(7), 439–445. 1990. doi.org/10.1056/nejm199008163230703

METCALFE, L. D.; SCHMITZ, A. A.; PELKA, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. **Analytical Chemistry,** v. 38, n. 3, p. 514–515, 1966. DOI: 10.1021/ac60235a044.

MICHELON, M.; BORBA, T. M.; RAFAEL, R. S.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. Extraction of carotenoids from *Phaffia rhodozyma:* A comparison between different techniques of cell disruption. **Food Science and Biotechnology,** v. 21, p. 1-8, 2012. doi.org/10.1007/s10068-012-0001-9.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, Mar. 1959. doi.org/10.1021/ac60147a030.

MITREA, L.; CĂLINOIU, L.F.; TELEKY, B.E.; SZABO, K.; MARTĂU, A.G.; ŞTEFĂNESCU, B.E.; DULF, F.V.; VODNAR, D. C. Waste cooking oil and crude glycerol as efficient renewable biomass for the production of platform organic chemicals through oleophilic yeast strain of *Yarrowia lipolytica*. **Environmental Technology & Innovation**, p. 102943, out. 2022. doi.org/10.1016/j.eti.2022.102943.

MIZIORKO, H. M. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. **Archives of biochemistry and biophysics,** 505(2), 131–143. 2011. doi.org/10.1016/j.abb.2010.09.028

MUSSAGY, C. U.; REMONATTO, D.; PAULA, A. V.; HERCULANO, R. D.; SANTOS-EBINUMA, V. C.; COUTINHO, J. A. P., PEREIRA, J. F. B. Selective recovery and purification of carotenoids and fatty acids from *Rhodotorula glutinis* using mixtures of biosolvents. **Separation and purification technology,** 266, 118548. 2021. doi.org/10.1016/j.seppur.2021.118548

NAGAO, A. Oxidative conversion of carotenoids to retinoids and other products. **The journal of nutrition**, 134(1), 237s-240s. 2004. doi.org/10.1093/jn/134.1.237s

NAGARAJ, Y. N.; BURKINA, V.; OKMANE, L.; BLOMQVIST, J.; RAPOPORT, A.; SANDGREN, M.; PICKOVA, J., SAMPELS, S.; PASSOTH, V. Identification, quantification and kinetic study of carotenoids and lipids in *Rhodotorula toruloides* cbs 14 cultivated on wheat straw hydrolysate. **Fermentation,** 8(7), 300. 2022. doi.org/10.3390/fermentation8070300

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Artmed editora. 2022.

NUNES, D. D.; PILLAY, V. L.; VAN RENSBURG, E.; POTT, R. W. M. Oleaginous microorganisms as a sustainable oil source with a focus on downstream processing and cost-lowering production strategies: a review. **Bioresource technology reports,** 26, 101871. 2024. doi.org/10.1016/j.biteb.2024.101871

OCHOA-VIÑALS, N.; ALONSO-ESTRADA, D., PACIOS-MICHELENA, S.; GARCÍA-CRUZ, A.; RAMOS-GONZÁLEZ, R., FAIFE-PÉREZ, E., MICHELENA-ÁLVAREZ, L. G.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, J.; ILINÁ, A. Current advances in carotenoid production by *Rhodotorula* sp. **Fermentation,** 10(4), 190. 2024. doi.org/10.3390/fermentation10040190

O'CONNOR, C.; VARSHOSAZ, P.; MOISE, A. R. Mechanisms of feedback regulation of vitamin a metabolism. **Nutrients,** 14(6), 1312. 2022. doi.org/10.3390/nu14061312

OSORIO-GONZÁLEZ, C. S., SAINI, R.; HEGDE, K.; BRAR, S. K.; LEFEBVRE, A.; AVALOS RAMIREZ, A. Carbon/nitrogen ratio as a tool to enhance the lipid production in *Rhodosporidium toruloides*-1588 using c5 and c6 wood hydrolysates. **Journal of Cleaner Production**, 384, 135687. 2023. doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.135687

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU). **Transformando nosso mundo: A Agenda 2030 para o desenvolvimento sustentável**. ONU, 2015. Disponível em: https://brasil.un.org/sites/default/files/2020-09/agenda2030-pt-br.pdf.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **OMS divulga plano para eliminar do suprimento global de alimentos gorduras *trans* produzidas industrialmente**. 2018. Disponível em: https://www.who.int/teams/nutrition-and-food-safety/replace-trans-fat.

