

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

BIANCA PAVAN CATARINO

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPÍDIOS MICROBIANOS DO
FUNGO FILAMENTOSO *Aspergillus oryzae***

Poços de Caldas/MG

2023

BIANCA PAVAN CATARINO

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPÍDIOS MICROBIANOS DO FUNGO
FILAMENTOSO *Aspergillus oryzae*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ariela Veloso de Paula
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Grazielle Santos Silva Andrade

Poços de Caldas/MG

2023

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Campus Poços de Caldas

Catarino, Bianca Pavan.

Extração e caracterização de lipídios microbianos do fungo filamentoso *Aspergillus oryzae* / Bianca Pavan Catarino. - Poços de Caldas, MG, 2023.
99 f. : il. -

Orientador(a): Ariela Veloso de Paula.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) -
Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2023.
Bibliografia.

1. Lipídio microbiano. 2. Extração lipídica. 3. Banho ultrassônico. 4.
Extração lipídica com solventes verdes. 5. *Aspergillus oryzae*. I. Paula,
Ariela Veloso de, orient. II. Título.

BIANCA PAVAN CATARINO

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPÍDIOS MICROBIANOS DO FUNGO
FILAMENTOSO *Aspergillus oryzae*

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Engenharia Química.

Aprovada em: 07 de março de 2023.

Profa. Dra. Ariela Veloso de Paula

Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Prof. Dr. Eric Keven Silva

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Valéria de Carvalho Santos Ebinuma

Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho



Documento assinado eletronicamente por **Valéria de Carvalho Santos Ebinuma, Usuário Externo**, em 14/03/2023, às 13:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ariela Veloso de Paula, Usuário Externo**, em 17/03/2023, às 08:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eric Keven Silva, Usuário Externo**, em 18/03/2023, às 07:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0941314** e o código CRC **3503E012**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tornar isso possível e por colocar pessoas incríveis no meu caminho.

Ao Gustavo, meu marido, pelo incentivo, compressão e paciência durante todo esse período.

Aos meus pais, Rosmeire e Carlos, por me incentivarem com a pesquisa.

Ao Renan, meu irmão, pelo incentivo.

À Prof.^a Dra. Ariela Veloso de Paula, minha orientadora, pela amizade, incentivo, compreensão e oportunidade de realizar essa pesquisa sobre sua orientação.

À Prof.^a Dra. Grazielle Santos da Silva Andrade, minha co-orientadora pela dedicação aos primeiros passos da pesquisa.

À Prof.^a Dra. Valéria de Carvalho Santos Ebinuma, por compartilhar seu conhecimento e recursos para melhoria da pesquisa.

Ao Dr. Cassamo Mussagy, pelo apoio, compreensão e suporte teórico e prático com o trabalho.

À Dra. Daniela Remonato pela amizade, e suporte prático e teórico com os lipídios.

À Amanda Noli, minha companheira de laboratório por todo apoio, amizade, transporte de fungos e ajuda com a pesquisa.

À Danielle Gonçalves pela amizade, palavras sábias e auxílio na pesquisa.

Aos meus amigos Marianne, Rhyann, João, Lucas, Priscila, Bruno, Rodney, Beatriz, Leonardo, Heloisa pelo acolhimento em Araraquara e aos bons momentos no laboratório.

Aos técnicos da UNIFAL e UNESP Cochise, Bruno, Guilherme, Adriana, Ana Lúcia, Flávio e Matheus por suporte prático e teórico indispensáveis para o desenvolvimento da pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Os óleos microbianos são uma alternativa promissora para suprir a demanda nutricional de lipídios essencialmente ingeridos através da dieta. E os fungos filamentosos pertencentes a esse grupo se destacam pela capacidade de sintetizar altas quantidades de ácidos graxos quando comparado aos outros micro-organismos oleaginosos. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial do fungo filamentoso *A. oryzae* para o acúmulo de lipídio e promover a extração lipídica utilizando solventes em banho ultrassônico, a fim de caracterizar os óleos obtidos e comparar o rendimento de extração para os diferentes solventes e mistura de solventes. A extração do lipídio microbiano em banho ultrassônico nas condições: 80 min, 50 °C e relação sólido: líquido 0,5 g:50 mL apresentou resultados mais interessantes com o uso de biomassa seca correspondendo a eficiência de 84,0%, enquanto para biomassa úmida apresentou eficiência de 50,1%. A extração lipídica com os solventes: acetato de etila, heptano, hexano, metanol, etanol e isopropanol apresentou eficiência de extração de respectivamente 96%, 94,3%, 94,6%, 100%, 84,0% e 93,7%. A composição em ácidos graxos insaturados dos lipídios extraídos pelos diferentes solventes foi predominante em relação ao teor de saturados para os solventes polares, cujo percentual dos principais ácidos graxos extraído foi: 39 – 40% ácido oleico (C18:1), 23 – 24% ácido palmítico (C16:0) e 13 – 14% ácido linoleico (C18:2) para os solventes polares. E para os solventes apolares o percentual dos principais ácidos graxos extraídos foi: 41 – 42% ácido oleico (C18:1), 36 – 33% ácido palmítico (C16:0) e 12% ácido esteárico (C18:0). E para mistura de solventes: acetato de etila: metanol, acetato de etila: etanol, acetato de etila: isopropanol nas proporções 2:1, 1:1 e 1:2 também foi extraído maior percentual de ácidos graxos insaturados e a composição dos principais ácidos graxos extraídos foi: 38 – 41% ácido oleico (C18:1), 23 – 25% ácido palmítico (C16:0) e 12 – 15% ácido linoleico (C18:2). E no melhoramento do processo foi possível reduzir o tempo de extração lipídica em banho ultrassônico para 40 min, temperatura inicial do banho ultrassônico para 30 °C que apresentou eficiência de extração lipídica de 90,7%. Sendo assim, o presente trabalho possibilitou o aprofundamento do conhecimento na extração de lipídio microbiano contribuindo assim para o incremento do conhecimento científico da área.

Palavras-chaves: lipídio microbiano; extração lipídica; banho ultrassônico; extração lipídica com solventes verdes; *Aspergillus oryzae*.

ABSTRACT

Microbial oils are a promising alternative to meet the nutritional demand of lipids essentially ingested through the diet. And the filamentous fungi belonging to this group stand out for their ability to synthesize high amounts of fatty acids when compared to other oleaginous microorganisms. Thus, the objective of this work was to evaluate the potential of the filamentous fungus *A. oryzae* for the accumulation of lipid and to promote lipid extraction using solvents in an ultrasonic bath, to characterize the oils obtained and compare the extraction yield for the different solvents and solvent mixture. The extraction of microbial lipid in an ultrasonic bath under the conditions: 80 min, 50 °C and solid: liquid ratio 0.5 g:50 mL showed more interesting results with the use of dry biomass corresponding to an efficiency of 84.0%, while for wet biomass presented efficiency of 50.1%. Lipid extraction with the solvents: ethyl acetate, heptane, hexane, methanol, ethanol and isopropanol showed extraction efficiency of respectively 96%, 94.3%, 94.6%, 100%, 84.0% and 93.7%. The unsaturated fatty acid composition of the lipids extracted by the different solvents was predominant in relation to the saturated content for the polar solvents, whose percentage of the main fatty acids extracted was: 39 – 40% oleic acid (C18:1), 23 – 24% palmitic acid (C16:0) and 13 – 14% linoleic acid (C18:2) for the polar solvents. And for the nonpolar solvents the percentage of the main extracted fatty acids was: 41 – 42% oleic acid (C18:1), 36 – 33% palmitic acid (C16:0) and 12% stearic acid (C18:0). And for mixture of solvents: ethyl acetate: methanol, ethyl acetate: ethanol, ethyl acetate: isopropanol in the proportions 2:1, 1:1 and 1:2, a higher percentage of unsaturated fatty acids and the composition of the main extracted fatty acids was: 38 – 41% oleic acid (C18:1), 23 – 25% palmitic acid (C16:0) and 12 – 15% linoleic acid (C18:2). And in improving the process, it was possible to reduce the lipid extraction time in an ultrasonic bath to 40 min, the initial temperature of the ultrasonic bath to 30 °C, which presented a lipid extraction efficiency of 90.7%. Therefore, the present work enabled the deepening of knowledge in the extraction of microbial lipids, thus contributing to the increase of scientific knowledge in the area.

Keywords: microbial lipid; lipid extraction; ultrasonic bath; lipid extraction with green solvents; *Aspergillus oryzae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Classificação dos lipídios	17
Figura 2 -	Estrutura dos ácidos graxos ômega 6 e ômega 3	20
Figura 3 -	Acúmulo de lipídios pelos fungos filamentosos.....	29
Figura 4 -	Extração de lipídio microbiano - Métodos convencionais x Extração Verde	32
Figura 5 -	Princípio dos métodos de extração de lipídios	33
Figura 6 -	Produção de biomassa ao longo do tempo	56
Figura 7 -	Extração por solvente seguida da extração em banho ultrassônico (80 min e 42 °C)	64
Figura 8 -	Influência da temperatura na extração dos lipídios microbianos em banho ultrassônico (24h de extração por solvente, 80 min banho ultrassônico).....	66
Figura 9 -	Influência do tempo na eficiência de extração lipídica	68
Figura 10 -	Comparativo da eficiência de extração lipídica utilizando biomassa seca e úmida.....	70
Figura 11 -	Avaliação da eficiência do processo de extração lipídica para biomassa seca e úmida com extração por solvente seguida da extração em banho ultrassônico (24h extração por solvente e 80 min e 50 °C em banho ultrassônico) e com extração apenas em banho ultrassônico (80 min banho ultrassônico, 50 °C)	72
Figura 12 -	Eficiência de extração de lipídio microbiano utilizando diferentes solventes orgânicos (50 °C e 80 min banho ultrassônico).....	73
Figura 13 -	Cromatografia de camada de delgada para determinação dos lipídios extraídos em banho ultrassônico utilizando solventes	76
Figura 14 -	Cromatografia de camada delgada para identificação da presença de éster no lipídio extraído	77
Figura 15 -	Eficiência de extração do lipídio microbiano utilizando mistura de solventes (80 min e 50 °C em banho ultrassônico)	78
Figura 16 -	Cromatografia de camada de delgada para determinação dos lipídios extraídos em banho ultrassônico utilizando misturas de solventes	81

Figura 17 -	Influência da relação sólido: líquido na extração de lipídio microbiano em utilizando mistura de solvente (80 min e 50 °C em banho ultrassônico).....	83
Figura 18 -	Influência da temperatura na extração de lipídio microbiano utilizando mistura de solventes (80 min em banho ultrassônico)	84
Figura 19 -	Influência do tempo de extração de lipídio microbiano em banho ultrassônico utilizando a mistura de solvente (temperatura inicial de 30 °C).....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Principais ácidos graxos encontrados na alimentação.....	19
Tabela 2 -	Comparação do uso de solventes de acordo com as normas de segurança do trabalho.....	31
Tabela 3 -	Composição dos meios de cultura.....	39
Tabela 4 -	Cultivo do <i>A. oryzae</i> nos meios de cultura A e B para avaliação dos seguintes parâmetros: concentração de biomassa, concentração de lipídio, consumo de glicose, atividade de hidrólise enzimática da lipase do micélio e caldo filtrado e pH do caldo do cultivo.....	54
Tabela 5 -	Cálculos de rendimento para avaliação influência da relação carbono/nitrogênio a partir dos meios de cultura A e B.....	54
Tabela 6 -	Avaliação da curva de crescimento <i>A. oryzae</i> função do lipídio acumulado, substrato disponível, atividade de hidrólise enzimática e pH.....	57
Tabela 7 -	Cálculos de rendimento do cultivo de biomassa por consumo de glicose, lipídio por consumo de glicose e lipídio por biomassa para a curva de crescimento do <i>A. oryzae</i>	59
Tabela 8 -	Perfil lipídico dos ácidos graxos extraídos.....	61
Tabela 9 -	Perfil de ácidos graxos obtidos do <i>A. oryzae</i> utilizando extração em banho ultrassônico com diferentes solventes.....	75
Tabela 10 -	Perfil de ácidos graxos extraídos em banho ultrassônico utilizando mistura de solventes.....	80
Tabela 11 -	Comparação do desempenho do processo cultivo e extração de lipídio microbiano do <i>A. oryzae</i>	87

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVO	16
1.1.1	Objetivo Geral.....	16
1.1.2	Objetivos Específicos	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1	LIPÍDIOS	17
2.2	LIPÍDIO MICROBIANO	21
2.3	FUNGOS FILAMENTOSOS.....	23
2.3.1	<i>Aspergillus oryzae</i>	24
2.4	EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE CULTURA NO ACÚMULO DE LIPÍDIOS.....	25
2.4.1	Carbono	25
2.4.2	Nitrogênio e oxigênio.....	26
2.4.3	Relação Carbono: Nitrogênio.....	27
2.4.4	Influência da temperatura.....	27
2.4.5	Influência do pH	27
2.5	SÍNTESE DE LIPÍDIOS POR FUNGOS FILAMENTOSOS.....	28
2.6	EXTRAÇÃO DE LIPÍDIO	30
2.6.1	Extração por ultrassom	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1	EQUIPAMENTOS	37
3.2	MATERIAIS.....	38
3.3	MICRO-ORGANISMO	38
3.4	CULTIVO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS.....	38
3.5	BIOMASSA E CALDO FILTRADO	39
3.5.1	Análise de umidade.....	40
3.5.2	Atividade de hidrólise enzimática lipolítica	40
3.5.3	Determinação da concentração de glicose.....	41
3.5.4	Preparação da biomassa para extração.....	41
3.6	EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO DE LIPÍDIO MICROBIANO	42

3.6.1	Extração em banho ultrassônico	42
3.6.2	Avaliação do tempo de extração por solvente aliado ao ultrassom.....	43
3.6.3	Influência da temperatura de extração de lipídio em banho ultrassônico	43
3.6.4	Influência do tempo de extração de lipídio em banho ultrassônico	43
3.6.5	Avaliação da extração em banho ultrassônico para biomassa seca e úmida.....	44
3.6.6	Avaliação da extração em banho ultrassônico para biomassa seca e úmida sem pré-tratamento	44
3.6.7	Extração de lipídio microbiano em banho ultrassônico utilizando solventes orgânicos.....	44
3.6.8	Extração de lipídio microbiano em banho ultrassônico utilizando mistura de solventes.....	45
3.6.9	Melhoramento do processo de processo de extração do lipídio microbiano	45
3.6.9.1	Relação sólido: líquido na extração de lipídio microbiano em banho ultrassônico utilizando mistura de solventes	45
3.6.9.2	Temperatura de extração de lipídio microbiano em banho ultrassônico utilizando mistura de solventes	46
3.6.9.3	Tempo de extração de lipídio microbiano em banho ultrassônico utilizando mistura de solventes	46
3.6.10	Extração de lipídios totais	46
3.7	PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS	47
3.8	CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA	48
3.9	CÁLCULOS DO CULTIVO	48
3.9.1	Concentração de biomassa (X).....	48
3.9.2	Concentração de lipídio (P).....	49
3.9.3	Rendimento de biomassa por substrato ($Y_{X/S}$)	49
3.9.4	Rendimento de produto por substrato ($Y_{P/S}$)	49
3.9.5	Rendimento de produto por biomassa ($Y_{P/X}$)	50

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1	CULTIVO DO <i>A. ORYZAE</i>	51
4.1.1	Influência da relação carbono nitrogênio no acúmulo de lipídio microbiano	51
4.1.2	Curva de crescimento do <i>Aspergillus oryzae</i>	55
4.2	EXTRAÇÃO DE LIPÍDEO MICROBIANO	60
4.2.1	Extração de Lipídios Totais	60
4.2.2	Extração de lipídio microbiano em banho ultrassônico	63
4.2.2.1	Influência da extração de lipídio microbiano por solvente seguida da extração em banho ultrassônico.....	63
4.2.2.2	Influência da temperatura na extração do lipídio microbiano em banho ultrassônico	65
4.2.2.3	Influência do tempo em banho ultrassônico na extração	67
4.2.2.4	Comparação do processo de extração em banho ultrassônico utilizando biomassa úmida e seca.....	69
4.2.2.5	Influência da extração por solvente seguida da extração de lipídio em banho ultrassônico	71
4.2.2.6	Extração de lipídio microbiano em banho ultrassônico utilizando solventes orgânicos.....	73
4.2.2.7	Extração de lipídio microbiano em banho ultrassônico utilizando mistura de solventes	77
4.2.2.8	Melhoramento do processo de extração do lipídio microbiano em banho ultrassônico	82
4.3	COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO DO PROCESSO ESTUDADO: CULTIVO E EXTRAÇÃO DE LIPÍDIO MICROBIANO DO <i>A. ORYZAE</i>	86
5	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO

Lipídios microbianos são óleos produzidos por micro-organismos oleaginosos, constituem esse grupo as leveduras, microalgas, fungos filamentosos e algumas bactérias. Estes são capazes de acumular de 20% a 80% de lipídios em sua biomassa durante o crescimento em meios de cultivo favoráveis. (MIAO *et al.*, 2020). Considerando a importância dos lipídios como macronutrientes responsáveis por diversas funções vitais ao organismo, destacam-se os obtidos a partir de óleos microbianos, por serem compostos de ácidos graxos que não podem ser sintetizados pelo corpo humano, como os ácidos graxos poli-insaturados (PATEL *et al.*, 2020).

Atualmente, o estudo dos lipídios microbianos tem-se intensificado visando melhorar a competitividade econômica, comparada aos óleos de origem vegetal e animal, apresentando benefícios com relação ao espaço reduzido de cultivo e produção, além de não oferecer competição com a produção de alimentos, menor tempo de cultivo quando comparados com a produção de óleos de origem vegetal, menor demanda de espaço, boa aplicabilidade de produção em grande escala, independência de local, estação e clima (BELLOU *et al.*, 2016; BENTO *et al.*, 2021; VENDITTI; HERR; HANSEN, 2020; ZHAO, *et al.*, 2019).

Desse modo, em termos gerais a processo de extração lipídica é influenciado pela demanda energética, matéria-prima e tecnologias aplicadas, assim para tornar viável esse processo é importante o estudo da demanda energética, aplicada desde o cultivo até a extração desses óleos microbianos (SHI; HANDLER; SHONNARD, 2019).

Ademais, os fungos filamentosos possuem a capacidade de sintetizar altas quantidades de ácidos graxos, quando comparados a outros micro-organismos oleaginosos (PATEL *et al.*, 2020). Um aspecto de grande relevância para a produção do lipídio microbiano é a semelhança do perfil de ácidos graxos com os óleos vegetais, pois, a concentração de ácidos graxos saturados e

insaturados varia entre 25-45% e 50-55%, respectivamente (KARAMEROU; WEBB, 2019; KUMAR; SINGH; KORSTAD, 2017; MHLONGO *et al.*, 2021).

Os ácidos graxos poli-insaturados produzidos pelos micro-organismos são considerados um potencial na suplementação alimentar, uma vez que possuem um papel importante na constituição e funcionalidade de diversos tecidos dos mamíferos (SAKURADANI *et al.*, 2009). Um exemplo é o ácido araquidônico (ARA) presente no leite materno e constituinte dos tecidos cerebrais, e o ácido docosaexaenoico (DHA) que possui potencial para ser aplicado na prevenção de problemas cardíacos e doenças neurológicas (HUSSAIN *et al.*, 2013).

Variáveis como o cenário econômico e a busca constante por uma dieta saudável em prol da saúde, ganharam destaque sob o contexto social, nos últimos anos. Consequentemente, houve maior estímulo por parte das indústrias e o desenvolvimento de pesquisas a fim de desenvolver produtos capazes de atender a tais finalidades (ABILHÔA *et al.*, 2020).

Os lipídios acumulados por micro-organismos oleaginosos tornaram-se atrativos para suprir essa demanda nutricional. No entanto, os métodos de extração convencionais apresentam dificuldades para extração do lipídio intracelular devido à rigidez da membrana plasmática e dificuldade de interação do lipídio microbiano com o solvente, promovendo uma extração com baixo rendimento (GORTE *et al.*, 2020).

Desse modo, os métodos de extração lipídica convencionais utilizados são Folch, Soxhlet (FORFANG *et al.*, 2017), Bligh e Dyer, extração por solvente (CHEN *et al.*, 2020).