OTERO, D. M.; BULSING, B. A.; HUERTA, K. D. M.; ROSA, C. A.; ZAMBIAZI, R. C.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. D. M. Carotenoid-producing yeasts in the brazilian biodiversity: Isolation, identification and cultivation in agroindustrial waste. **Brazilian Journal of Chemical Engineering,** v. 36, n. 1, p. 117-129, 2019.10.1590/0104-6632.20190361s20170433

PACHECO, G. M. A. **Potencial do melaço de soja como fonte de nutrientes no cultivo de leveduras carotenogênicas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) Universidade Federal do Rio Grande. 2025.

DÍAZ, N. P.; Marileo, L.; Madrid, H.; Belezaca-Pinargote C.; Dantagnan, P. Lipid Production from Native Oleaginous Yeasts Isolated from Southern Chilean Soil Cultivated in Industrial Vinasse Residues. **Microorganisms**, v. 11, n. 10, p. 2516, 9 out. 2023. doi.org/10.3390/microorganisms11102516.

PAUL, D.; KUMARI, P. K; SIDDIQUI, N. Yeast Carotenoids: Cost-Effective Fermentation Strategies for Health Care Applications. **Fermentation,** v. 9, n. 2, p. 147, 2 fev. 2023. doi.org/10.3390/fermentation9020147.

PEREIRA, R. N.; SILVEIRA, J. M. d.; BURKERT, J. F. d. M.; ORES, J. d. 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, n. 3, p. 1099-1108, 2019.10.1590/0104-6632.20190363s20190199

RAFIQ, S.; BHAT, M. I.; SOFI, SAJAD. A.; MUZZAFAR, K.; MAJID, D.; DAR, B. N.; MAKROO, HILAL. A. Bioconversion of agri-food waste and by-products into microbial lipids: mechanism, cultivation strategies and potential in food applications. **Trends in Food Science & Technology,** 139, 104118. 2023. doi.org/10.1016/j.tifs.2023.07.015

RAHMAN, N. U.; KHAN, A.; MUHAMMAD, N.; KHAN, I., KALEEM, W. A.; KHAN, I.; KHAN, F. U.; ALAM, M. Evaluation of scutellaria linearis whole plant methanolic crude extract for antinociceptive, antipyretic and anti-inflammatory potentials**. Pharmaceutical Chemistry Journal,** 58(7), 1141 – 1146. 2024. doi.org/10.1007/s11094-024-03252-5

RAMALHO, H. F.; SUAREZ, P. A. Z. The chemistry of oils and fats and their extraction and refining processes. **Revista virtual de química,** 5(1). 2013. doi.org/10.5935/1984-6835.20130002

REDDY, A. S.; WARSHAVIAK, D. T.; CHACHISVILIS, M. Effect of membrane tension on the physical properties of dopc lipid bilayer membrane. **Biochimica et biophysica acta (bba) – biomembranes,** 1818(9), 2271–2281. 2012. doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.05.006

RIBEIRO, R. A.; BOURBON-MELO, N.; SÁ-CORREIA, I. The cell wall and the response and tolerance to stresses of biotechnological relevance in yeasts. **Frontiers in microbiology,** 13. 2022. doi.org/10.3389/fmicb.2022.953479

RIOS, D. A. D. S.; BORBA, T. D. M. D.; KALIL, S. J.; BURKERT, J. F. D. M. Rice parboiling wastewater in the maximization of carotenoids bioproduction by *Phaffia rhodozyma*. **Ciência e Agrotecnologia,** v. 39, n. 4, p. 401-410, ago. 2015. doi.org/10.1590/s1413-70542015000400011

RIOS, R. V.; PESSANHA, M. D. F.; ALMEIDA, P. F. DE; VIANA, C. L.; LANNES, S. C. DA S. Application of fats in some food products**. Food science and technology,** 34(1), 3–15. 2014. doi.org/10.1590/s0101-20612014000100001