Embora os métodos citados anteriormente ainda sejam muito aplicados, estudos recentes surgiram com o propósito de tornar o processo de extração menos nocivos à saúde humana, utilizando solventes verdes e tecnologias de extração com menor exigência energética. Desse modo, o método de extração de lipídio microbiano por ultrassom é promissor na quebra da parede celular da biomassa, facilitando a extração do lipídio (GONZÁLEZ- BALDERAS *et al.*, 2020). Ademais, torna-se possível a redução da quantidade de solvente utilizado

e o tempo de extração, se comparado com o método de extração de Bligh e Dyer (KUMAR; SINGH; KORSTAD, 2019).

Segundo Carvalho *et al.* (2018), na última década, estudos foram realizados com diferentes espécies de fungos, buscando a maior capacidade de acumular lipídios durante a fase de crescimento; dentre elas destacam-se o *Aspergillus oryzae*, *Mortierella isabellina*, *Humicola lanuginosa*, *Mortierellavinacea* e *Mucorcircinelloides*. Os autores observaram que a produção de ácidos graxos poli-insaturados está diretamente relacionada à idade do micélio, ou seja, a fração era maior em micélios jovens e diminuía à medida que eles envelheciam.

Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo avaliar potencial do *Aspergillus oryzae* no acúmulo do lipídio microbiano e promover a extração em banho ultrassônico dos lipídios microbianos utilizando solvente únicos e mistura de solventes.

1.1 OBJETIVO

1.1.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve por objetivo geral avaliar o processo de extração, em banho ultrassônico, dos lipídios microbianos do fungo filamentoso *Aspergillus oryzae*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar o potencial do *Aspergillus oryzae* para produção de lipídio.
- b) Melhorar o processo de extração de lipídio microbiano utilizando banho ultrassônico.
- c) Avaliar de sistemas de extração utilizando solventes e misturas de solventes.
- d) Caracterizar o perfil do lipídio microbiano quanto à composição em ácidos graxos.

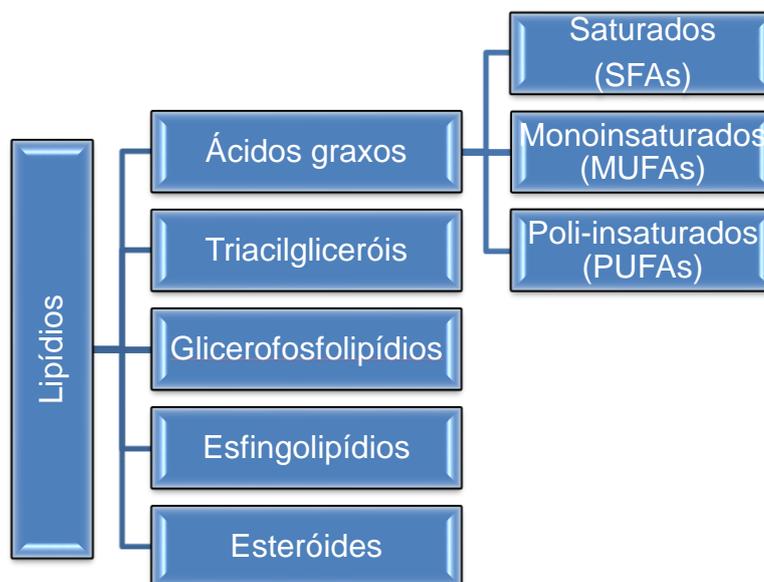
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LIPÍDIOS

O termo lipídio se originou do grego, onde a palavra *lipos* significa gordura. São compostos orgânicos com estruturas bastante variadas, que apresentam moderada solubilidade em água, entretanto, são solúveis em componentes apolares como éter e clorofórmio (MARZZOCO; TORRE, 2007, p.89).

Os lipídios podem ser divididos em: ácidos graxos, triacilgliceróis, glicerofosfolipídios, esfingolipídios e esteróides, apresentado na Figura 1.

Figura 1 - Classificação dos lipídios



Fonte: Autora (2023).

Os ácidos graxos são os lipídeos mais simples, formados por ácidos carboxílicos, cujo comprimento tende a variar de 4 a 36 carbonos, podendo ser saturados, insaturados ou poli-insaturados. Os triacilgliceróis também podem ser denominados triglicerídeos ou triglicérides, e são uma forma de armazenamento energético no organismo, são formados pela reação de esterificação de três

ácidos graxos com uma molécula de glicerol. (MARZZOCO; TORRE, 2007, p.89). Os glicerofosfolipídios são conhecidos como fosfolípidos, são derivados do glicerol e possuem uma molécula de fosfato em sua estrutura. Já os esfingolipídios possuem uma cadeia longa de hidrocarbonetos ligada por um amino álcool, presente nesse grupo os glicolipídeos, encontrados no cérebro e nos tecidos. E por fim, os esteróides são caracterizados pela presença do grupo tetracíclico em sua estrutura (NELSON; COX, 2018).

Ainda por definição, os ácidos graxos podem ser divididos em dois grandes grupos: saturados e insaturados, e estes últimos em mono-insaturados e poli-insaturados. Os ácidos graxos saturados (SFAs) são aqueles que apresentam em sua cadeia de carbono apenas ligações simples, enquanto os ácidos graxos insaturados apresentam, pelo menos, uma ligação dupla em sua cadeia. Os ácidos graxos mono-insaturados (MUFAs) apresentam apenas uma ligação dupla entre seus carbonos da cadeia, enquanto os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) apresentam duas ou mais ligações duplas entre seus carbonos (HUSSAIN *et al.*, 2013). A Tabela 1 apresenta alguns dos ácidos graxos, as classificações quanto as saturações e as principais fontes de alimentos que são encontrados.

Tabela 1- Principais ácidos graxos encontrados na alimentação

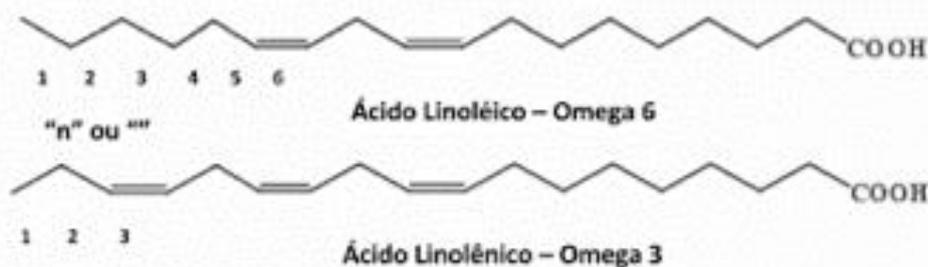
Nome comum do ácido graxo		Classificação	Principais fontes alimentares
Caprílico	C8:0	SFA	Óleo de coco
Laúrico	C12:0	SFA	Óleo de coco
Mirístico	C14:0	SFA	Gordura de leite, óleo de coco, óleo de noz-moscada
Palmítico	C16:0	SFA	Maioria das gorduras e óleos
Esteárico	C18:0	SFA	Gordura animal e manteiga de cacau
Oleico	C18:1	MUFA	Gordura animal e vegetal, principalmente óleo de oliva
Linoleico	C18:2	PUFA	Óleo de amendoim, óleo de milho, óleo de algodão, óleo de gengibre, óleo de girassol
Linolênico	C18:3	PUFA	Óleo de soja, óleo de canola, óleo de gérmen de trigo, óleo de linhaça
Araquidônico	C20:0	SFA	Óleo de amendoim
Gadoleico	C20:1	MUFA	Óleo de peixe, óleo de animais marinhos
Erúcico	C22:1	MUFA	Óleo de mostarda, óleo de peixe e óleo de colza

Fonte: Adaptado de PAULA (2011) modificado.

Para mais, os PUFAs podem ainda ser classificados de acordo com a posição na cadeia de carbonos onde se encontra, como a primeira ligação dupla em relação à extremidade metil do ácido graxo, por exemplo PUFAs n-3 e n-6, os quais apresentam sua primeira ligação dupla no carbono 3 e no carbono 6 da cadeia respectivamente (HUSSAIN *et al.*, 2013). Exemplos destes ácidos graxos essenciais é o ácido linoleico e linolênico - ômega 6 e 3, apresentados na Figura 2 que deve ser obtido a partir da alimentação ou suplementação alimentar, sendo

absorvido no duodeno, mais especificamente nas células chamadas enterócitos, absorvidos na forma de micélios devido a ligação com os ácidos biliares, e disponibilizado na corrente sanguínea ligado a proteínas específicas (PERINI *et al.*, 2010).

Figura 2 - Estrutura dos ácidos graxos ômega 6 e ômega 3



Fonte: AGUIAR NETO (2018, p.20).

Com relação aos micro-organismos oleaginosos, os fungos filamentosos são considerados os principais produtores de lipídios do tipo PUFA (MHLONGO *et al.*, 2021). Exemplos destes são o ácido docosaexaenoico (DHA) e o ácido eicosapentaenoico (EPA), que desempenha funções metabólicas e imunológicas importantes atuando de modo benéfico nos aspectos fisiológicos, genéticos e imunológicos, bem como à saúde neuro e cardiovascular, além do diabetes mellitus e na supressão de células tumorais (BELLOU, 2016; DEMIR; GÜNDES, 2020; PATEL *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2018).

Acrescenta-se que os PUFAs também podem ser utilizados como agentes antimicrobianos, tendo como característica a segurança e eficácia no controle de patógenos humanos resistentes, como alternativa aos antibióticos tradicionais (ALI-HASSAN-SAYEGH *et al.*, 2016).

2.2 LIPÍDIO MICROBIANO

O termo lipídio microbiano é a tradução do inglês *single cell oil* (SCO) para denominar os lipídios produzidos por micro-organismos oleaginosos. Todos os organismos são capazes de produzir lipídios como parte do seu metabolismo, podendo esta capacidade variar de 1% a mais de 80% do peso seco do micro-organismo. Deste modo, os micro-organismos capazes de acumular mais de 20% de lipídio em peso seco são considerados micro-organismos oleaginosos (DEMIR; GÜNDES, 2020; KARAMEROU; WEBB, 2019; MHLONGO *et al.*, 2021).

Normalmente os lipídios sintetizados por micro-organismos possuem uma cadeia não ramificada cujo número de carbonos varia de 4 a 28, podendo ser ácidos graxos saturados, quando apresentam apenas ligações simples em sua cadeia, ou ácidos graxos mono ou poli-insaturados, quando apresentam ligações duplas em sua cadeia (PATEL *et al.*, 2020).

A aplicação dos óleos obtidos a partir dos micro-organismos depende da sua composição (FORFANG *et al.*, 2017). Os ácidos graxos saturados podem ser mais adequados para a produção de biodiesel, enquanto os ácidos graxos poli-insaturados são mais adequados para fins nutracêuticos (HUSSAIN *et al.*, 2013; PATEL *et al.*, 2020; SPALVINS; VAMZA; BLUMBERGA, 2019).

Os termos alimentos funcionais e nutracêuticos estão sendo muito trabalhados no meio científico, uma vez que apresentam propriedades importantes no bem-estar físico e mental, além de prevenir e, por vezes, tratar algumas doenças (VALENZUELA *et al.*, 2014).

Muitas vezes, os alimentos funcionais e nutracêuticos são tratados como sinônimos, sendo, contudo, diferentes. Os alimentos funcionais podem ser naturais ou industrialmente processados, e quando consumidos em níveis eficazes dentro da dieta apresentam resultados positivos à saúde. Por outro lado, os alimentos nutracêuticos são ingeridos na forma de cápsulas ou

comprimidos para suprir a insuficiência na dieta. Neste grupo os mais conhecidos são os carotenoides e lipídios (GRANATO *et al.*, 2020).

Os lipídios são responsáveis por realizar funções biológicas essenciais no organismo humano, considerados grandes aliados na suplementação alimentar (MARZZOCO; TORRE, 2017; MOTTA, 2003). Em consequência de sua aplicabilidade, a pesquisa por lipídios de origem microbiana tem-se intensificado, trazendo benefícios relacionados ao aspecto econômico e nutricional, uma vez que a obtenção destes lipídios de fontes animais, principalmente peixes de águas profundas, tem-se tornado um desafio cada vez maior, dado o crescimento populacional e mudanças climáticas (JI; LEDESMA-AMARO, 2020).

Um exemplo desta situação pôde ser observado em um estudo realizado por Jovanovic *et al.* (2021), o qual demonstrou que a quantidade e composição de PUFAs presentes nos peixes de águas profundas tem-se modificado devido às condições climáticas locais. No estudo foi observado que a capacidade de produção de PUFAs em peixes nativos tendem a reduzir os valores de 0,22% do peso bruto para 0,08% no próximo século. Isso poderá acarretar uma deficiência de PUFAs em aproximadamente 90% da população mundial. Desse modo, o autor salienta sobre a necessidade de buscar novas fontes de obtenção de PUFAs.

No mais, os óleos microbianos se apresentam como uma fonte alternativa sustentável, quando comparado aos óleos vegetais, com potencial de aplicação muito abrangente, incluindo o seu uso na produção de biocombustíveis, na indústria oleoquímica e aplicação em produtos nutracêuticos, especialmente desejáveis como suplementos alimentares, fornecendo ácidos graxos específicos (DEMIR; GÜNDES, 2020; CAROTA *et al.*, 2018; CARVALHO *et al.*, 2018).

Com base neste impacto do aumento populacional, escassez de fonte natural e mudanças climáticas que ocorrem nos últimos anos no planeta Terra, alguns estudos já demonstraram a obtenção de PUFAs a partir de agentes microbianos, como: ácido γ -linolênico (GLA) no fungo *Mucorcircinelloides*, ácido araquidônico (AA) no fungo *Mortierella alpina* e ácido eicosapentaenoico (EPA) pela levedura *Yarrowialipolytica* (BELLOU, 2016).

Porém, os métodos ainda utilizados para a obtenção destes lipídios, principalmente no processo de extração, apresentam dificuldades devido à complexidade de extração do lipídio intracelular. Deste modo, a eficiência da extração lipídica é baixa, inviabilizando a sua aplicação a nível comercial, o que justifica a pesquisa e desenvolvimento de melhores métodos e materiais para este processo (GORTE *et al.*, 2020).

Como previamente relatado, os óleos microbianos podem ser produzidos principalmente por fungos filamentosos, conforme apresentado a seguir.

2.3 FUNGOS FILAMENTOSOS

Os fungos filamentosos podem ser denominados bolores e pertencem ao Reino Fungi, um dos maiores reinos de organismos eucariontes. Estes possuem grande importância biotecnológica, estando presentes nos processos industriais alimentícios e farmacêuticos, podendo ser utilizados na biodegradação e tratamento de efluentes (DE ABREU; ROVIDA; PAMPHILE, 2015; MADIGAN *et al.*, 2016, p. 555)

Além da importância biotecnológica já aplicada na indústria, estudos demonstram que estes micro-organismos produzem lipídios que podem ser aplicados na produção de biocombustível ou na suplementação alimentar, devido a sua estrutura química (CARVALHO *et al.*, 2018; DALMAS NETO *et al.*, 2020).

O interesse por fungos filamentosos ocorre em virtude da capacidade de acumular mais de 80% de lipídio em sua biomassa seca. Ademais, o interesse por esse grupo ocorre devido ao crescimento independente da presença de luz, podendo assim serem cultivados em biorreatores, e dessa forma, destacam-se quando comparado às microalgas (BARDHAN *et al.*, 2019; GORTE *et al.*, 2020).

Acrescenta-se que seu ciclo de crescimento é muito rápido, se comparado ao crescimento de plantas e animais, tendo duração de 5 a 10 dias para realização da biossíntese do lipídio microbiano (SPALVINS; VAMZA;

BLUMBERGA, 2019). No mais, o crescimento dos fungos filamentosos não sofre influência pelas mudanças climáticas e geográficas, sendo capazes de crescer em uma gama de substratos e produzir lipídios de alta pureza (BENTO *et al.*, 2021; DEMIR; GÜNDES, 2020).

Os fungos filamentosos se destacam ainda pela capacidade de sintetizar lipídios que substituem óleos de origem vegetal e se diferenciam pela aplicação potencializada em escala industrial (DEMIR; GÜNDES, 2020; GORTE *et al.*, 2020). Salienta-se ainda que os fungos filamentosos se destacam em relação às leveduras no acúmulo de ácidos graxos essenciais como linoleico (C18:2) e α -linolênico (C18:3) (BELLOU, 2016).

2.3.1 *Aspergillus oryzae*

O *A. oryzae* caracteriza-se por ser um fungo filamentoso aeróbio, pertencente ao filo *Ascomycota* que apresenta temperatura ótima de crescimento entre 32 - 36 °C (± 1 °C), sendo inviável seu crescimento em temperaturas acima de 44 °C. O seu pH ótimo de crescimento varia entre 5 e 6, sendo que para germinação tolera uma variação de pH entre 2 e 8 (MHLONGO *et al.*, 2021; GOMI, 2014, p. 92).

A. oryzae é considerado um micro-organismo *Geralmente Reconhecido como Seguro* (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA), e sua segurança foi apoiada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) na produção de metabólitos primários e secundários. Também ganhou destaque nas culturas e culinárias japonesas e chinesas, devido à sua característica de produção das enzimas amilase, protease e lipase (HE, Bin *et al.*, 2019; WAKAI *et al.*, 2019). Desempenha um papel fundamental na fabricação de alimentos asiáticos, como saquê, shoyu (molho de soja) e missô (pasta de soja). Além disso, é a principal fonte da indústria de ácido kójico (TROIANO; ORSAT; DUMONT, 2020).

Estudo utilizando o fungo filamentoso *Aspergillus oryzae* foi realizado utilizando águas residuais de processamento de batatas diluídas em 25% e

obteve acúmulo de $3,5 \text{ gL}^{-1}$ de lipídios, sendo os principais ácidos graxos encontrados: ácido palmítico (11,6%), ácido palmitoleico (15,6%), ácido esteárico (19,3%), ácido oleico (30,3%), ácido linolênico (5,5%) e ácido linoleico (6,5%) (MUNIRAJ *et al.*, 2013).

Além das características de cada espécie, as condições de cultura também devem ser muito bem avaliadas, tanto para o cultivo dos micro-organismos como para o acúmulo do lipídio de interesse.

2.4 EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE CULTURA NO ACÚMULO DE LIPÍDIOS

A produção de óleo microbiano depende tanto da genética da cepa utilizada, como também das condições do meio de cultivo dos fungos filamentosos, que apresentam influência direta na produção lipídios. Desse modo, o acúmulo de lipídio na biomassa depende de alguns fatores fundamentais tais como: carbono, nitrogênio, relação carbono/nitrogênio, temperatura, pH, agitação, oxigênio e concentração de sais inorgânicos (MHLONGO *et al.*, 2021; SHOAIIB *et al.*, 2018; SUBRAMANIAM *et al.*, 2010).

2.4.1 Carbono

O carbono disponibilizado na forma de carboidratos é a fonte de energia presente no meio de cultura. Há uma variabilidade de fontes de carbono que podem ser aplicadas para cultivo dos fungos filamentosos, porém é necessário atentar-se para o custo, de modo a tornar a produção economicamente viável (PEREIRA, 2018).

A glicose e o amido são as fontes de carbono mais aplicadas como substrato no cultivo de fungos oleaginosos e, apesar de suas semelhanças

bioquímicas, podem resultar no acúmulo de diferentes composições de lipídios, devido ao metabolismo do fungo filamentosos (MHLONGO *et al.*, 2021).

Substratos oleaginosos têm sido empregados na síntese e na substituição da glicose, porém a rota de produção de óleo é alterada quando utilizado substratos hidrofóbicos, principalmente quando se apresentam na forma de TAG (triacilglicerídeos), ou seja, três moléculas de ácidos graxos associados a uma molécula de glicerol, recebendo o nome de síntese de “ex novo”. Isso porque, para o acúmulo de óleo nos micro-organismos, as TAGs precisam ser hidrolisadas pela enzima lipase, para então gerar compostos de carbono necessários para a síntese dos novos lipídios (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2019).

2.4.2 Nitrogênio e oxigênio

A produção de lipídio é maximizada quando utilizado nitrogênio proveniente de fontes orgânicas (PEREIRA, 2018). Pereira (2018) corroborou com Dey, Banerjee e Maiti, (2011) através da análise do cultivo dos fungos *Colletotrichum sp.* e *Alternaria sp.*, na presença de nitrogênios orgânico e inorgânico, onde o nitrogênio orgânico apresentou maior acúmulo de lipídio e produção de biomassa.

Além da fonte de nitrogênio, o processo de acúmulo de lipídio é não associado ao crescimento e na maioria das vezes ocorre após a depleção de nitrogênio do meio de cultura. (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2019).

No entanto, a limitação de nitrogênio não é o único fator determinante para o acúmulo de óleo, o oxigênio também se apresenta como um fator crítico a ser avaliado nessa síntese. No cultivo de *M. isabellina* ATHUM 2935 em *shaker* o oxigênio disponível na fase de crescimento foi alto, porém na fase de síntese de lipídio foi diminuído (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2019).

2.4.3 Relação Carbono: Nitrogênio

O acúmulo de lipídio é desencadeado quando há o desequilíbrio da relação carbono/nitrogênio. Desse modo, para que a produção lipídica ocorra faz-se necessário a utilização de excesso de carbono associado ao nutriente limitante, como o nitrogênio. Esse desequilíbrio da relação causa mudanças fisiológicas e metabólicas, sendo que, quando disponível carbono e nitrogênio no meio, predomina o processo de proliferação celular. Com o consumo do nitrogênio, o carbono em excesso é convertido em lipídio de armazenamento (MHLONGO *et al.*, 2021; KARAMEROU; WEBB, 2019).

2.4.4 Influência da temperatura

A temperatura é um fator que exerce grande influência para os micro-organismos. Esta é essencial no inóculo e no crescimento, bem como exerce influência na composição do ácido graxo (MHLONGO *et al.*, 2021).

A temperatura de incubação está diretamente relacionada com o grau de saturação do lipídio acumulado na biomassa, ou seja, em temperaturas amenas (20 – 22 °C) a proporção de ácidos graxos insaturados supera a de ácidos graxos saturados. Portanto, os fungos termofílicos, fungos que possuem melhor crescimento em altas temperaturas, acumulam maior quantidade de ácidos graxos saturados, quando comparados aos mesófilos, fungos que possuem melhor crescimento em temperaturas medianas, que, por sua vez, acumulam maior quantidade de ácidos graxos insaturados (MHLONGO *et al.*, 2021).

2.4.5 Influência do pH

Os organismos apresentam pH onde o crescimento é mais favorável (MADIGAN *et al.*, 2016, p.165). Estudos aplicados a fungos filamentosos demonstraram que o pH não está relacionado apenas com o crescimento da biomassa, mas também com o acúmulo de lipídios e o perfil dos ácidos graxos (MIRONOV *et al.*, 2018). O pH mais indicado para os fungos filamentosos encontra-se entre 5 e 7, sendo que pH acima ou abaixo dessa faixa promove a inibição parcial do crescimento da biomassa. E em pH extremamente ácido, 1 e 2, o crescimento foi totalmente inibido (MHLONGO *et al.*, 2021).

2.5 SÍNTESE DE LIPÍDIOS POR FUNGOS FILAMENTOSOS

A principal via de produção de lipídio por micro-organismos oleaginosos ocorre pelo fornecimento de acetil coenzima A (acetil-CoA) e fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH), na presença do nitrogênio em condições limitantes (MHLONGO *et al.*, 2021; OCHSENREITHER *et al.*, 2016).

As principais via de geração de NADPH para biossíntese do lipídio pelo metabolismo da glicose incluem: (i) a via da pentose fosfato, com glicose 6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase, (ii) o ciclo piruvato/oxaloacetato/ malato, através da enzima málica dependente de NADP, ou (iii) o ciclo do ácido tri carboxílico via NADP + isocitrato desidrogenase dependente (MHLONGO *et al.*, 2021).

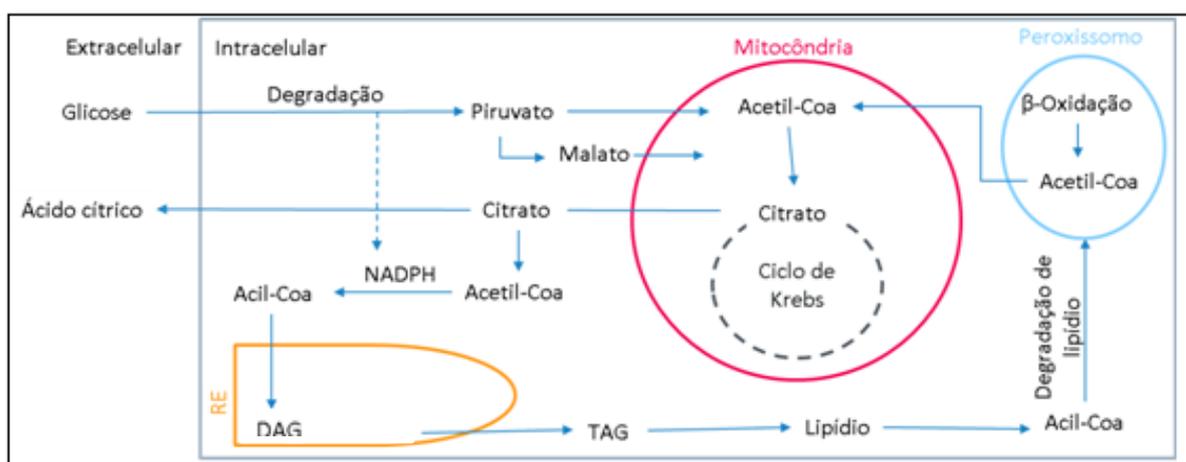
O desequilíbrio de nutrientes vitais no meio de cultura, como nitrogênio e carbono, influenciam alterações metabólicas e fisiológicas no cultivo, bem como na síntese de lipídios.

A via estudada neste trabalho é a possível via metabólica do ciclo de Piruvato/Oxaloacetato/Malato (POM), na qual a limitação de nitrogênio no meio extracelular resulta na ativação da Adenosina Monofosfato (AMP) Desidrogenase, tendo como consequência a redução do AMP celular. Essa mudança provoca uma alteração no ciclo de Krebs, uma vez que o AMP celular

atua como ativador alostérico da enzima isocitrato desidrogenase, e sua baixa atividade acarreta no acúmulo de isocitrato nas mitocôndrias.

O isocitrato em excesso é convertido em citrato. Por sua vez, o citrato acumulado nas mitocôndrias é secretado para o citoplasma em troca de malato. Em seguida, o ácido cítrico é clivado em acetil-CoA e oxaloacetato, e o acetil-CoA, em virtude da ação da enzima ácido graxo sintase, gera ácidos graxos celulares e posteriormente TAGs, que são as formas mais comuns de compostos lipofílicos encontrados nos micro-organismos oleaginosos. O acetil-CoA no citoplasma é então reduzido a Acil-CoA pela enzima NADPH, sendo este último, adicionado à cadeia de ácido graxo em formação, gerando o produto final, conforme a Figura 3 (MHLONGO *et al.*, 2021).

Figura 3 - Acúmulo de lipídios pelos fungos filamentosos



Fonte: Autora (2021).

A síntese de lipídios por fungos filamentosos pode ocorrer pelo consumo da glicose ou pelo consumo de substratos oleaginosos, assim o processo de acúmulo de lipídios varia de acordo com a rota metabólica. O processo de acúmulo de lipídio através da glicose recebe o nome “*de novo*”, enquanto o processo de acúmulo de lipídio através do consumo de substratos oleaginosos denomina-se “*ex novo*” (DOUROU *et al.*, 2018; PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2019).

Segundo Dourou *et al.* (2018) o processo de síntese lipídica pelos micro-organismos oleaginosos ocorre principalmente após o esgotamento das fontes

de nitrogênio presente no meio, desse modo, o acúmulo de lipídio não está apenas associado ao crescimento.

No esgotamento das fontes de nitrogênio ocorre uma brusca redução na concentração de adenosina monofosfato (AMP celular), que resulta na redução da função do ciclo de Krebs. Logo, o iso-citrato é acumulado na mitocôndria, e quando atingem o ponto crítico, o ácido cítrico é secretado do citoplasma em troca com o malato (DOUROU *et al.*, 2018; PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2019).

2.6 EXTRAÇÃO DE LIPÍDIO

O processo de extração de lipídio apresenta uma grande preocupação ambiental e governamental devido ao crescente aumento do uso de solventes químicos na indústria (DE JESUS; MACIEL FILHO, 2020). Além de influenciarem diretamente no rendimento de produção (FORFANG *et al.*, 2017).

Em geral, os solventes são geralmente compostos orgânicos voláteis (VOCs) com inúmeras propriedades, como alta solubilidade e volatilidade. São amplamente utilizados nas indústrias alimentícia, química e farmacêutica por serem em sua maioria lipossolúveis (DE JESUS; MACIEL FILHO, 2020).

As técnicas de extração de lipídio mais convencionais são: Folch, Soxhlet e Bligh & Dyer. Embora esses métodos demonstrem ampla eficiência na extração desse composto eles fazem o uso de altas quantidades de solventes orgânicos, principalmente o clorofórmio, metanol e hexano, cuja exposição pode representar problemas à saúde e ao meio ambiente (DE JESUS *et al.*, 2019).

O n-hexano é um solvente com grande aplicação na extração de óleos devido as suas propriedades. Este é apolar, possui alta estabilidade, baixa perda por evaporação, melhorando a recuperação desse solvente, facilidade de evaporação, realizando a extração de forma eficiente, sendo muito utilizada na extração de óleos vegetais e exige uma baixa demanda energética (STEVANATO; DA SILVA, 2019). Entretanto, algumas das suas características como: inflamabilidade, toxicidade, impactos ao meio ambiente e segurança

operacional fazem com o que o uso em larga escala seja preocupante tanto pelas questões ambientais como para a saúde do trabalhador (PERRIER *et al.*, 2017; STEVANATO; DA SILVA, 2019).

E com relação as normas regulamentadoras de segurança do trabalho (NR15) apresentadas na Tabela 2, o etanol é um dos solventes que apresentam grau de insalubridade mínimo, quando comparado a outras utilizadas na extração.

Tabela 2 - Comparação do uso de solventes de acordo com as normas de segurança do trabalho

	Exposição de até 48 h/semana	
	ppm *	mg/m ³
Metanol	156	200
1-butanol	40	115
Clorofórmio	20	94
Etanol	780	1480
Isopropanol	310	765
n-Hexano	-	-

Fonte: Adaptado de BRASIL (1978)

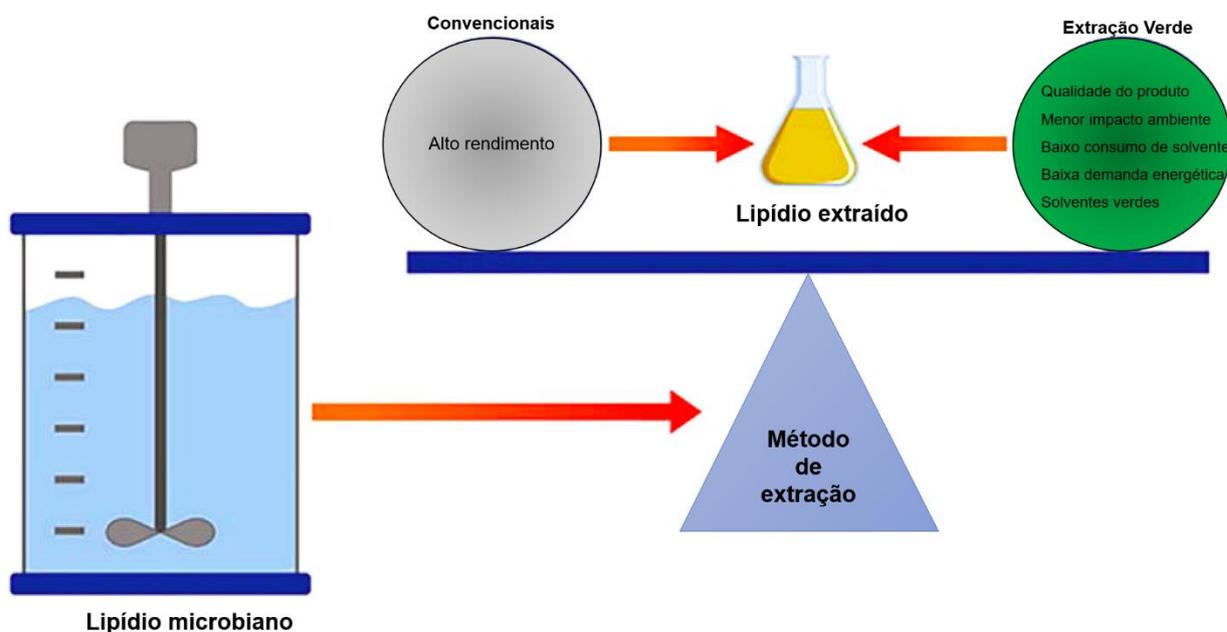
Embora o clorofórmio seja eficaz na extração de lipídios a aplicação em larga escala é impedida pelos riscos ambientais e relacionados a saúde, pertencente ao Grupo B2, ou seja, possivelmente cancerígeno, classificação dada pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (SHENG; RITTMANN, 2011).

Entretanto, a NR15 do Ministério do Trabalho e Emprego não inclui o hexano entre os agentes químicos de monitoramento ambiental regular. E na ausência desses valores de referência, os valores limites de exposição ocupacional da American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) devem ser adotados, neste caso 50 ppm ou 176mg/m³ (BRASIL, 1978).

Diante do atual cenário ambiental as novas necessidades relacionadas ao processo de extração vão além da melhoria do rendimento, acrescenta-se como objetivos a busca por solvente que geram menor impacto ambiental e apresentam menor toxicidade (ZHOU *et al.*, 2018). E com isso surgiu o termo

extração verde que busca muito além de um alto rendimento, conforme apresentado na Figura 4.

Figura 4 - Extração de lipídio microbiano - Métodos convencionais x Extração Verde



Fonte: Autora (2023).

O termo extração verde foi introduzido por Chemat *et al.* (2019) para se referir a métodos de extração com menor impacto ambiental possível, ou seja, menor consumo de solvente, baixo consumo de energia, menor contaminação ambiental, porém sem perderem a qualidade do produto (HU *et al.*, 2021).

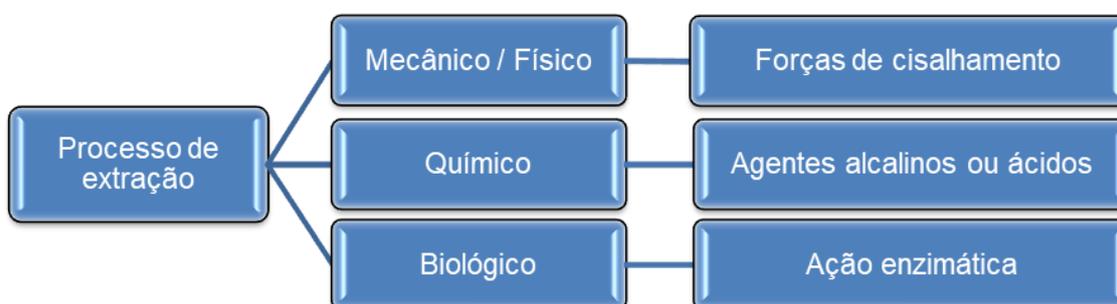
E para a promoção de uma política de extração verde a substituição dos solventes tóxicos e não ecológicos se faz necessários. A busca por solventes alternativos tem-se intensificado, sejam eles parcialmente ou totalmente derivados de fontes renováveis; como exemplo, o etanol e o acetato de etila (MUSSAGY *et al.*, 2020).

Dentre estes solventes verdes, o etanol, que tem sido amplamente utilizado, devido ao seu baixo custo, alta pureza e biodegradabilidade, sendo classificado como GRAS (geralmente conhecido como seguro) e grande

disponibilidade, por ser produzido por vias fermentativas, bem como se apresentar com muito baixo risco de toxicidade devido à exposição ocupacional (STEVANATO; DA SILVA, 2019).

Além do uso de solventes o princípio do método de extração promove melhor rendimento. Os métodos de extração podem ser classificados como: mecânicos ou físicos, químicos e biológicos, conforme apresentado na Figura 5.

Figura 5 - Princípio dos métodos de extração de lipídios



Fonte: Autora (2023).

Os métodos mecânicos ou físicos consistem na quebra da parede celular por meio de forças de cisalhamento, ondas ou calor, como extração por micro-ondas ou ultrassom. Os métodos químicos utilizam a hidrólise ácida ou alcalina ou até mesmo pelo uso de solventes. Os métodos biológicos promovem a extração por meio da degradação da membrana plástica, através da ação de enzimas (FORFANG *et al.*, 2017; TAN *et al.*, 2020).

Forfang *et al.* (2017) acrescentam que para otimizar os processos de extração faz-se necessário a combinação do uso dos solventes com os métodos químicos, físicos e biológicos, a fim de facilitar o processo de rompimento da parede celular.

Essa combinação de métodos já vem sendo utilizada desde 1995, de modo a obter uma extração acelerada por solvente, uma vez que a elevação da temperatura de extração, aliada ao benefício da interação entre solvente e amostra, pode reduzir o tempo necessário para a extração de lipídios (CHEN *et al.*, 2020)

E com relação à preocupação ambiental e uso de solventes tóxicos, os métodos de extração enzimática aquosa (AEE), extração supercrítica de CO₂, extração assistida por ultrassom e extração assistida por micro-ondas ganham destaque. Apesar do método AEE ser vantajoso aplicando água como solvente e apresentar melhor teor de ácidos graxos, teor de matéria insaponificável e cor do óleo, a desvantagem se dá pelo elevado tempo de extração, correspondendo a aproximadamente 24h e ao baixo rendimento. Já a extração supercrítica de CO₂ possui rendimento satisfatório, porém trata-se de uma operação cara e complexa (HU *et al.*, 2021).

Devido aos aspectos apresentados na utilização dos métodos mais tradicionais na extração, os processos que fazem o uso de biomassa úmida se tornam mais atraentes economicamente. No entanto, esse método apresenta melhor rendimento quando utilizados métodos de interrupção físicos, métodos iônicos, fluido supercrítico e métodos a base de solvente. Dalmas Neto *et al.* (2020) ressalta que os solventes polares resultam em um melhor rendimento de extração, de modo que, a água age como uma barreira entre os lipídios microbianos e os solventes orgânicos devido à sua polaridade.

A extração por micro-ondas é embasada na teoria de que a propagação de ondas eletromagnéticas se dissipa promovendo a ruptura da parede celular de maneira rápida, promovendo pequenas alterações da biomassa que geram melhor extração dos componentes, contudo ainda não há evidências claras que comprovam que essa técnica modifica a estrutura da biomassa (NIEMI; GENTILI, 2021).

Desse modo, diante dos métodos convencionais de extração de lipídio, os métodos de ultrassom e micro-ondas se destacam devido a sua facilidade de aplicação industrial e alto rendimento de extração. Essas técnicas já ganharam espaço nas indústrias alimentícias, em virtude de suas aplicações serem consideradas promissoras (ZHOU *et al.*, 2018).

2.6.1 Extração por ultrassom

A extração de lipídios utilizando o ultrassom é um método bastante promissor, uma vez que faz uso de menor quantidade de solvente e reduz tempo e temperatura de extração, se comparado com o método de extração de Bligh & Dyer (KUMAR; SINGH; KORSTAD, 2019). De acordo com Brandalize *et al.* (2014) esse tipo de extração comumente é realizado em batelada, porém pode ser adaptado para processos contínuos, quando acoplado a uma bomba ao sistema. Além disso, pode ser aplicado à biomassa úmida, diminuindo o consumo de energia gasto na operação de secagem (MARTÍNEZ *et al.*, 2020).

Este é um método mecânico que consiste na intensificação das reações físicas promovidas pela homogeneização eficaz da biomassa, que confere o aumento da transferência de energia e massa. A extração ocorre através do fenômeno de cavitação que quebra a estrutura celular da biomassa (GONZÁLEZ-BALDERAS *et al.*, 2020; KOUBAA *et al.*, 2020; KUMAR; SINGH; KORSTAD, 2019; PERRIER *et al.*, 2017).

O processo de cavitação ocorre a partir de uma série de regiões de compressão e rarefação, que leva à formação de bolhas de vapor e posteriormente a sua implosão, de modo que o choque destas pequenas bolhas em velocidade com a estrutura celular da biomassa, que têm a capacidade de promover a sua ruptura com o aumento da turbulência e forças de cisalhamento, permitindo que o conteúdo intracelular possa ser liberado facilmente (BUNDHOO; MOHEE, 2018; GONZÁLEZ-BALDERAS *et al.*, 2020; IDO *et al.*, 2018; KOUBAA *et al.*, 2020; KUMAR; SINGH; KORSTAD, 2019; PERRIER *et al.*, 2017; SALLET *et al.*, 2019).