RITCHIE, H.; REAY, D. S.; HIGGINS, P. The impact of global dietary guidelines on climate change. **Global environmental change,** 49, 46–55. 2018. doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2018.02.005

ROBLES-IGLESIAS, R.; NAVEIRA-PAZOS, C.; FERNÁNDEZ-BLANCO, C.; VEIGA, M. C.; KENNES, C. Factors affecting the optimisation and scale-up of lipid accumulation in oleaginous yeasts for sustainable biofuels production**. Renewable and sustainable energy reviews,** 171, 113043. 2023. doi.org/10.1016/j.rser.2022.113043

ROCHA, F. M. G.; ROCHA, C. H. L.; SILVA, L. C. N.; PINHEIRO, A. J. M. C. R.; MENDONÇA, A. M. S.; CANTANHEDE FILHO, A. J.; SOUSA, E. M.; ROCHA, C. Q.; ASSUNCAO HOLANDA, R.; SANTOS, J. R. A.; MONTEIRO, C. N -butanol fraction of terminalia catappa possesses anti-candida albicans properties and in vivo action on tenebrio molitor alternative infection model. **Microbial pathogenesis**, 198. 2025. doi.org/10.1016/j.micpath.2024.107133

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Experimental design and process optimization**. 1 ed. New York: CRC Press, 336 p. 2014.

RODRIGUES, T. V. D., CERQUEIRA, M. B. R.; CONTESSA, C. R.; FURLONG, E. B.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. D. M. *Rhodotorula mucilaginosa*: kinetics and production of lipids and fatty acids in agroindustrial byproducts**. Brazilian journal of chemical engineering,** 2025. doi.org/10.1007/s43153-025-00550-7

RODRIGUES, T. V. D.; CONTESSA, C. R.; BURKERT, C. A. V.; DE MEDEIROS BURKERT, J. F. D. M. Evaluation of Light-Emitting Diodes Applied to *Rhodotorula mucilaginosa* to Produce Carotenoids and Lipids. **Food and Bioprocess Technology**, 2024. doi:10.1007/s11947-024-03324-0

RODRIGUES, T. V. D.; D'AMORE, T.; TEIXEIRA, E. C.; BURKERT, J. F. D. M. Carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa* in batch and fed-batch fermentation

using agroindustrial byproducts. **Food Technol Biotechnol**, 57, n. 3, p. 388-398, Sep 2019.10.17113/ftb.57.03.19.6068

RODRIGUES, T. V. D.; TEIXEIRA, E. C.; MACEDO, L. P.; DOS SANTOS, G. M.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. D. M. Agroindustrial byproduct-based media in the production of microbial oil rich in oleic acid and carotenoids. **Bioprocess and Biosystems Engineering,** v. 45 n. 4 p. 721–732. 2022. doi:10.1007/s00449-022-02692-1

RODRIGUES, T.V.D. **Utilização de LED na produção simultânea de carotenoides e lipídios por *Rhodotorula mucilaginosa* em meio agroindustrial**. 2023. 182 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2023.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; MIEKO KIMURA; HELENA T; GODOY, J A.F. Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. **Journal of Food Composition and Analysis,** v. 21, n. 6, p. 445-463, set. 2008. doi.org/10.1016/j.jfca.2008.04.001.

RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN.; WELSCH, R. (Eds.). Plant and Food Carotenoids. **Springer US.** 2020. doi.org/10.1007/978-1-4939-9952-1

SAILWAL, M.; MISHRA, P.; BHASKAR, T.; PANDEY, R.; GHOSH, D. Time-resolved transcriptomic profile of oleaginous yeast *Rhodotorula mucilaginosa* during lipid and carotenoids accumulation on glycerol. **Bioresource technology**, 384, 129379. 2023. doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129379

SANTIAGO, T. T. A.; OLIVEIRA, J. R. M.; SALA, L.; BURKERT, J. F. M. Cell rupture by high-speed homogenization and by cold plasma to produce microbial lipids. **Brazilian journal of chemical engineering,** v. 42, p. 1-13, 2024.