Naveena, Armshaw e Pembroke (2015) descreveram mais especificamente o processo de extração por ultrassom, que tal processo ocorre a partir da conversão de energia elétrica em vibração física, transmitindo alta energia ao meio pelo processo de cavitação. Deste modo, quando a energia acústica atinge intensidade suficiente, as bolhas de vapor tornam-se instáveis, até que a frequência ressoante ultrapasse a frequência do campo ultrassônico, causando o colapso das mesmas, produzindo micro jatos em velocidade maior que 100 ms^{-1} e ondas de choque em torno de 103 MPa em direção à biomassa

(BUNDHOO; MOHEE, 2018; GONZÁLEZ-BALDERAS *et al.*, 2020; KOUBAA *et al.*, 2020; NAVEENA; ARMSHAW; PEMBROKE, 2015; SALLET *et al.*, 2019).

Segundo Martínez *et al.* (2020), a extração assistida por ultrassom não ocorre por um mecanismo apenas, mas sim, por diversos mecanismos, sejam eles decorrentes da cavitação ou não, como fragmentação, erosão e capilaridade.

O procedimento pode ser realizado por meio de banho ultrassônico ou sonda de ultrassom (HU *et al.*, 2021). Porém, quando usado o banho ultrassônico alguns fatores exercem considerável influência nesse processo como: volume de água presente no banho, espessura do recipiente que se encontra a biomassa, de modo a evitar a propagação das ondas. No entanto, quando se faz o uso da sonda de ultrassom esses fatores não exercem influência. No mais, nos banhos ultrassônicos é inevitável a mudança de temperatura devido a energia sonora (TIWARI, 2015).

Os métodos de extração por ultrassom e micro-ondas ganharam destaque nos laboratórios, sendo utilizados na extração de compostos vegetais (PERRIER *et al.*, 2017). A esse respeito, alguns pesquisadores demonstraram de modo comparativo que há benefício na extração através de micro-ondas ou ultrassom de óleo de SCO (CHEN *et al.*, 2015).

Segundo González-Balderas *et al.* (2020), o ultrassom é capaz de aumentar o rendimento lipídico de 11% para 70%, quando comparado a métodos sem ruptura celular, uma vez que, de acordo com Naveena, Armshaw e Pembroke (2015), a micro turbulência gerada pelo ultrassom pode acarretar uma maior eficiência na mistura da biomassa com o solvente, ao mesmo tempo em que as ondas de choque promovem a ruptura da parede celular. Já Perrier *et al.* (2017) afirmam que o rendimento em relação aos métodos convencionais pode aumentar em 30%.

Deste modo, o estudo do método de extração em banho ultrassônico apresenta considerável importância nesse trabalho, com o intuito de utilizar a tecnologia já presentes no meio industrial e com o objetivo de promover uma extração mais limpa fazendo o uso de solventes verdes.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 EQUIPAMENTOS

Este trabalho foi inicialmente desenvolvido na Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL) em Poços de Caldas e finalizado na Universidade Estadual Paulista (UNESP) em Araraquara.

Os equipamentos utilizados na UNIFAL foram: banho ultrassônico (Sanders®), bomba peristáltica modelo LDP-201-3 (MS Tecnopon®), banho-maria rotaevaporador (Logen®), cabine de segurança biológica Pa 40 ECO (Pachane®), banho-maria com refrigeração (Marconi®), incubadora Shaker refrigerada SL 221 (Solab®), autoclave Vertical CS (Prismatec®), centrífuga SL - 700 (Solab®), pHmetro (Nova Instruments®), estufa (DeLeq®), dessecador, espectrofotômetro UV Visível 200 a 1000 nm (Astra Científica®), agitador magnético (Centauro®) e balança analítica (Digimed DG-500),

E os equipamentos utilizados na UNESP foram: autoclave vertical (Phoenix), cabine de segurança biológica (Trox Brasil®), incubadora Shaker (Innova® 40), Incubadora Shaker (Gyromax 737R), pHmetro (MS Tecnopon®), estufa (DeLeq®), dessecador, espectrofotômetro Genesys 10S UV-Vis, balança analítica (SHIMADZU®), Cromatógrafo gasosos (Shimatzu® modelo GC-2014), banho ultrassônico (Ecosonics), placa de aquecimento (IKA C-MAG HS 7), banho ultratermostática (SL 152 – Solab®), banho do rotoevaporador (B-481 - Buchi®), Rotovapor (R-124 – Buchi®) e capela.

3.2 MATERIAIS

Os materiais utilizados foram: Frascos Erlenmyer de 250 mL (Ion glass[®]), frascos Erlenmeyer de 125 mL (Qualividros), Micropipetas (SOCORREX[®]), ponteiros de micropipeta, alça 10 μ L descartável (CRALPLAST[®]), bureta de vidro 1L, béquer 250 mL (PYREX[®]), termômetro digital espeto (PlayShop[®]), microfiltro (PTFE 25 mm 0,22 μ m), tubos falcon e seringa (Injex 20ml).

3.3 MICRO-ORGANISMO

O micro-organismo utilizado no presente trabalho foi o *Aspergillus oryzae* (URM 5636), proveniente do acervo de cultura do Instituto de Microbiologia do Recife (URM) da Universidade Federal do Pernambuco (Recife, PE, Brasil). A cepa foi armazenada em tubos contendo o meio PDA (Ágar de Dextrose de Batata) composta por 4 gL⁻¹ de infusão de batata, 20 gL⁻¹ de glicose e 15 gL⁻¹ de ágar bacteriológico. (KASVI[®]). Para o crescimento da cultura foram colocados em estufa com recirculação de ar a 30 °C por 7 dias, e em seguida realizado o cultivo. Para manutenção das culturas de *A. oryzae* foram repicados a cada 7 dias.

3.4 CULTIVO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS

Foram preparados dois meios de cultura proposto por Chi *et al.* (2011), conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição dos meios de cultura

	Meio de cultura	
	A	B
Glicose Anidra P.A. (gL ⁻¹) (Synth®)	20	20
Peptona de soja (gL ⁻¹) (KASVI®)	3	1,5
Extrato de levedura (gL ⁻¹) (KASVI®)	0,5	0,5

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Todos os componentes foram dissolvidos em béquer contendo água destilada. Em seguida foi realizada a leitura do pH do meio de cultura, com o auxílio do pHmetro.

Foi preparado a solução de esporos foi preparada adicionando 10 mL de água destilada no tubo contendo o *A. oryzae* e raspado o fungo com auxílio de uma alça para microbiologia de 10µL estéril. E transferida a solução de esporos para frasco de Erlenmeyer de 125 mL. Foi pipetado 300µL e adicionado ao meio de cultura (ANDRADE *et al.*, 2014). O cultivo foi realizado em shaker com agitação orbital a 30 °C e 170 rpm (SATO *et al.*, 2019). E a curva de crescimento foi avaliada a cada 24h, ao longo de 144h.

3.5 BIOMASSA E CALDO FILTRADO

Após o cultivo, a biomassa produzida foi filtrada em bomba à vácuo na pressão de 400 mmHg, e com auxílio de um papel filtro foi separada da biomassa do caldo filtrado. No caldo filtrado foi medido o pH. E a biomassa foi lavado com aproximadamente 250 mL água destilada, e em seguida pesado em balança analítica (ANDRADE *et al.*, 2014).

3.5.1 Análise de umidade

A biomassa foi analisada quanto ao teor de umidade pelo método adaptado do Instituto Adolfo Lutz (2008). Pesou-se 0,15 g de biomassa, e esta foi mantida em estufa a 105°C durante 24h. Em seguida, pesou-se novamente, efetuando-se os cálculos conforme a equação (1).

$$Umidade (\%) = \left[\frac{(P_{inicial} - P_{final})}{P_{inicial}} \right] \cdot 100 \quad (1)$$

Onde:

$P_{inicial}$: Peso da biomassa de ser colocada na estufa (g)

P_{final} : Peso da biomassa após 24h na estufa (g)

3.5.2 Atividade de hidrólise enzimática lipolítica

A análise de atividade de hidrólise enzimática para determinação da lipase que consistiu na avaliação tanto do filtrado como do micélio. Desse modo, foi preparada uma emulsão contendo 10 mL de azeite de oliva extravirgem (Carbonell®), 90mL de água destilada, 3% (m/v) de goma arábica em pó pura (Synth®). Em frascos de Erlenmeyer de 100 mL, foram adicionados 5 mL da emulsão e 4 mL da solução tampão de solução 7:3 de fosfato dissódico e fosfato de monopotássio pH 7. Homogeneizou-se bem a mistura com o auxílio de um mixer de mão (Walita). Utilizou-se 1 mL do filtrado ou 0,3 g de biomassa para quantificação da atividade enzimática. Nos Erlenmeyers adicionaram-se 5 mL da emulsão, 4 mL da solução tampão de pH 7, e 10 mL de etanol: água (1:1) adicionados após 10 minutos para paralisar a reação. Em seguida, titulou-se as amostras com solução padronizada de hidróxido de potássio (KOH) 0,025 molL⁻¹ com adição de 3 gotas do indicador, fenolftaleína, até que se obtivesse uma leve coloração rosada. A atividade enzimática do micélio calculada a partir da equação (2) e a atividade enzimática do filtrado (3) (MAROTTI, 2016).

$$\text{Atividade enzimática do micélio} \left(\frac{U}{g} \right) := \frac{(V_{amostra} - V_{branco}) \cdot MM_{KOH} \cdot 10^3}{m_{seca} \cdot tempo} \quad (2)$$

$$\text{Atividade enzimática do filtrado} \left(\frac{U}{mL} \right) := \frac{(V_{amostra} - V_{branco}) \cdot MM_{KOH} \cdot 10^3}{V_{filtrado} \cdot tempo} \quad (3)$$

Onde:

V_{branco} : Volume gasto de hidróxido de potássio na titulação do branco (mL)

$V_{amostra}$: Volume gasto de hidróxido de potássio na titulação da amostra (mL)

MM_{KOH} : Molaridade da solução de hidróxido de potássio (molL^{-1})

m_{seca} : Massa de biomassa sem umidade (g)

$V_{filtrado}$: Volume do caldo filtrado (mL)

$tempo$: Tempo de reação (min)

3.5.3 Determinação da concentração de glicose

A determinação da concentração de glicose foi realizada através do método de ácido dinitrosalicílico (DNS). Foram pipetados 1000 μ L de solução de glicose nas seguintes concentrações de: 0,1 gL^{-1} a 1 gL^{-1} do reagente DNS para construção da curva. Os tubos de ensaio foram aquecidos em banho-maria a 100 °C e em seguida foram resfriados em banho de gelo. Por fim, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

3.5.4 Preparação da biomassa para extração

A biomassa úmida foi cortada em quadrados de 0,2 cm para aumentar a superfície de contato com o solvente. Realizou-se a análise de umidade (3.5.1) para conversão do peso seco. A biomassa seca foi inserida em estufa a 50 °C

por 24h, macerada e para a padronização do tamanho foi utilizada uma peneira de 200 mesh (HASHEM.; KHATTAB; ABDELRAOF, 2022).

3.6 EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO DE LIPÍDIO MICROBIANO

3.6.1 Extração em banho ultrassônico

A extração de lipídio microbiano foi realizada inicialmente em banho ultrassônico (Sanders®). A extração em banho ultrassônico ocorreu em béquer de 250 mL utilizando a relação 1:100, biomassa seca (g): solvente (mL) (YEN, *et al.*, 2021). A extração ocorreu de acordo com as seguintes condições: 80 minutos a 42 °C, 70 W, 70 Hz, utilizando biomassa úmida e etanol como solvente.

Após a extração, as amostras foram encaminhadas para a centrifuga por 10 minutos a 3500 rpm. Em seguida, foi descartada a biomassa. E o sobrenadante contendo solvente e lipídio foi colocado em banho-maria rota evaporador a 60 °C com a finalidade de evaporar o solvente utilizado na extração. As amostras permaneceram em estufa a 60 °C até peso constante.

3.6.2 Avaliação do tempo de extração por solvente aliado ao ultrassom

Iniciou-se com a avaliação da influência da extração por solvente como pré-tratamento para extração do lipídio e foram estabelecidos os tempos de imersão zero, 18h, 24h, 42h e 48h em etanol. As amostras permaneceram no tempo determinado em béqueres de 250 mL na geladeira, tampados com plástico filme com relação sólido: líquido (g:mL) descrita no item 3.6.1. Após o tempo pré-determinado as amostras foram destampadas e levadas à lavadora ultrassônica para a extração, conforme apresentado na sessão 3.6.1.

3.6.3 Influência da temperatura de extração de lipídio em banho ultrassônico

O processo consistiu na extração por solvente no tempo pré-definido na sessão 3.6.2. Seguida pela extração em banho ultrassônico (3.6.1) com o controle de temperatura. Dessa forma, foi acoplado ao banho ultrassônico o banho-maria com bomba peristáltica para manter a temperatura estável. E foram avaliadas as temperaturas em banho ultrassônico de 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C e 60 °C aceitando a variação de ± 1 °C. As temperaturas foram verificadas ao longo do experimento (ZHOU *et al.*, 2018).

3.6.4 Influência do tempo de extração de lipídio em banho ultrassônico

O processo consistiu na extração por solvente no tempo pré-definido na sessão 3.6.2. Seguida pela extração em banho ultrassônico (3.6.1) na temperatura definida na sessão 3.6.3, e foi avaliada a influência do tempo de

extração em banho ultrassônico de: 60, 80, 100, 120, 140 e 160 min. (ZHOU *et al.*,2018).

3.6.5 Avaliação da extração em banho ultrassônico para biomassa seca e úmida

Após estabelecer o processo de extração foi avaliado a influência da extração por solvente para biomassa seca e biomassa úmida com as condições pré-determinada na sessão anterior 3.6.4.

3.6.6 Avaliação da extração em banho ultrassônico para biomassa seca e úmida sem pré-tratamento

Nesta sessão foi avaliada a influência do pré-tratamento para a extração de lipídio microbiano para biomassa seca e úmida. Dessa forma, foi realizada a extração em banho ultrassônico conforme descrito na sessão 3.6.1, fazendo o uso da temperatura definida na sessão 3.6.3 e tempo de extração em banho ultrassônico determinado na sessão 3.6.4.

3.6.7 Extração de lipídio microbiano em banho ultrassônico utilizando solventes orgânicos

Nesta etapa foi calculada a demanda energética (ED) do banho ultrassônico com a finalidade de realizar a troca de equipamento. Foi utilizando o banho ultrassônico (Ecosonics) e a ED foi calculada pela equação (4), cuja potência nominal é fornecida pelo fabricante do equipamento.

$$ED = \frac{\text{Potência nominal (W)} \cdot \text{Tempo de processamento (s)}}{\text{Volume da amostra (mL)} + \text{Volume de água do banho (mL)}} \quad (4)$$

Foram avaliados os solventes orgânicos: metanol, etanol, isopropanol, hexano, heptano e acetato de etila, cujas condições de extração foram definidas na sessão 3.6.6.

3.6.8 Extração de lipídio microbiano em banho ultrassônico utilizando mistura de solventes

Nesta sessão foram avaliadas as extrações em banho ultrassônico uma mistura de solventes, conforme apresentado na sessão 3.6.7. Para compor essa mistura foi selecionado um solvente apolar e um polar nas proporções 2:1, 1:1 e 1:2 (MUSSAGY *et al.*, 2021).

3.6.9 Melhoramento do processo de processo de extração do lipídio microbiano

3.6.9.1 Relação sólido: líquido na extração de lipídio microbiano em banho ultrassônico utilizando mistura de solventes

O experimento consistiu na determinação da melhor relação de biomassa para solvente na extração de lipídio microbiano em banho ultrassônico nas condições apresentada na sessão 3.6.8. Desse modo, foi determinada a relação de gramas de biomassa por volume de solvente, testada na relação: 0,25 g: 50 mL, 0,5g: 50mL, 0,75g:50 mL e ,10g:50 mL (adaptado de ZHOU *et al.*, 2018)

3.6.9.2 Temperatura de extração de lipídio microbiano em banho ultrassônico utilizando mistura de solventes

Nesta etapa foi determinada a temperatura de extração de lipídio microbiano em banho ultrassônico para mistura de solventes, cujas condições foram apresentadas na sessão 3.6.9.1. As temperaturas de extração avaliadas em banho ultrassônico foram 30 °C, 50 °C e 70 °C.

3.6.9.3 Tempo de extração de lipídio microbiano em banho ultrassônico utilizando mistura de solventes

Neste experimento foi determinado o tempo de extração em banho ultrassônico utilizando mistura de solventes nas condições determinadas nos itens 3.6.9.2. Desse modo, foram avaliados os tempos de 40 min., 60 min., 80 min., 100 min. e 120 min. (ZHOU *et al.*,2018).

3.6.10 Extração de lipídios totais

A extração de lipídios totais foi realizada pelo método de extração de Bligh & Dyer foi realizado para determinar o conteúdo lipídico total acumulado pelo *A. oryzae* proposto por Mussagy *et al.* (2021). O procedimento consistiu na utilização de biomassa seca (3.5.4). A etapa de extração ocorreu utilizando 1 g de biomassa seca e a mistura de solventes: água, clorofórmio, metanol, cuja razão correspondeu a 0,8:1:2 (v/v/v) e homogeneizada por 1h, 300 rpm e 45 °C. Em seguida, foram centrifugados a 25 °C, 7000 rpm por 10 min para separação de fases. Após essa etapa foi recuperada a mistura contendo lipídio e clorofórmio e adicionados solução de cloreto de potássio 0,88% e clorofórmio 1:1 (v/v), e

levados para centrifuga novamente nas mesmas condições. Após a separação de fases, as fases aquosas e orgânicas coexistentes, foram cuidadosamente separadas e filtradas em microfiltro (0,22 µm). O procedimento foi repetido até a extração total dos lipídios. Após esse processo o lipídio extraído foi seco em estufa por 24h a 60 °C ou até peso constante. A extração de lipídios totais possibilitou calcular a eficiência do processo de extração em banho ultrassônico pela equação 5.

$$\text{Eficiência de extração} = \frac{\text{Lipídio extraído em banho ultrassônico (g)}}{\text{Lipídio total extraído por Bligh \& Dyer (g)}} \times 100 \quad (5)$$

3.7 PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS

A composição em ácidos graxos foi determinada por cromatografia gasosa, segundo a ISO 12966 (2014) com adaptações. A análise foi realizada em cromatógrafo a gás (Shimatzu®, modelo GC-2014, UNESP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) utilizando injetor Split, detector de ionização por chama (DIC) e coluna SH-Stabilwax-DA (L x I.D. 30 m x 0,25µm, df 0,25 µm). As temperaturas do injetor e do detector foram de 250°C, sendo o modo de injeção Split (1:10) e o nitrogênio utilizado como gás de arraste, na vazão de 0,55 mL/min. A temperatura inicial da coluna foi de 60°C, atingindo 210°C (taxa de aquecimento de 20°C/min), permanecendo em 210°C por 7 minutos. Em seguida, a temperatura foi elevada a 250 °C (20 °C.min⁻¹), sendo mantida por 14 minutos, resultando em 21 minutos de tempo total de análise. Os padrões de ácidos graxos utilizados foram: caprílico (C8:0); cáprico (C10:0); láurico (C12:0); mirístico (C14:0); palmítico (C16:0); palmitoleico (C16:1); esteárico (C18:0); oleico (C18:1); linoleico (C18:2); α – linolênico (18:3); nonadecanóico (C19:0); araquídico (C20:0); eicosenóico (C20:1); beênico (C22:0). Os padrões foram adquiridos Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA.

3.8 CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA

A cromatografia de camada delgada (TLC) foi realizada em placa de alumínio sílica gel, 60G para CCD 1,5 cm da base da placa, e feitos pontos nessa linha de 1 cm em 1cm para depositar, com auxílio de um capilar, uma gota da solução lipídica contendo 20 mg.mL⁻¹. A solução contendo 20 mg.mL⁻¹ do lipídio extraído foi preparada pesando 0,02 g e completado com 1 ml de hexano. Após depositar o lipídio com auxílio de um capilar na placa foram adicionadas 3 gotas utilizando o capilar, com os padrões de ácido graxos, monoglicerídeos, diglicerídeos e trigliceróis.

Na capela, foi colocada a placa na cuba contendo a solução de hexano/éter etílico/ácido acético (65:35:1,v:v:v) e tampada a cuba. Após o solvente atingir a linha que foi depositada as amostras, a placa foi retirada da cuba e aguardada a secagem completa do solvente. Em sequência a placa foi colocada no dessecador contendo iodo P.A. moído e permaneceu por 5 min possibilitou a determinação dos pontos criados através do arraste do solvente.

3.9 CÁLCULOS DO CULTIVO

3.9.1 Concentração de biomassa (X)

A concentração de biomassa foi calculada por meio da equação (6) (SCHMIDELL *et al.*, 2001, p.93).

$$X = \frac{\text{Peso da biomassa seca (g)}}{\text{Volume do meio de cultura (L)}} \quad (6)$$

3.9.2 Concentração de lipídio (P)

A concentração de lipídio é o cálculo através da equação (7) para determinar quanto do metabólito é produzido no volume de meio de cultura (SCHMIDELL *et al.*, 2001, p.93).

$$P = \frac{\text{Peso do lipídio (g)}}{\text{Volume do meio de cultura (L)}} \quad (7)$$

3.9.3 Rendimento de biomassa por substrato ($Y_{X/S}$)

Este parâmetro fornece uma relação linear baseando-se no crescimento celular e no consumo de substrato, sendo calculado pela equação (8) (SCHMIDELL *et al.*, 2001, p.93).

$$Y_{\frac{X}{S}} = \frac{\text{Massa de biomassa produzida (g)}}{\text{Massa de substrato consumido (g)}} \times 100 \quad (8)$$

3.9.4 Rendimento de produto por substrato ($Y_{P/S}$)

Esse parâmetro fornece o rendimento pelo cálculo de produto formado pelo consumo de substrato ao longo de um período do cultivo e pode ser obtido através da equação (9) (SCHMIDELL *et al.*, 2001, p.93).

$$Y_{\frac{P}{S}} = \frac{\text{Massa de produto formado (g)}}{\text{Massa de substrato consumido (g)}} \times 100 \quad (9)$$

3.9.5 Rendimento de produto por biomassa ($Y_{P/X}$)

A equação (10) fornece a relação produto formado por biomassa produzida ao longo de um determinado tempo do cultivo (SCHMIDELL *et al.*, 2001, p.93).

$$Y_{\frac{P}{X}} = \frac{\text{Massa de produto formado (g)}}{\text{Massa de biomassa produzida (g)}} \times 100 \quad (10)$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CULTIVO DO *A. ORYZAE*

O cultivo do fungo filamentoso *A. oryzae* foi realizada em batelada para cada teste desta pesquisa. Já o processo de extração lipídico apresentou variações ao longo da pesquisa.

4.1.1 Influência da relação carbono nitrogênio no acúmulo de lipídio microbiano

O meio de cultura foi composto por glicose, como fonte de carbono na síntese de lipídio. Além disso, empregaram-se, como fontes de nitrogênio orgânico, peptona de soja e extrato de levedura, uma vez que apresentaram maior rendimento no acúmulo de lipídios ricos em PUFAs, quando comparadas às fontes de nitrogênio inorgânicas (CHANG *et al.*, 2021; DEY; BANERJEE; MAITI, 2011).

A relação carbono/nitrogênio (C:N) é um fator de suma importância no acúmulo de lipídio (MIAO *et al.*, 2020). Essa relação torna o meio de cultura propício ao acúmulo de lipídio, uma vez que essa ocorre principalmente a partir da limitação de nitrogênio no meio (HÜSEYİN, 2018); ou seja, quando há um desbalanço energético da relação C: N do meio de cultura a proliferação da biomassa pelo fungo filamentoso cessa, pré-dispondo ao acúmulo de lipídio (DEMIR; GÜNDES, 2020; MHLONGO *et al.*, 2021). Desse modo, o *A. oryzae* foi cultivado em dois meios de cultura, meio A e meio B, onde o meio de cultura A apresentava o dobro da concentração de peptona de soja que o meio B. A composição dos meios e condições de cultivo foram apresentadas na sessão 3.4.

Na Tabela 4 foram apresentados os dados referentes a produção de biomassa, acúmulo de lipídio, consumo de glicose (3.5.3), atividade de hidrólise enzimática da enzima lipase do micélio e do caldo filtrado (3.5.2), e pH do meio de cultura ao final do cultivo de 144h.

O primeiro parâmetro avaliado foi a concentração de biomassa, e o resultado encontrado corrobora com os dados da literatura estudada (DEMIR; GÜNDES, 2020; KARAMEROU; WEBB, 2019; MHLONGO *et al.*, 2021), de modo que se observou uma menor concentração de biomassa (X) no meio com menor concentração de nitrogênio, cultivo B, quando comparado ao cultivo A, correspondendo respectivamente a $3,99 \pm 0,03 \text{ g.L}^{-1}$ e $8,93 \pm 1,17 \text{ g.L}^{-1}$.

Analisando de forma comparativa a concentração de lipídio (P), pode-se observar que o cultivo A apresentou menor concentração lipídica em relação ao cultivo B, com valores respectivamente de $0,63 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,31 \pm 0,21 \text{ g.L}^{-1}$. Com consumo de glicose de $10,45 \pm 0,06 \text{ g.L}^{-1}$ para o meio de cultura A e $9,46 \pm 0,69 \text{ g.L}^{-1}$ para o meio de cultura B, cujos dados de consumo de glicose não apresentaram diferença estatística.

E na Tabela 5 foram apresentados os rendimentos do cultivo, rendimento de biomassa por consumo de glicose (3.9.3), rendimento de lipídio por consumo de glicose (3.9.4) e rendimento de lipídio por biomassa (3.9.5). As análises dos dados do cultivo possibilitaram a realização de uma avaliação mais minuciosa da influência que a concentração de nitrogênio exerce na produção de lipídio. Desse modo, o rendimento de biomassa por glicose consumida do meio de cultura ($Y_{X/S}$) para meio A e B foi respectivamente $85,6 \pm 11,7\%$ e $42,3 \pm 2,8\%$ neste resultado foi observado uma grande diferença significativa devido à baixa concentração de biomassa e o alto consumo de glicose. No entanto, o rendimento de lipídio por consumo de glicose ($Y_{P/S}$) apresentou melhores resultados estatísticos correspondendo a $13,8 \pm 1,2\%$ para meio de cultura B e $6,0 \pm 0,1\%$ para o meio de cultura A. E o rendimento lipídio/biomassa ($Y_{P/X}$) para o cultivo A de $7,1 \pm 0,9\%$ e para o cultivo B de $32,9 \pm 5,1\%$.

Além disso, a produção de biomassa não foi diretamente proporcional com a produção de lipídio, pois, segundo a análise estatística no cultivo A, a produção de biomassa foi maior em relação ao cultivo B, enquanto a produção

de lipídio foi maior no cultivo B em relação ao A. Dado esse que vai de encontro com a literatura da área, cuja análise demonstrada por Mhlongo *et al.* (2021) indica que em meios com baixa concentração de nitrogênio e alta concentração de carbono geram maior acúmulo de lipídio, pelo desequilíbrio da relação C:N.

Deste modo, o acúmulo de lipídio ocorre quando há o esgotamento da fonte de nitrogênio e o carbono é então convertido em lipídio. E a concentração baixa de nitrogênio predispõe ao acúmulo de lipídio (DZUREN DOVA *et al.*, 2020). Assim sendo, o cultivo A necessitaria permanecer em crescimento no meio de cultivo por um período maior que o cultivo B para que esgotasse o nitrogênio orgânico presente e então alcançasse uma produção de metabólito lipídico ótimo (DEMIR; GÜNDES, 2020; KARAMEROU; WEBB, 2019; MHLONGO *et al.*, 2021).

Tabela 4 - Cultivo do *A. oryzae* nos meios de cultura A e B para avaliação dos seguintes parâmetros: concentração de biomassa, concentração de lipídio, consumo de glicose, atividade de hidrólise enzimática da lipase do micélio e caldo filtrado e pH do caldo do cultivo

Cultivo	X (g.L ⁻¹)		P (g.L ⁻¹)		Consumo de glicose (g.L ⁻¹)		Atividade enzimática do micélio (U.g ⁻¹)		Atividade enzimática do caldo filtrado (U.mL ⁻¹)		pH	
A	8,93 ± 1,17	(a)	0,63 ± 0,01	(b)	10,45 ± 0,06	(a)	9,55 ± 0,06	(a)	0,00 ± 0,00	(a)	4,54 ± 0,01	(a)
B	3,99 ± 0,03	(b)	1,31 ± 0,21	(a)	9,46 ± 0,69	(a)	1,50 ± 0,29	(b)	0,00 ± 0,00	(a)	3,93 ± 0,04	(b)

X: Concentração de biomassa; P: Concentração de lipídio.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Tabela 5 - Cálculos de rendimento para avaliação influência da relação carbono/nitrogênio a partir dos meios de cultura A e B

Cultivo	Y _{X/S} (%)		Y _{P/S} (%)		Y _{P/X} (%)
A	85,6 ± 11,7	(a)	6,0 ± 0,1	(b)	7,1 ± 0,9
B	42,3 ± 2,8	(b)	13,8 ± 1,2	(a)	32,9 ± 5,1

Y_{X/S}: Rendimento de biomassa por consumo de glicose; Y_{P/S}: Rendimento lipídio por consumo de glicose; Y_{P/X}: Rendimento de lipídio por biomassa.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Outra análise realizada foi o pH do caldo filtrado. Segundo Ochsenreither *et al.* (2016), com o desequilíbrio dada fonte de nitrogênio o ácido cítrico é secretado da célula acidificando o meio. Ambos os cultivos apresentaram pH inicial de aproximadamente $6,96 \pm 0,01$. No final do cultivo o meio de cultura B apresentou pH $3,93 \pm 0,04$ e o meio de cultura A pH $4,54 \pm 0,01$. Com base na análise do pH do meio de cultura e segundo a análise estatística o meio de cultura B apresentou maior acidificação do meio em relação ao meio de cultura A, evidenciando o desequilíbrio da relação C:N através da secreção do ácido cítrico para o meio de cultura.

Também foi realizada a análise de atividade de hidrolise enzimática para determinar a presença enzima lipase tanto na biomassa (micélio) como no caldo filtrado. Segundo o He *et al.* (2019) o *A. oryzae* é um fungo filamentosos produtor da enzima lipase. E segundo a análise realizada tanto o cultivo A como o B não foi identificado a presença de atividade lipolítica no caldo filtrado. E a atividade lipolítica do micélio também foi muito baixa. A preocupação com a produção de lipase pelo fungo estudado se relaciona ao fato de se tratar de ciclos concorrentes. De acordo com Athenaki, *et al.* (2018), quando a concentração de substrato se torna baixa os triacilgliceróis (TAGs) de armazenamento intracelular são hidrolisados pela lipase, assim os ácidos graxos são liberados pela reação de β -oxidação e acetil-CoA são catalisados pelo ciclo de Krebs para que a produção de polissacarídeos.

Com base nas análises e cálculos realizados o meio de cultura B foi mais propício ao acúmulo de lipídio pelo *A. oryzae*. Dessa forma, foi escolhido o meio de cultura B para dar sequência ao trabalho.

4.1.2 Curva de crescimento do *Aspergillus oryzae*

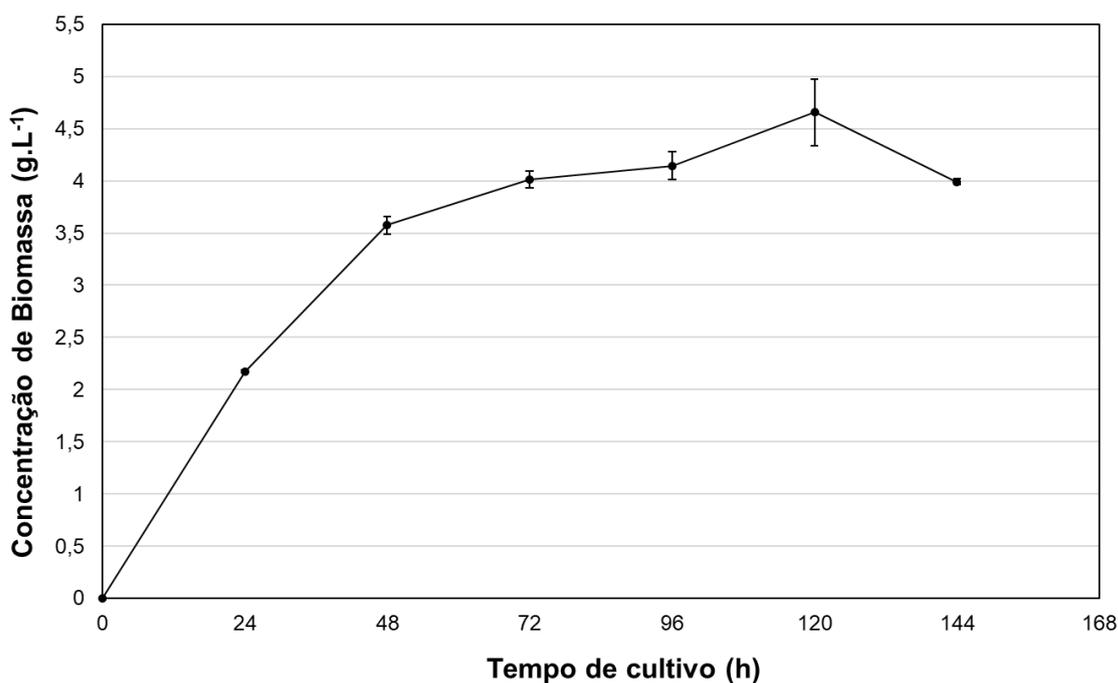
A curva de crescimento do fungo filamentosos *A. oryzae* foi realizada durante o período de 144h utilizando o meio de cultura B, cuja composição foi

apresentada na sessão (3.4). Foram realizadas a cada 24h as análises de: pH do meio de cultura, concentração de biomassa (3.9.1), concentração de lipídio (3.9.2) e substrato consumido (glicose) pelo método de açúcares redutores (3.5.3), cujos dados foram apresentados na Tabela 6.

Segundo Schmidell *al.* (2001), em geral, o crescimento dos micro-organismos são dividido em seis fases: lag, log, declínio, estacionária e morte.

Com base nos dados apresentados na Figura 6, não foi possível verificar a fase lag. Assim sendo, o primeiro ponto avaliado foi a fase log observada após 24h de cultivo correspondendo a primeira análise. Em 48h foi atingida a fase estacionária que permaneceu até 100h. Neste momento iniciou a fase estacionária. Por fim, observou-se a fase de morte após 132h.

Figura 6 - Produção de biomassa ao longo do tempo



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Tabela 6 - Avaliação da curva de crescimento *A. oryzae* função do lipídio acumulado, substrato disponível, atividade de hidrólise enzimática e pH

Tempo de cultivo (h)	P (g.L ⁻¹)	Consumo de glicose (g.L ⁻¹)	pH
0	0,00 ± 0,00 (c)	0,00 ± 0,00 (c)	7,06 ± 0,00 (a)
24	0,33 ± 0,09 (b)	3,27 ± 0,71 (b)	4,22 ± 0,07 (b)
48	1,00 ± 0,14 (ab)	6,16 ± 1,70 (ab)	4,39 ± 0,08 (b)
72	0,70 ± 0,31 (ab)	6,81 ± 0,09 (ab)	4,11 ± 0,00 (b)
96	0,88 ± 0,06 (ab)	7,65 ± 1,54 (a)	3,97 ± 0,01 (b)
120	0,90 ± 0,36 (ab)	8,40 ± 0,58 (a)	4,01 ± 0,02 (b)
144	1,31 ± 0,21 (a)	9,46 ± 0,69 (a)	3,97 ± 0,09 (b)

P: Concentração de lipídio.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Na curva de crescimento foi observada a queda do pH de 7,06 para 4,22 em 24h e após esse período manteve-se estável, em média de pH 4,08. A atividade enzimática do filtrado e do micélio foi avaliada após 48h de cultivo até o tempo de 144 h de cultivo. A atividade de hidrólise enzimática do micélio, em média, de $2,19 \pm 0,78 \text{ U.g}^{-1}$ e o filtrado não apresentou atividade enzimática de hidrólise ao longo do período de 144h. Essa análise foi realizada com o intuito de verificar se havia produção da enzima lipase pelo *A. oryzae*, ou seja, caso fosse constatado o aumento na produção de lipase provavelmente o ciclo de acúmulo de lipídeos estaria sofrendo uma alteração, pois trata-se de ciclos concorrentes.

A análise de açúcares redutores possibilitou verificar que ao longo das 144h de cultivo ainda havia presença de glicose residual remanescente. Isto pode ser justificado pelo esgotamento da fonte de nitrogênio acarretando maior acúmulo de lipídio em detrimento do crescimento da biomassa (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2019).

Já para biomassa seca verificou-se maior produção nas primeiras 48h correlacionando ao maior consumo de substrato. A concentração de biomassa aumentou até 120h e após esse período foi possível observar que houve a fase de morte, reduzindo 14,3% da biomassa presente.

E o rendimento de lipídio segundo a análise estatística de 48h - 144h não apresentou diferença significativa, correspondendo a faixa de 28 - 30 % lipídeo/biomassa seca. Assim, os dados relativos ao cultivo foram apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Cálculos de rendimento do cultivo de biomassa por consumo de glicose, lipídio por consumo de glicose e lipídio por biomassa para a curva de crescimento do *A. oryzae*

Tempo de cultivo (h)	$Y_{X/S}$ (%)			$Y_{P/S}$ (%)			$Y_{P/X}$ (%)		
	24	68,1 ± 15,1	(a)	10,5 ±	4,9	(b)	15,0 ± 3,9		(b)
48	60,1 ± 15,2	(a)	16,5 ±	2,3	(a)	27,8 ± 3,2		(a)	
72	58,9 ± 0,4	(a)	10,3 ±	4,4	(b)	17,4 ±	7,3	(ab)	
96	55,1 ± 9,3	(a)	11,6 ±	1,6	(b)	21,1 ±	0,7	(ab)	
120	55,4 ± 0,1	(a)	10,6 ±	3,5	(b)	19,2 ±	6,3	(a)	
144	42,3 ± 2,8	(a)	13,8 ± 1,2		(b)	32,9 ±	5,1	(a)	

$Y_{X/S}$: Rendimento de biomassa por substrato consumido; $Y_{P/S}$: Rendimento produto por substrato; $Y_{P/X}$: Rendimento de produto por biomassa.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Avaliando-se a produção de biomassa por consumo de substrato, evidenciou-se pouca variação ao longo do tempo, assim como o acúmulo de lipídio pelo consumo de substrato. No entanto, o rendimento de produto por biomassa no intervalo de 96h – 120h apresentou um déficit de 9,3%.

Além dos aspectos avaliados, também foi possível classificar o fungo filamentoso *Aspergillus oryzae*, como um micro-organismo oleaginoso, pois, conforme afirmado por Miao *et al.* (2020) os micro-organismos oleaginosos são aqueles capazes de acumular mais de 20% de lipídios em peso seco durante o crescimento em meios de cultivo favoráveis. E com o intuito de promover um processo de extração com uma tecnologia conhecida pela indústria foi utilizado o banho ultrassônico como promotor do processo de extração.

4.2 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEO MICROBIANO

A extração por solventes, como o metanol, n-hexano, clorofórmio e metanol, ainda consiste no método mais aplicado, com boa eficácia na extração de diversos lipídios, inclusive em membranas ricas em PUFA's (ANANTHI *et al.*, 2021). No entanto, devido aos impactos ambientais e problemas relacionados a saúde devem ser substituídos pelo uso de solventes verdes capazes de promover um bom rendimento de extração e que não interfiram na qualidade do produto.

4.2.1 Extração de Lipídios Totais

A extração de lipídios totais acumulados pelo *A. oryzae* foi quantificado pelo método de Bligh & Dyer correspondendo ao rendimento de $31,4 \pm 0,1\%$ lipídio/biomassa seca no cultivo de 48h e $44,9 \pm 0,4\%$ rendimento de

lipídio/biomassa seca para o cultivo de 144h. Ademais, foi realizado o perfil de ácidos graxos, conforme apresentado na Tabela 8.

Tabela 8 - Perfil lipídico dos ácidos graxos extraídos

Ácidos Graxos		Bligh & Dyer	
		Tempo de cultivo	
		144 h	48 h
		Composição (%)	
Mirístico	C14:0	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0
Palmítico	C16:0	22,5 ± 0,1	24,9 ± 0,1
Esteárico	C18:0	5,7 ± 0,1	9,0 ± 0,1
Oleico	C18:1	35,3 ± 0,0	38,9 ± 0,3
Linoleico	C18:2	17,0 ± 0,2	12,6 ± 0,0
Nonadecanóico	C19:0	13,7 ± 0,0	8,8 ± 0,1

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

A partir da análise do perfil dos ácidos graxos extraídos pelos métodos de Bligh & Dyer utilizando biomassa seca foi possível verificar que o perfil lipídico composto por aproximadamente 95% de ácidos graxos e 5% de outros compostos não identificados, dentre os ácidos graxos encontrados nestas amostras aproximadamente 9 – 14% do total foi composto por PUFA, aproximadamente 35 – 39% por MUFA e 43% de SFA.