SANTOS, A. S.; SALGADO, H. L. C.; BONTURI, N.; DE MELLO, R. F. A.; DA CONCEIÇÃO, L. DE K. M.; MIRANDA, E. A. Lipidomic profile of *Rhodotorula toruloides* by gc/ms and antioxidant capacity of the oil by dpph and tlc-plate methods. **South african journal of chemistry,** 75. 2021. doi.org/10.17159/0379-4350/2021/v75a20

SAWANGKEAW, R.; NGAMPRASERTSITH, S. A review of lipid-based biomasses as feedstocks for biofuels production. **Renewable and sustainable energy reviews**, 25, 97–108. 2013. doi.org/10.1016/j.rser.2013.04.007

SENTANDREU, R., HERRERO, E.; MARTINEZ, J. P.; ELORZA, M. V. **Yeast cell wall glycoproteins**, p 229–239, 1991. doi.org/10.1007/978-3-642-76074-7_18

SHAIGANI, P.; AWAD, D., REDAI, V.; FUCHS, M., HAACK, M.; MEHLMER, N.; BRUECK, T. Oleaginous yeasts- substrate preference and lipid productivity: a view on the performance of microbial lipid producers. **Microbial cell factories,** 20(1), 220. 2021. doi.org/10.1186/s12934-021-01710-3

SILVA, A. R. DA **Uso de campos magnéticos na biossíntese de carotenoides por *Sporidiobolus pararoseus* em meio agroindustrial**. (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) Universidade federal do Rio grande. 2025.

SILVA, I. Q. **Uso de campos magnéticos na produção de carotenoides e lipídios por *Rhodotorula mucilaginosa* em meio agroindustrial**. (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) Universidade federal do rio grande. 2021.

SILVA. P. G. P. DA **Campos magnéticos aplicados em cultivos com *Phaffia rhodozyma*: avaliação do crescimento, produção de carotenoides e extração com ruptura química.** (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) Universidade Federal do Rio Grande. 2020.

SILVA, P. G. P.; MUSSAGY, C. U.; LIMA, C. DE A.; SANTOS-EBINUMA, V. C.; BURKERT, J. F. DE M.; SANTOS, L. O. Sustainable approach to recover β-carotene and astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* grown in a stirred-tank bioreactor under the influence of magnetic fields. **Bioresource technology**. 390, 129906. 2023. doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129906

SINELI, P. E.; MAZA, D. D.; AYBAR, M. J.; FIGUEROA, L. I. C., VIÑARTA, S. C. Bioconversion of sugarcane molasses and waste glycerol on single cell oils for biodiesel by the red yeast *Rhodotorula glutinis* r4 from Antarctica. **Energy conversion and management**, 2022. doi.org/10.1016/j.ecmx.2022.100331

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 n. 4 p. 415–422. 2015. doi.org/10.1007/s12088-015-0533-9

SRIPHUTTHA, C.; BOONTAWAN P.; BOONYANAN, P.; CAIRNS, M. K.; BOONTAWAN A. Simultaneous Lipid and Carotenoid Production via *Rhodotorula paludigena* CM33 Using Crude Glycerol as the Main Substrate: Pilot-Scale Experiments. **International Journal of Molecular Sciences,** v. 24, n. 24, p. 17192, 6 dez. 2023. doi.org/10.3390/ijms242417192.

SUCDEN. **Sugar process flowcharts**. 2025. Disponível: www.sucden.com/en/products-and-activities/sugar/process-flowcharts/

TSIRIGKA, A., NTOULA, M.; KONTOGIANNOPOULOS, K. N.; KARABELAS, A. J.; PATSIOS, S. I. Optimization of solvent extraction of lipids from *Yarrowia lipolytica* towards industrial applications. **Fermentation**, 9(1), 35. 2022. doi.org/10.3390/fermentation9010035

UDENSI, J.; LOSKUTOVA, E.; LOUGHMAN, J.; BYRNE, H. J. Quantitative Raman analysis of carotenoid protein complexes in aqueous solution. **Molecules,** 27(15), 4724. 2022. doi.org/10.3390/molecules27154724

VIANA, N. M.; JÚNIOR, J. J. DA S.; BUENO, G. W.; MACHADO L. P.; FERREIRA, M. F. N.; TROMBETA, T. D. Análise produtiva e mercadológica de betacaroteno obtido da microalga *Dunaliella sp*: cenários atuais e perspectivas futuras. **Revista de Gestão Social e Ambiental**, v. 18, n. 2, p. e04891, 26 fev. 2024. doi.org/10.24857/rgsa.v18n2-065.