O MUFA encontrado foi o ácido oleico (C18:1). Já os SFAs encontrados foram: ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0) e o ácido nonadecanóico (C19:0). Apenas o ácido linoleico (C18:2) como PUFA.

Deste modo, destacaram-se o ácido oleico (ω 9), C18:1, correspondendo a 35 – 39%, seguido do ácido palmítico (C16:0) com 23 – 25%, ácido linoleico (ω 6), C18:2, com 13 – 17% dos componentes sendo os ácidos graxos com maiores percentuais.

Esses dados encontrados no presente estudo correlacionam e corroboram com os dados encontrados na literatura, como exemplo um estudo realizado com o fungo *Mucor circinelloides*, que apresentou como perfil lipídico 39,3% de ácido oleico, 22,2% de ácido palmítico e 9,5% de ácido linoleico (CARVALHO *et al.*, 2015).

O ácido oleico (ω 9 - C18:1), um MUFA, pode ser encontrado também em alguns óleos vegetais, azeite, nozes, frutas e produtos animais. Em alguns estudos este ácido tem sido relacionado com a prevenção da obesidade, atividade anticancerígena e anti-inflamatória (SOMVANSHI *et al.*, 2020; TUTUNCHI *et al.*, 2020).

O ácido palmítico (C16:0), é classificado como SFA, sendo essa classe de ácidos graxos muito associada a doenças e agravo da saúde. Este ácido especificamente é um dos principais componentes da gordura saturada da dieta, contribuindo para o aumento da obesidade, ocorrência de eventos tromboembólicos, esteatose hepática, e outros distúrbios metabólicos (SARASWATHI *et al.*, 2020, XU *et al.*, 2020).

O ácido linoleico (ω 6 - C18:2), é classificado como PUFA, sendo essa classe os que despertam mais interesse do ponto de vista nutricional e fisiológico (ZANELLA *et al.*, 2020). Este é um exemplo de ácido graxo essencial, que não pode ser sintetizado de forma autóctone pelo organismo humano, devendo então ser obtido pela dieta (HUSSAIN *et al.*, 2013; PERINI *et al.*, 2010).

Desta forma, a busca de fontes alternativas para a obtenção do ácido linoleico ganhou destaque nas indústrias nutracêuticas (CAROTA *et al.*, 2018; CARVALHO *et al.*, 2018; DEMIR; GÜNDES, 2020), uma vez que os PUFAs apresentam relevância na constituição e funcionalidade de diversos tecidos, além de apresentarem potencial proteção contra doenças cardiovasculares e neurológicas (HUSSAIN *et al.*, 2013; LIANG *et al.*, 2021; SAKURADANI *et al.*, 2009).

Além do perfil de ácidos graxos, a extração de lipídios totais pelo método de Bligh & Dyer possibilitou determinar a eficiência do processo de extração em banho ultrassônico (equação 5, sessão 3.6.10) que foi utilizada para as próximas etapas do trabalho.

4.2.2 Extração de lipídio microbiano em banho ultrassônico

Inicialmente o etanol foi escolhido como solvente, por ser classificado como um solvente verde, causando impacto ambiental menor que os solventes comumente utilizados, além de não apresentar risco à saúde humana quando há a necessidade de exposição frequente, segundo apresentado pelas Normas Regulamentadoras (NRs) que visa a prevenção de acidentes e a proteção dos colaboradores (CHEMAT *et al.*, 2019; HU *et al.*, 2020; PERRIER *et al.*, 2017; STEVANATO; DA SILVA, 2019).

Além do método de extração por solvente, foi utilizado o método por banho ultrassônico, que oferece algumas vantagens como: menor tempo e temperatura necessária para extração e redução do uso de solventes. O principal mecanismo envolvido na extração por ultrassom é a cavitação, levando a quebra da estrutura celular da biomassa (GONZÁLEZ-BALDERAS *et al.*, 2020; IDO *et al.*, 2018; KUMAR; SINGH; KORSTAD, 2019; PERRIER *et al.*, 2017).

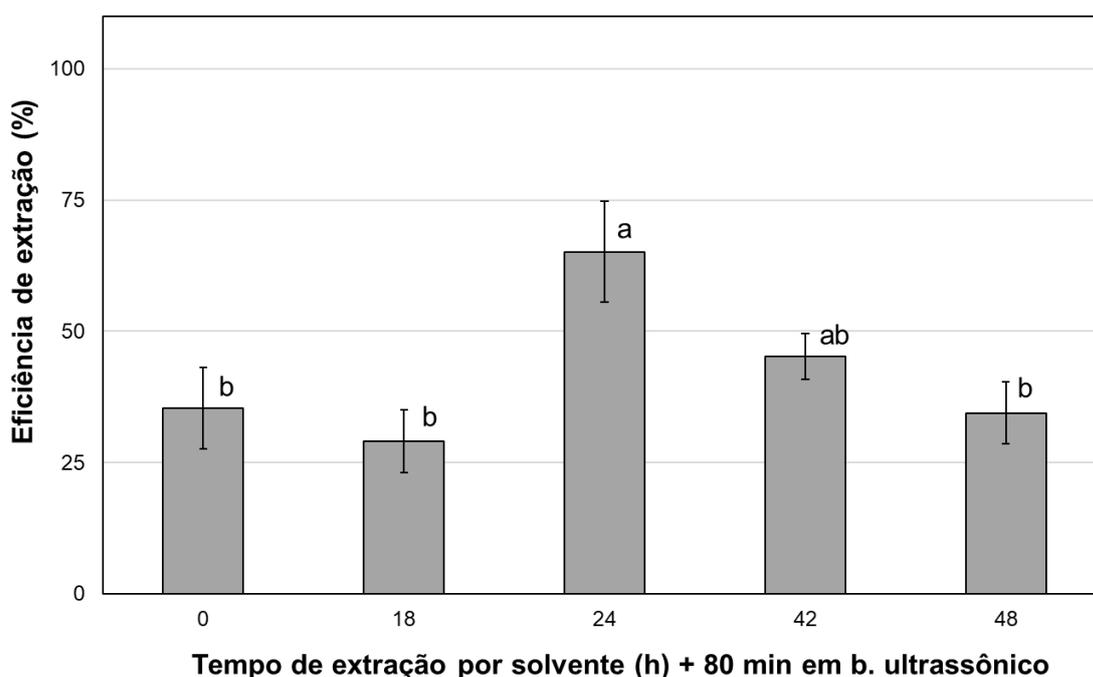
Dessa forma, foi avaliado o processo de extração com biomassa úmida para fins econômicos de se estabelecer o processo de extração. Primeiramente foi utilizado etanol como solvente e foi avaliada o processo de extração em banho ultrassônico. Após essa etapa estabelecida do processo foi verificado a influência da biomassa úmida e seca no processo de extração e dado a sequência da pesquisa com o teste de outros solventes e mistura de solventes.

4.2.2.1 Influência da extração de lipídio microbiano por solvente seguida da extração em banho ultrassônico

Foi avaliado o efeito da extração do lipídio microbiano utilizando biomassa úmida que passou pelo processo de extração por solvente, ou seja, extração por método químico e seguiu para o banho ultrassônico, extração por método físico. Desse modo, foram estabelecidos 4 tempos para a avaliação da extração por

solvente e foi realizado um teste comparativo apenas com a extração em banho ultrassônico. Os resultados foram apresentados na Figura 7.

Figura 7 - Extração por solvente seguida da extração em banho ultrassônico (80 min e 42 °C)



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

De acordo com a análise estatística o melhor tempo de extração por solvente ocorreu após 24h de imersão em etanol com tempo de cultivo de 144h. A eficiência de extração obtido no processo a partir de 24h em imersão no solvente seguida pela extração em banho ultrassônico correspondeu ao rendimento de extração de lipídio por biomassa de $29,2 \pm 4,3\%$, ou seja, promoveu a extração de aproximadamente 65% do teor lipídico presente na biomassa, ou seja, E correspondeu ao aumento de eficiência de extração de 54,2% em relação à amostra sem imersão em etanol.

O tempo de imersão de 42h em etanol apresentou-se eficiente na extração do lipídio microbiano, correspondendo a $45,2 \pm 4,4\%$. Já para o tempo de 18h e 48h o tempo de imersão não exerceu forte influência como facilitadores do processo de extração, quando comparados à amostra sem imersão.

Elboughdir (2018) estudou o efeito da extração de conteúdo fenólico utilizando etanol como solvente, verificou a evidência o tempo de 20h em contato com o solvente apresentou mais significativos correspondendo a aproximadamente 32% do rendimento de extração, enquanto a extração com 10h em contato com solvente apresentou rendimento de aproximadamente 20%.

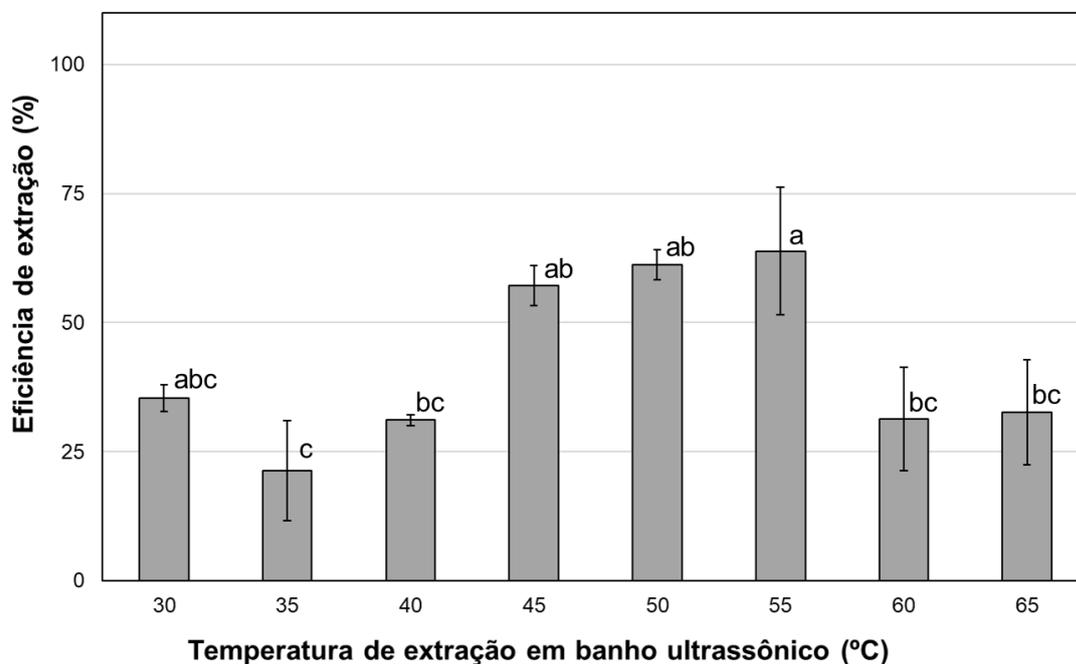
Outro estudo com extração de polifenóis, antioxidantes, de bagaço de uva apresentou melhor rendimento em 24h de extração utilizando o etanol como solvente. O estudo foi realizado em temperatura ambiente utilização 50g de bagaço e 100 mL do solvente nos tempos de 1h, 12h e 24h (LAPORNIK; PROŠEK; WONDRA, 2015)

Deste modo, diante dos resultados apresentados o tempo de imersão em etanol de 24h foi selecionado para ser utilizado na sequência da pesquisa.

4.2.2.2 Influência da temperatura na extração do lipídio microbiano em banho ultrassônico

Seguindo com o uso da biomassa úmida, outro fator avaliado na extração por ultrassom foi a influência da temperatura, uma vez que a determinação da temperatura ótima de extração tem sua importância, devido ao impacto no consumo de energia do processo (RAO *et al.*, 2015). Foram avaliadas as temperaturas de extração de 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C e 65 °C por 80 min de extração em ultrassom conforme mostrado na Figura 8.

Figura 8 - Influência da temperatura na extração dos lipídios microbianos em banho ultrassônico (24h de extração por solvente, 80 min banho ultrassônico)



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Foi observado que as temperaturas de 40 °C, 60 °C e 65 °C apresentaram eficiência extração lipídica de aproximadamente 30%. Enquanto as temperaturas de 45 °C a 55 °C conseguiram promover a extração de aproximadamente 57% e 61%, e segundo a análise estatística 45 °C, 50 °C e 55 °C apresentaram o mesmo resultado significativo, correspondendo a extração de 63,8% do teor lipídico. Por fim, o menor resultado de extração foi observado a uma temperatura de 35 °C com eficiência de extração de aproximadamente 21%.

A queda no rendimento de extração quando comparado com o experimento anterior (4.2.1) pode ser justificável pelo uso do banho acoplado ao banho ultrassônico, com a finalidade de controlar a temperatura durante o processo de extração para facilitar a aplicação em larga escala.

Segundo Rao *et al.* (2015), com o aumento da temperatura se observa também um aumento da solubilidade da amostra no solvente, acarretando um aumento da transferência de massa e, conseqüentemente, melhorando o processo de extração lipídica, conforme observado para as temperaturas de 40, 45 e 50 °C.

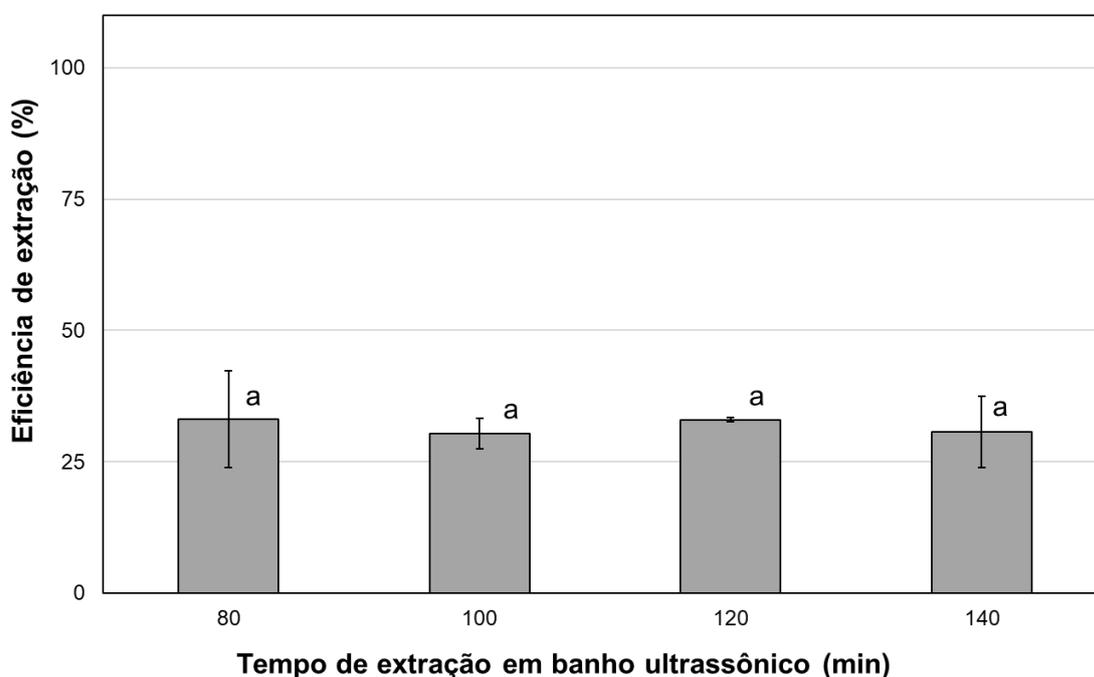
Tiwari (2015) acrescenta que o processo de cavitação pode ficar reduzido em altas temperaturas, devido ao preenchimento dos vazios por vapores de solvente, podendo assim estar relacionado à queda de rendimento de extração nas temperaturas de 60 e 65 °C.

Deste modo, a temperatura escolhida para dar sequência ao trabalho foi de 50 °C por promover a melhor eficiência de extração e ter menor desvio padrão.

4.2.2.3 Influência do tempo em banho ultrassônico na extração

Realizada a análise sobre a influência do tempo (80, 100, 120 e 140 minutos) de extração em banho ultrassônico a 50 °C utilizando biomassa úmida que permaneceu previamente por 24h em imersão em solvente. Os resultados foram apresentados na Figura 9.

Figura 9 - Influência do tempo na eficiência de extração lipídica
(24h imersão etanol; 50 °C em banho ultrassônico)



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

A eficiência de extração lipídica foi calculada para 80, 100, 120 e 140 minutos foram, respectivamente: $33,1 \pm 9,2\%$, $30,4 \pm 2,9\%$, $33,0 \pm 0,3\%$ e $30,6 \pm 6,8\%$. Portanto, segundo análise estatística todos os tempos de extração apresentaram a mesma eficiência de extração. Além disso, o tempo de extração reduzido representa economia energética nessa etapa do processo.

Segundo Selvakumar e Sivashanmugam (2019), o tempo ótimo de extração em banho ultrassônico será atingido quando houver tempo hábil para que ocorra a quebra da parede celular e consequente penetração significativa de solvente nas células, de modo a otimizar o processo de dissolução e extração dos lipídios.

Estudos apontam que o rendimento da extração pode diminuir quando se excede um determinado limite de tempo no banho ultrassônico (ZHOU *et al.*, 2018). Além disso, esse mesmo fator pode acarretar alterações indesejáveis no composto extraído (TIWARI, 2015).

Desse modo, foi possível verificar que nas condições do presente estudo o tempo de extração em banho ultrassônico correspondendo a 80 min. foi escolhido para a continuação às análises subsequentes.

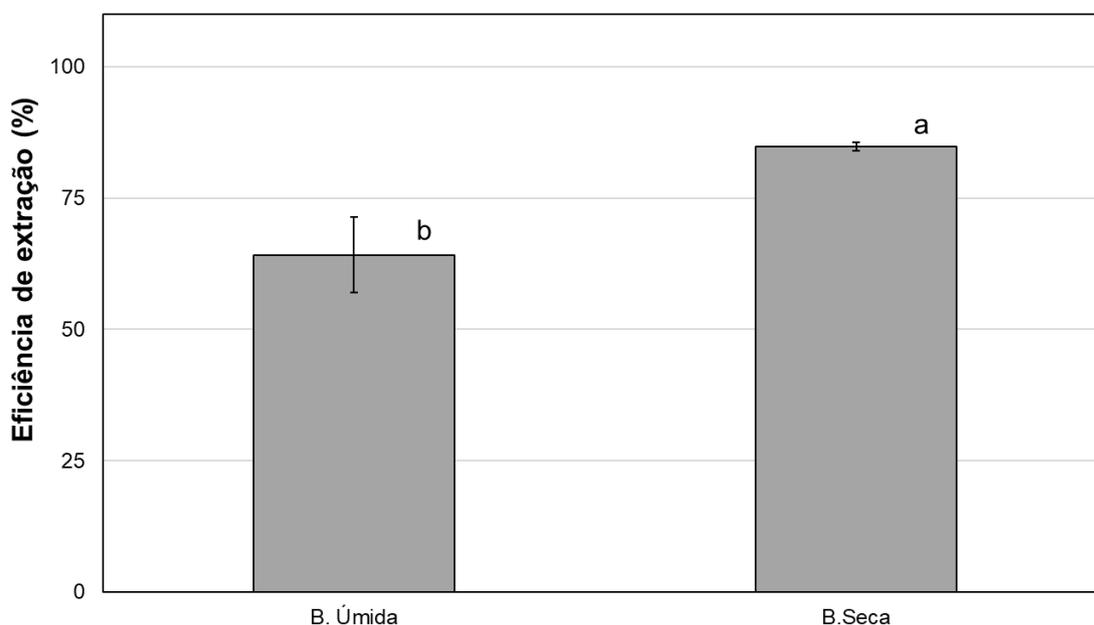
4.2.2.4 Comparação do processo de extração em banho ultrassônico utilizando biomassa úmida e seca

Neste estudo o processo de extração do lipídeo microbiano em banho ultrassônico foi pré-determinado utilizando biomassa úmida. No entanto, a comparação do uso de biomassa seca tornou-se um novo ponto a ser abordado, visando determinar a eficiência do processo de extração lipídico.

Os resultados do teste comparativo utilizando biomassa seca e úmida, foram apresentados na Figura 10. A biomassa úmida apresentou teor de umidade $\leq 80\%$ enquanto a biomassa seca $\leq 5\%$.