VLAHOV, G. Application of nmr to the study of olive oils. **Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy,** 35(4), 341–357. 1999. doi.org/10.1016/s0079-6565(99)00015-1

VOET, J. G.; VOET. C. W. P. (2013). **Bioquímica** (4a ed). Artmed.

WILLIAMS, O.; LESTER, E.; KINGMAN, S.; GIDDINGS, D.; LORMOR, S.; EASTWICK, C. Benefits of dry comminution of biomass pellets in a knife mill. **Biosystems engineering,** 160, 42–54. 2017. doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2017.05.011

WITTENHOFER, P.; MONTERO, L.; SCHMITZ, O. J.; MECKELMANN, S. W. Automated green sample preparation for quantitative extraction of lipids in different sample matrices. **Green Analytical Chemistry,** 10, 100128. 2024. doi.org/10.1016/j.greeac.2024.100128

WONGJAIKHAM, W., KONGPRAWES, G., WONGSAWAENG, D., NGAOSUWAN, K.; KIATKITTIPONG, W.; HOSEMANN, P.; ASSABUMRUNGRAT, S. Production of low trans-fat margarine by partial hydrogenation of palm oil using nature-friendly and catalyst-free microwave plasma technique. **Innovative food science & emerging Technologies,** 80, 103107. 2022. doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103107

YABUZAKI, J. Carotenoids database: structures, chemical fingerprints and distribution among organisms. **Database**, 2017. doi.org/10.1093/database/bax004

YAO, Y.; DING, L.; HUANG, X. Diverse functions of lipids and lipid metabolism in development**. Small methods,** 4(7). 2020. doi.org/10.1002/smtd.201900564

YARA-VARÓN, E.; FABIANO-TIXIER, A. S.; BALCELLS, M.; CANELA-GARAYOA, 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**, 6(33), 27750–27759. 2016. doi.org/10.1039/c6ra03016e

YEBOAH, E. M. O.; KOBUE-LEKALAKE, R. I.; JACKSON, J. C., MURIITHI, E. N.; MATENANGA, O.; YEBOAH, S. O. Application of high resolution NMR, FTIR, and GC–MS to a comparative study of some indigenous seed oils from Botswana. **Innovative food science & emerging technologies,** 44, 181–190. 2017. doi.org/10.1016/j.ifset.2017.05.004

YEEH, Y. *Rhodotorula*. In **encyclopedia of food microbiology,** Elsevier. 1999. (pp. 1900–1905). doi.org/10.1006/rwfm.1999.1340

YEN, H.-W.; HU, C.-Y.; LIANG, W.-S. A cost efficient way to obtain lipid accumulation in the oleaginous yeast rhodotorula glutinis using supplemental waste cooking oils (wco). **Journal of the taiwan institute of chemical engineers**, 97, 80–87. 2019. doi.org/10.1016/j.jtice.2019.02.012

ZAINUDDIN, M. F., FAI, C. K., ARIFF, A. B., RIOS-SOLIS, L., & HALIM, M. Current pretreatment/cell disruption and extraction methods used to improve intracellular lipid recovery from oleaginous yeasts. **Microorganisms,** 9(2), 251. 2021. doi.org/10.3390/microorganisms9020251

ZHENG, Xuechao; CHEN, Lin; YIN, Lei; RAO, Huan; ZHENG, Haowang; XUN, Chetian; HAO, Jianxiong. Application and prospect of microbial food Chlorella. **Heliyon**, v. 10, n. 18, p. e37025, 30 set. 2024. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e37025

ZIO, S., TARNAGDA, B., SANKARA, S., TAPSOBA, F., ZONGO, C., & SAVADOGO, A. Nutritional and therapeutic interest of most widely produced and consumed plant oils by human: a review. **Applied food research**, 5(2), 101093. 2025.