Figura 10 - Comparativo da eficiência de extração lipídica utilizando biomassa seca e úmida

(24h de extração por solvente; 50° e 80 min extração em banho ultrassônico)



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Os cálculos foram realizados baseando-se na eficiência da extração lipídica. Avaliando a extração por solvente, com a biomassa seca foi atingida a extração de aproximadamente 84,8%, enquanto na extração com biomassa úmida a eficiência de extração lipídica foi de aproximadamente 64,2%.

Comparando os dados experimentais obtidos com os da literatura, é possível avaliar que a biomassa úmida apresenta vantagem econômica em relação à extração da biomassa seca, uma vez que essa última necessita passar pelo processo de secagem previamente à extração, demandando maior tempo e energia no processo (DALMAS NETO *et al.*, 2020). No entanto, a secagem da biomassa trata-se de um processo escalonável de grande aplicação industrial que pode apresentar vantagens ao processo de extração. Dong *et al.* (2016) acrescentam que a presença de água na biomassa, reduz a transferência de massa e formação de emulsão dificultando a extração por solventes.

Além disso, um estudo realizado por Zhu, Zhou, Yu (2002), utilizando o fungo filamentoso *Mortierella alpina* foi obtido rendimento de extração superior utilizando biomassa seca à biomassa úmida, correspondendo a 41,1% e 27,6% respectivamente. Os autores justificam a diferença dos resultados obtidos devido a não extração de lipídios presentes na membrana quando utilizada a biomassa úmida. Desse modo, a biomassa seca pode apresentar vantagens industriais quando comparada à úmida, diminuindo a quantidade de matéria-prima a ser empregada.

4.2.2.5 Influência da extração por solvente seguida da extração de lipídio em banho ultrassônico

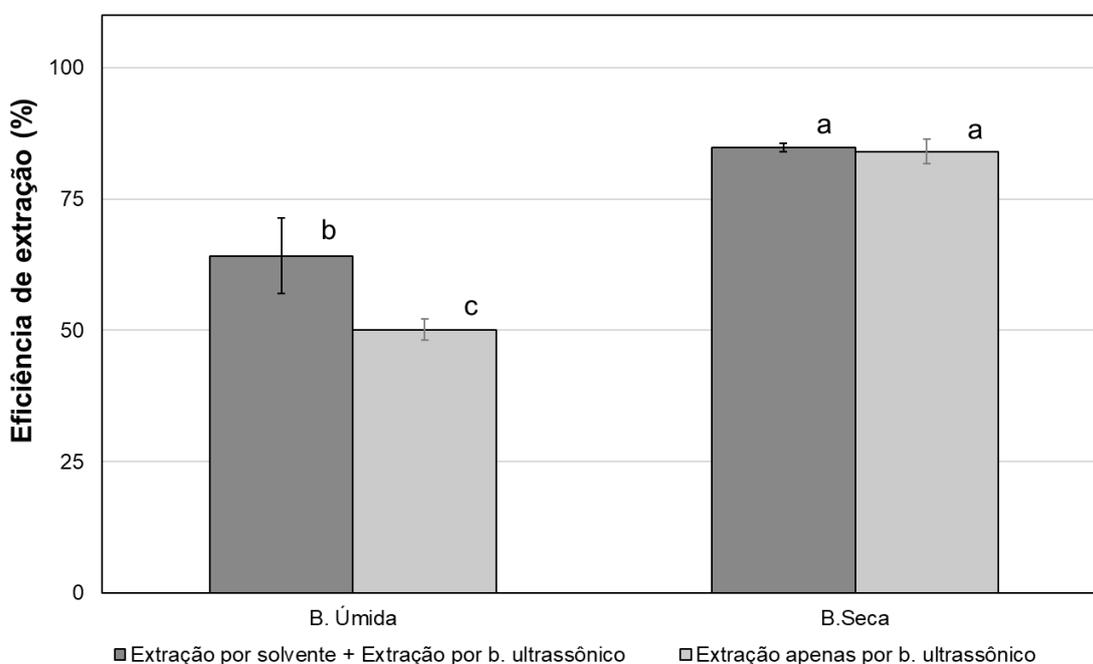
A fim de investigar a melhor aplicação da biomassa, seca ou úmida, foi avaliado o efeito da extração do lipídio microbiano por solvente (24h de imersão e etanol), seguida do processo em banho ultrassônico para biomassa seca e úmida (80 min e 50 °C). Os resultados foram apresentados na Figura 11.

Com base nos dados apresentados, o tempo de imersão de 24h em etanol promoveu o aumento na eficiência de extração do lipídio microbiano para biomassa úmida facilitando o processo de extração em banho ultrassônico. O maior resultado pode ser justificável pelo tempo hábil para que o solvente penetre na célula facilitando a dissolução e extração dos lipídios (SELVAKUMAR; SIVASHANMUGAM, 2019). Já para a biomassa seca a extração por solvente não apresentou níveis consideráveis como facilitadores do processo de extração por apresentarem eficiência de extração lipídica de 84,8% com a extração por solvente seguida da extração por banho ultrassônico e eficiência de extração de 84,0% para extração apenas em banho ultrassônico.

Dessa forma, foi possível verificar que o processo de extração utilizando biomassa seca continua sendo mais eficiente do que a biomassa úmida. Além disso, fundamentado pela análise estatística a biomassa seca apresentou o mesmo rendimento sem tempo de repouso em etanol, e em 24h de imersão em

etanol, dessa forma, torna-se plausível a utilização da biomassa seca com o propósito de reduzir uma etapa do processo de extração, aumentar a vida útil da biomassa, apresentar baixo de custo de armazenamento e transporte. Sendo assim, a biomassa seca sem repouso em etanol foi escolhida para dar continuidade aos estudos.

Figura 11 - Avaliação da eficiência do processo de extração lipídica para biomassa seca e úmida com extração por solvente seguida da extração em banho ultrassônico (24h extração por solvente e 80 min e 50 °C em banho ultrassônico) e com extração apenas em banho ultrassônico (80 min banho ultrassônico, 50 °C)

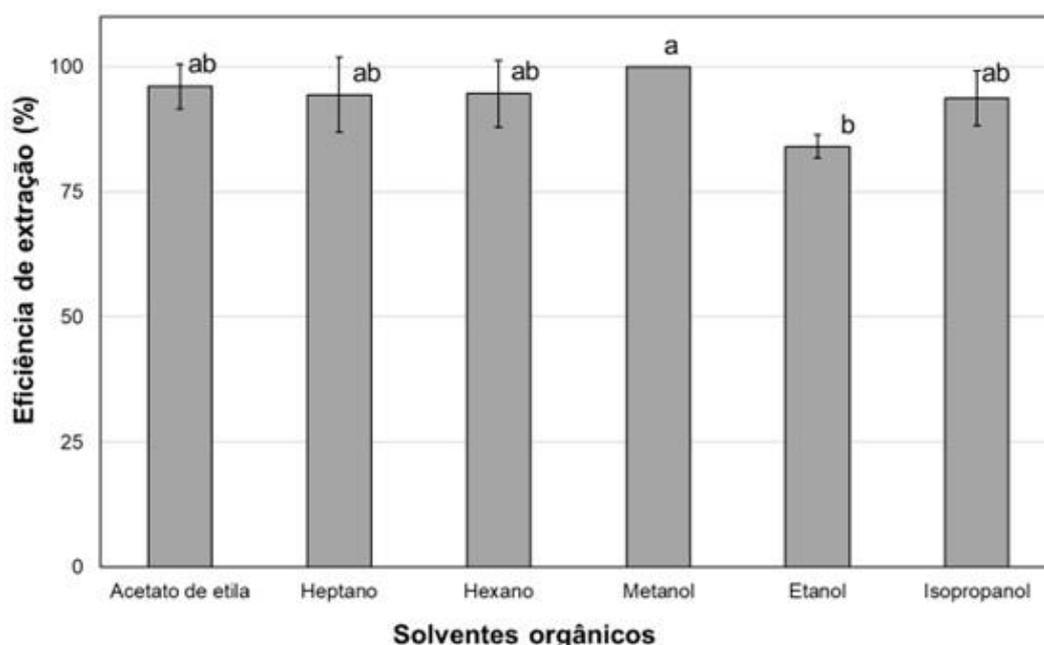


Fonte: Elaborada pela autora (2021).

4.2.2.6 Extração de lipídio microbiano em banho ultrassônico utilizando solventes orgânicos

Após a determinação das condições de extração em banho ultrassônico utilizando o etanol como solvente e verificação que a biomassa seca apresentou boa eficiência de extração, foram realizadas extrações com solventes como acetato de etila, hexano, heptano, metanol, isopropanol e o etanol que foi a amostra controle, cujos resultados foram apresentados na Figura 12.

Figura 12 - Eficiência de extração de lipídio microbiano utilizando diferentes solventes orgânicos (50 °C e 80 min banho ultrassônico)



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Como solvente apolares tem-se o hexano e o heptano pertencente à classe dos hidrocarbonetos e o acetato de etila pertencente ao grupo dos ésteres. Já os solventes polares utilizados no estudo foram o metanol, o etanol e o isopropanol, todos da classe dos álcoois. A polaridade do solvente deve ser similar a polaridade do composto alvo com o intuito de obter a melhor extração desse composto (MUSSAGY *et al.*, 2020).

A pesquisa possibilitou avaliar a extração em banho ultrassônico utilizando solventes apolares e polares. Entre os solventes foram adicionados o hexano (apolar) e metanol (polar), para efeito comparativo do potencial de extração dos solventes verdes quando comparado a estes solventes que apresentam grande empregabilidade na extração de óleo e necessitam ser substituindo. O hexano é amplamente empregados nos processos de extração e a necessidade de ser substituído por opções mais adequados por apresentarem graves problemas a saúde e ao meio ambiente (DE JESUS; MACIEL FILHO, 2020).

Os resultados obtidos foram estatisticamente semelhantes para o acetato de etila, heptano, hexano, etanol e isopropanol, apresentando eficiência média de extração do lipídio microbiano de aproximadamente 95%, sendo o teste com metanol o que apresentou maior eficiência de extração lipídica, promovendo a extração total dos lipídios acumulados na biomassa do *A. oryzae*.

Com base nos dados apresentados e na análise estatística o rendimento de extração do etanol e isopropanol foram semelhante e podem ser considerados possíveis substitutos para o metanol devido as propriedades físicas semelhante e a baixa toxicidade, porém a alta polaridade e solubilidade ainda é uma barreira (DE JESUS; MACIEL FILHO, 2020).

Os solventes apolares hexano e heptano são hidrocarbonetos, ou seja, são provenientes de fontes de petróleo. Já o acetato de etila é um éster, que se apresentou eficiente na extração lipídica do *A. oryzae* promovendo a extração de 96% dos lipídios presentes na biomassa. Estudos de extração de lipídios com solventes verdes aplicados a levedura e microalgas, também demonstraram que o hexano pode ser substituído pelo acetato de etila (IMATOUKENE, *et al.*, 2020). Dessa forma, considerando um procedimento industrial mais verde e sustentável é possível faz o uso do acetato de etila sem perder a eficiência do processo de extração.

Além do rendimento de extração foi realizada a análise do perfil de ácidos graxos extraídos cujos resultados foram apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Perfil de ácidos graxos obtidos do *A. oryzae* utilizando extração em banho ultrassônico com diferentes solventes

Ácidos Graxos		Acetato	Heptano	Hexano	Metanol	Etanol	Isopropanol
		de etila					
		Composição (%)					
Mirístico	C14:0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
Palmítico	C16:0	33 ± 0	36 ± 4	33 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	23 ± 1
Palmitoleico	C16:1	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	-	1 ± 0
Esteárico	C18:0	12 ± 0	12 ± 1	12 ± 0	8 ± 0	8 ± 0	8 ± 0
Oleico	C18:1	41 ± 3	41 ± 4	42 ± 1	39 ± 0	39 ± 0	40 ± 0
Linoleico	C18:2	2 ± 0	1 ± 0	3 ± 2	14 ± 1	14 ± 0	13 ± 0
Nonadecanóico	C19:0	-	-	-	10 ± 1	10 ± 0	10 ± 0

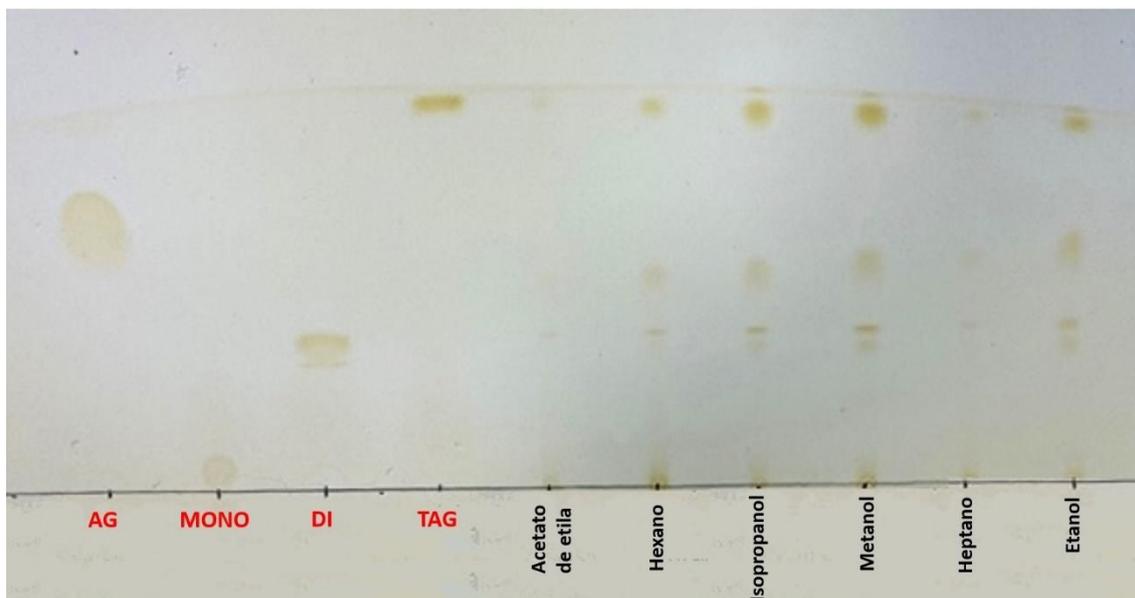
Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Através do perfil de ácidos graxos foi possível verificar que os solventes mais apolares (acetato de etila, heptano e hexano) apresentaram perfil de ácidos graxos semelhantes, e para os solventes polares (metanol, etanol, isopropanol) o mesmo aconteceu.

Os solventes apolares promoveram melhor extração dos ácidos graxos mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0) em relação aos solventes polares. Enquanto os solventes polares apresentam o perfil de ácidos graxos extraído com maior incidência do ácido linoleico (C18:2) e nonadecanóico (C19:0). E tanto polares como apolares proveram a extração de ácidos graxos palmitoleico (C16:1), oleico (C18:1) iguais segundo a análise estatística.

Para complementar os resultados apresentados através do perfil de ácidos graxos, foi realizada a cromatografia de camada delgada para determinação, de forma qualitativa, do perfil dos lipídios extraídos, com base na metodologia apresentada no item 3.7.9. Logo, os resultados obtidos foram apresentados na Figura 13.

Figura 13 - Cromatografia de camada de delgada para determinação dos lipídios extraídos em banho ultrassônico utilizando solventes



AG: ácido graxo; MONO: monoglicerídeo; DI: diglicerídeo; TAG: triacilglicerol

Fonte: Própria autora (2022)

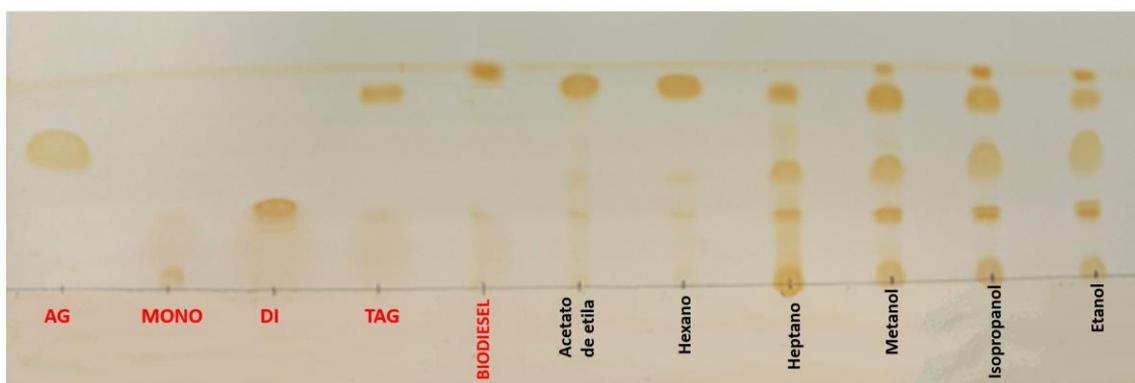
Conforme apresentado na Figura 13, foi possível determinar de forma qualitativa a presença de ácidos graxos, monoglicerídeo, diglicerídeo e triacilgliceróis pela análise de TLC.

No mais, os solventes acetato de etila, heptano e hexano tornaram mais evidentes a extração dos triacilgliceróis, enquanto que os ácidos graxos, monoglicerídeos e diglicerídeos também estão presentes, porém com menos destaque. A extração de triacilgliceróis mais evidentes no hexano e acetato de etila se justifica pelo lipídeo extraído pelo solvente, o hexano tem afinidade com a extração de triacilgliceróis (MENEGAZZO; FONSECA, 2019).

Já os solventes isopropanol, etanol e metanol, foi possível evidenciar a presença de ácidos graxos, monoglicerídeos, triglicerídeos e apresentou destaque para a identificação de mais de um tipo de diglicerídeo.

Do mesmo modo, foi evidenciado um composto cujos padrões na Figura 12 não tornaram possível a identificar e para isso foi realizada nova TCL para verificação se o composto encontrado se tratava éster, então foi utilizado o padrão de biodiesel. O resultado foi apresentado na Figura 14.

Figura 14 - Cromatografia de camada delgada para identificação da presença de éster no lipídio extraído



AG: ácido graxo; MONO: monoglicerídeo; DI: digliceródo; TAG: triacilglicerol

Fonte: Própria autora (2022).

A partir da TLC foi possível verificar que o composto formado pode ser um possível éster presente na biomassa. Embora este composto esteja presente apenas na classe dos álcoois: isopropanol, etanol e metanol. Segundo a literatura, a síntese do éster necessita de um catalisador, ou seja, o biodiesel ocorre a partir da por transesterificação de triglicerídeos ou esterificação de ácidos graxos livres com álcool de cadeia curta, como metanol, etanol, propanol e butanol na presença de um catalisador em excesso na leve presença de um catalisador ácido, básico ou enzima (AGHBASHLO *et al.*, 2021).

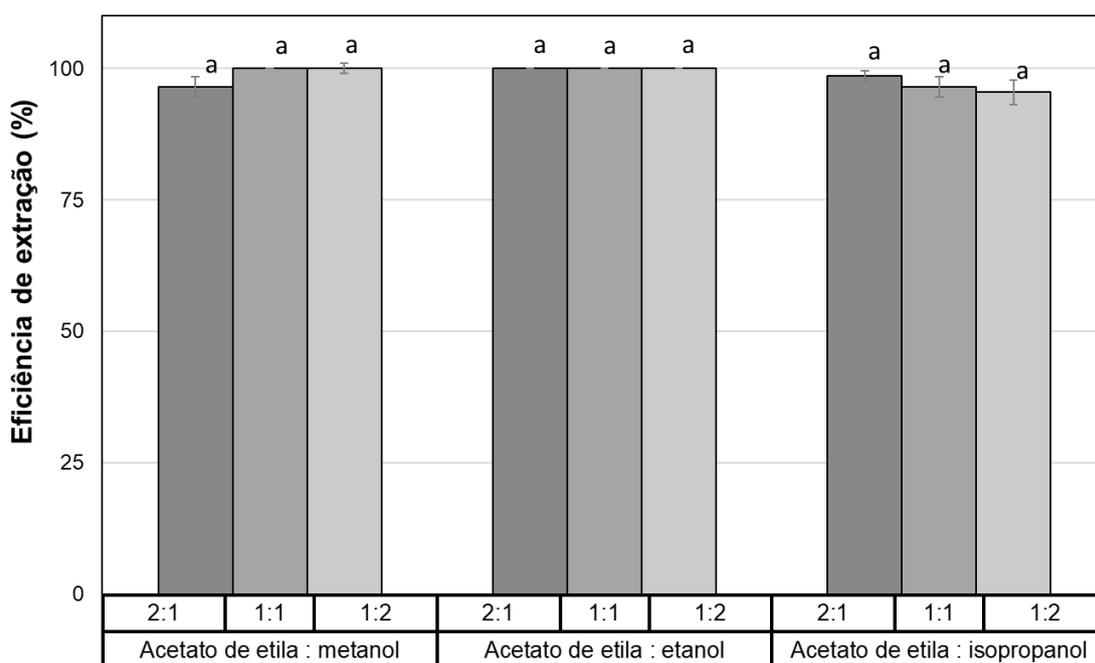
4.2.2.7 Extração de lipídio microbiano em banho ultrassônico utilizando mistura de solventes

Com a finalidade de aumentar o rendimento de extração com o uso de solventes orgânicos com a polaridade e dentro da premissa "Similar dissolve similar" foram realizadas mistura de solventes com base nos dados apresentados anteriormente, sendo o acetato de etila escolhido como a parte apolar da mistura. Além de ser um solvente verde o acetato de etila apresenta ponte de ebulição relativamente baixo (77°C, 1 atm), o que torna um facilitador

na separação do lipídio do solvente, conseqüentemente gera menor demanda energética (LU; WANG; YUAN, 2015).

E para a parte polar da mistura foram realizadas extrações com os álcoois: metanol, etanol e isopropanol nas proporções 2:1, 1:1 e 1:2, conforme apresentado na Figura 15.

Figura 15 - Eficiência de extração do lipídio microbiano utilizando mistura de solventes (80 min e 50 °C em banho ultrassônico)



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Neste teste foi avaliado a eficiência de extração do lipídio microbiano em banho ultrassônico diante de diferentes misturas de solventes e proporções entre as misturas.

Para a mistura de acetato de etila com metanol observou-se que as proporções 1:1 e 1:2 conseguiram realizar a extração total dos lipídios presentes na biomassa do *A. oryzae*; e a proporção de 2:1 ficou muito próxima da extração total dos lipídios conseguindo extrair cerca de 96,6% do teor lipídico da biomassa. Não sendo observado diferenças significativas nos resultados para todas as proporções utilizando a mistura acetato de etila: metanol.

Analisando a mistura acetato de etila: etanol todas as proporções avaliadas conseguiram promover a extração total do lipídio microbiano, ou seja, 100% do lipídio presente na biomassa do fungo filamentosso em estudo e desse modo não foi observado diferença estatisticamente significativa.

Finalmente, analisando a mistura acetato de etila: isopropanol foi obtido eficiência de extração de lipídio de 98,5% para proporção 2:1, 96,5% para proporção 1:1 e 95,5% para proporção 1:2, e não apresentaram diferenças estatísticas significativas.

Assim sendo, segundo a análise estatística todas as proporções avaliadas utilizando mistura de solvente resultaram na extração total do lipídio microbiano acumulado pelo *A. oryzae*. No entanto, o uso do metanol como solvente de alta empregabilidade industrial acarreta efeitos maléficso ao meio ambiente e a saúde humana e seu uso em larga escala pode ser inviável. Ademais, a mistura de acetato de etila: etanol em quaisquer proporções, que apresenta características mais interessantes em relação a produção mais limpa. Pode-se acrescentar que o rendimento de extração do lipídio microbiano fazendo o uso de misturas de solvente foi significativamente maior que a extração realizada com apenas um solvente, isso se justifica pelo uso de misturas de solventes polares e apolares que promovem aumento na extração (MENEGAZZO; FONSECA, 2019).

Embora o rendimento tenha sido aumentado quando utilizado a mistura de solventes foi avaliado também o perfil de ácidos graxos extraídos, conforme apresentado na Tabela 10.

Tabela 10 - Perfil de ácidos graxos extraídos em banho ultrassônico utilizando mistura de solventes

Ácido graxo	Acetato de etila e Metanol			Acetato de etila e Etanol			Acetato de etila e Isopropanol		
	(2:1)	(1:1)	(1:2)	(2:1)	(1:1)	(1:2)	(2:1)	(1:1)	(1:2)
	Concentração (%)								
C8:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C10:0	-	-	-	2,2 ± 0	-	-	-	-	-
C12:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C14:0	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,9 ± 0,6	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,5	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,0	1,4 ± 0,1
C16:0	24,2 ± 0,1	22,8 ± 1,7	22,7 ± 1,5	24,8 ± 1,4	23,4 ± 2,6	24,8 ± 1,1	25,4 ± 0,0	23,1 ± 0,9	24,1 ± 0,4
C16:1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,0	-	-	2,4 ± 1,3	1,5 ± 1,0	-	0,9 ± 0,3
C18:0	8,3 ± 0,4	7,2 ± 0,4	7,5 ± 0,9	8,7 ± 1,1	8,4 ± 0,1	8,7 ± 1,6	7,7 ± 0,1	8,6 ± 0,7	9,5 ± 1,1
C18:1	39,2 ± 0,6	40,2 ± 0,2	39,3 ± 1,4	40,2 ± 0,0	41,3 ± 1,0	37,6 ± 0,4	40,4 ± 1,5	39,2 ± 1,5	39,5 ± 0,2
C18:2	13,4 ± 0,8	13,7 ± 1,9	12,9 ± 0,7	13,8 ± 1,0	11,9 ± 0,8	13,2 ± 0,7	15,0 ± 1,2	13,3 ± 1,2	13,8 ± 0,4
C19	10,3 ± 0,5	11,0 ± 0,9	10,5 ± 1,5	7,4 ± 2,3	13,0 ± 3,3	9,8 ± 0,0	7,9 ± 1,0	11,3 ± 2,7	9,4 ± 0,5
Outros	2,4 ± 0,2	2,0 ± 0,9	5,3 ± 0,6	0,9 ± 0,1	2,0 ± 0,1	3,0 ± 0,4	1,1 ± 0,2	2,5 ± 0,2	1,5 ± 0,3
SFAs	44,1	42,1	41,9	45,0	45,9	44,6	42,1	44,3	44,4
MUFAs	40,0	41,0	40,0	40,2	41,3	40,0	42,0	39,2	40,4
PUFAs	13,4	13,7	12,9	13,8	11,9	13,2	15,0	13,3	13,8

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Com base no perfil de ácidos graxos foi possível verificar que a extração utilizando mistura de solventes apresentaram um perfil de ácidos graxos bem próximos. Dessa forma, os ácidos graxos com maior percentual foram: 38-41% oleico (C18:1), palmítico 23-25% (C16:0), linolênico 12-25% (C18:2), 9-11% nonadecanóico (C19:0) e 7-9% esteárico (C18:0).

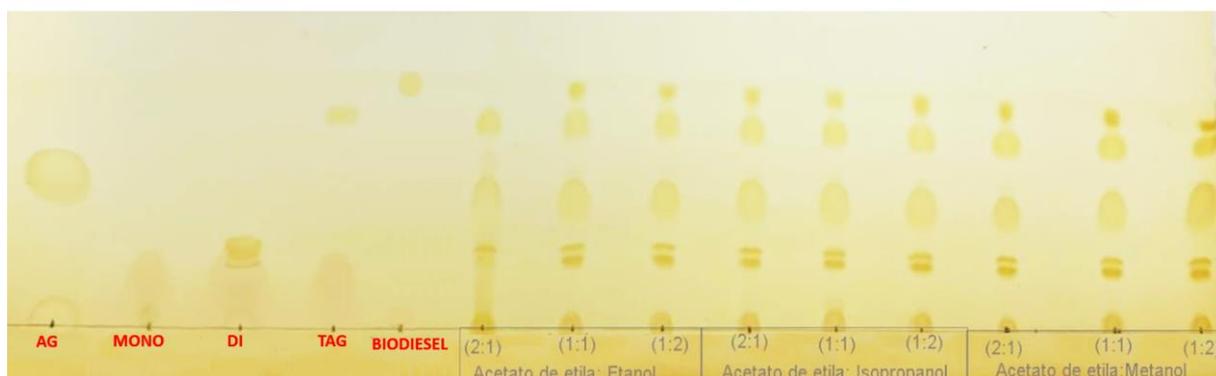
As diferenças significativas encontradas foram relevantes a mistura acetato de etila: etanol (2:1) onde foi extraído 2% do ácido graxo cáprico (C10:0) que não foi extraído pelos solventes e pelas outras misturas de solventes.

E comparando com o perfil de ácidos graxos encontrados na extração com solvente, a mistura promoveu a extração do nonadecanóico (C19:0) que não era extraído pelos solventes apolares, aumentou a extração do ácido linolênico (C18:2) e foi reduzida a extração do palmítico (C16:0).

O perfil de ácidos graxos extraídos muito semelhantes é justificável pelos componentes da mistura, ou seja, a mistura foi composta por acetato de etila e grupo álcool de cadeia pequena (metanol, etanol e isopropanol) que apresenta propriedades física semelhantes entre si (DE JESUS; MACIEL FILHO, 2020).

Com o intuito de verificar a os lipídios extraídos utilizando mistura de solventes foi realizada a TCL, descrita no método 3.7.9, cujos resultados foram apresentados na Figura 16.

Figura 16 - Cromatografia de camada de delgada para determinação dos lipídios extraídos em banho ultrassônico utilizando misturas de solventes



AG: ácido graxo; MONO: monoglicerídeo; DI: diglicerídeo; TAG: triacilglicerol

Fonte: Própria autora (2022).

A partir da TLC foi possível determinar os lipídios extraídos, fazendo o uso da mistura de solventes. Dessa forma, todas as misturas de solventes promoveram a extração de ácidos graxos, monoglicerídeos, diglicerídeos, triacilgliceróis.

Apenas a mistura de solventes acetato de etila: etanol (2:1) não apresentou a presença de éster em sua composição tornou-se mais interessante indo de encontro com o intuito do trabalho que é a produção e extração de lipídio microbiano para fins nutracêuticos.

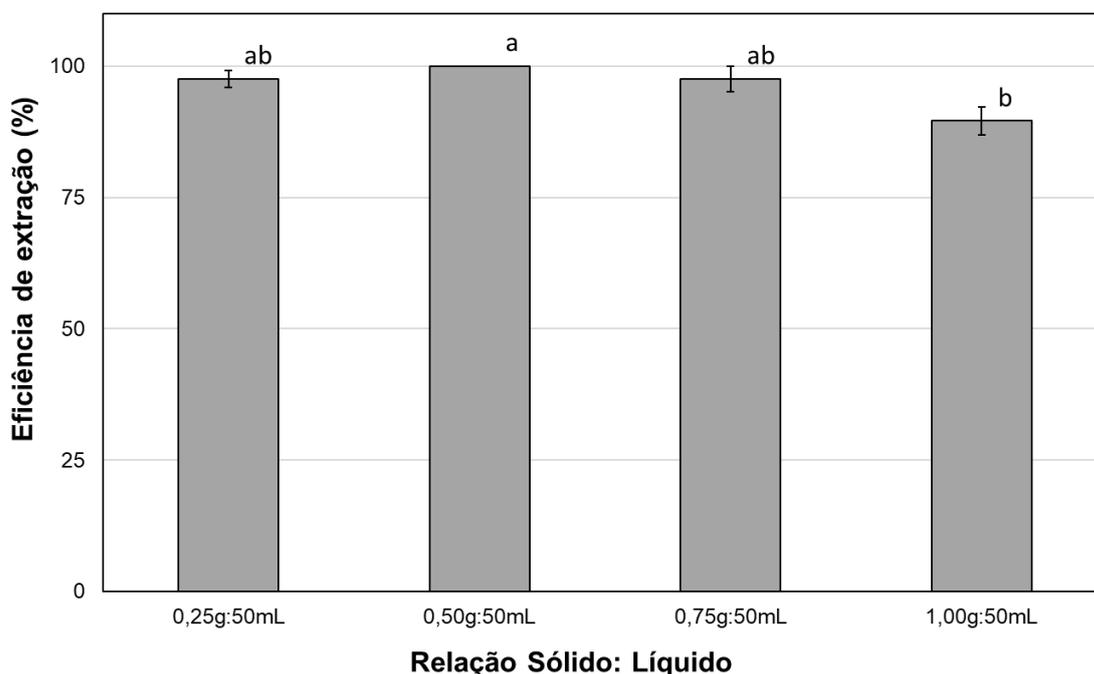
A mistura de solventes acetato de etila: etanol (2:1) foi escolhida pela eficiência de extração do lipídio microbiano e a capacidade da mistura de extrair ácidos graxos, monoglicerídeos, diglicerídeo e triglicerídeos. Ademais o etanol é solvente de baixo custo, renovável, seguro com forte afinidade pelo complexo de lipídios do *A. oryzae*. E juntamente com o acetato de etila é possível promover uma extração em banho ultrassônico com uso de solventes verde e que apresentou a mesma eficiência de extração de lipídio microbiano que os métodos convencionais, como Bligh & Dyer, que foi utilizado como base para os cálculos de eficiência do processo de extração de lipídio microbiano desenvolvido. E os resultados indicam que a união de solventes polares e apolares podem promover uma extração eficiente lipídio microbiano. Acrescenta-se que o perfil lipídico e de ácidos graxos por esta mistura foram condizentes com o intuito do trabalho, ou seja, a utilização do lipídeo extraído para fins nutracêuticos. Dessa forma, foi dado continuidade ao trabalho utilizando a mistura acetato de etila:etanol (2:1).

4.2.2.8 Melhoria do processo de extração do lipídio microbiano em banho ultrassônico

O último passo do trabalho foi o melhoramento do processo de extração do lipídio microbiano em banho ultrassônico. Dessa forma, foram avaliados a relação sólido: líquido, temperatura de extração em banho ultrassônico e tempo de extração em banho ultrassônico.

A avaliação da relação sólido: líquido é essencial para promover a melhor extração dos lipídios. Dessa forma, foram testados diferentes g de biomassa: mL da mistura de solvente acetato de etila: etanol (2:1); e os resultados obtidos estão expressos na Figura 17.

Figura 17 - Influência da relação sólido: líquido na extração de lipídio microbiano em utilizando mistura de solvente (80 min e 50 °C em banho ultrassônico)



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

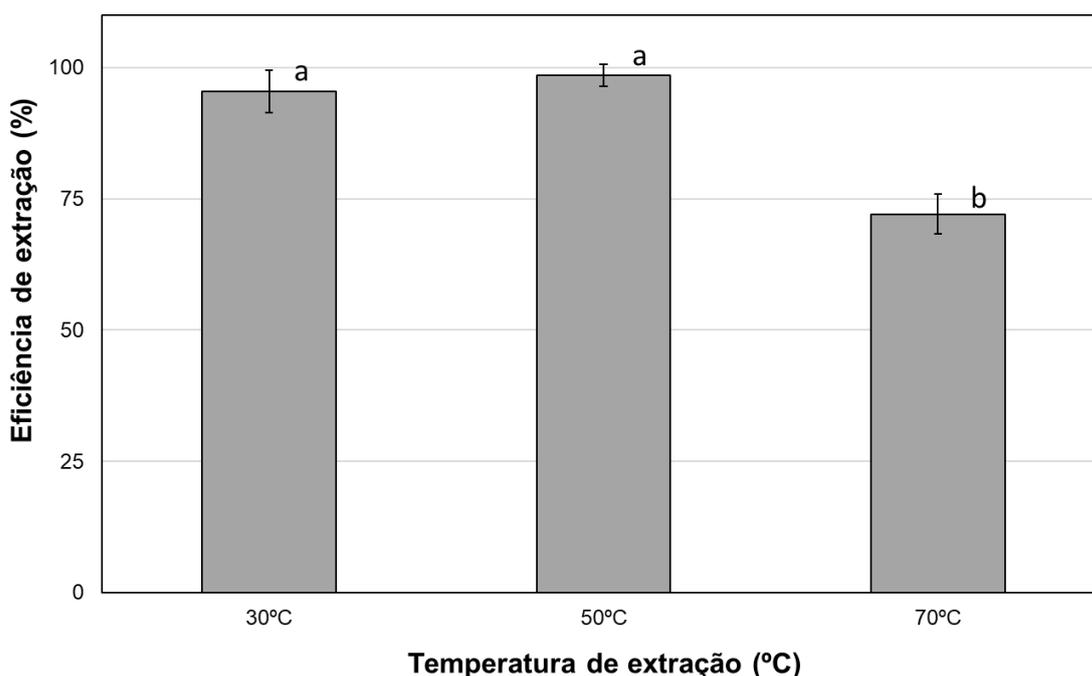
A eficiência de extração lipídica obtido da relação sólido: líquido 0,25g: 50mL foi de $97,5 \pm 1,6\%$, enquanto para a relação 0,5g: 50mL foi de 100%. Já para a relação 0,75g:50mL foi de $97,5 \pm 2,4\%$ e para a relação 1,0 g: 50mL foi de $89,6 \pm 2,7\%$.

Segundo a análise estatística o melhor rendimento foi obtido na proporção 0,5 g: 50 mL que conseguiu promover a extração total do lipídio microbiano presente na biomassa. O resultado obtido pode ser justificável pelo aumento no gradiente de concentração entre a fase líquida e sólida, o que torna melhor a transferência de massa, acarretando melhor rendimento (ZHONG *et al.*, 2018). Dessa forma, a proporção 0,5g: 50 mL foi escolhida para dar continuidade ao

trabalho seguindo para a avaliação da temperatura de extração em banho ultrassônico.

Foram avaliadas as temperaturas iniciais de 30 °C, 50 °C e 80 °C os dados foram apresentados na Figura 18.

Figura 18 - Influência da temperatura na extração de lipídio microbiano utilizando mistura de solventes. (80 min em banho ultrassônico)



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Para as temperaturas iniciais de 30 °C, 50 °C e 70 °C foram obtidas as respectivas eficiências de extração do lipídio microbiano: 95,4 ± 2,3%, 98,5 ± 2,1% e 72,0 ± 3,8%.

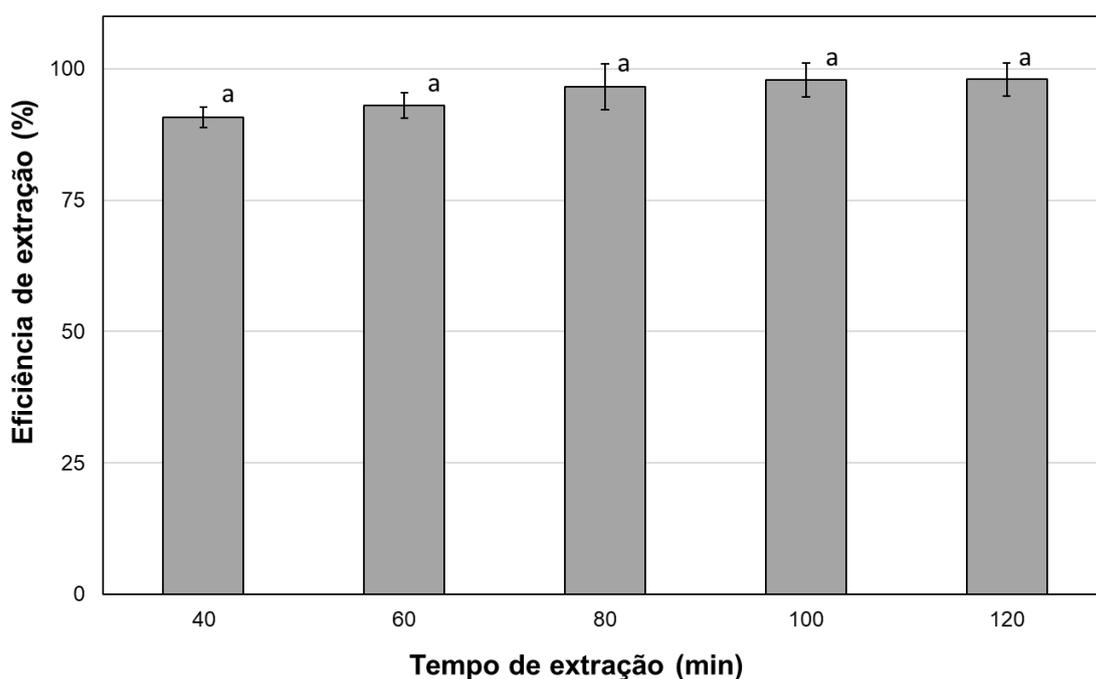
Os dados apresentados atraem a atenção para a temperatura de 30 °C que apresentou mesmo resultado estatístico que a temperatura de 50 °C. E este fato pode ser justificável pelo aumento da temperatura do banho ultrassônico ao longo do processo de extração, conforme afirmado por Tiwari (2015), que no banho ultrassônico é inevitável a mudança de temperatura devido à energia sonora.

A extração com temperatura inicial 30 °C finaliza o processo com aproximadamente 41°C enquanto a temperatura de 50 °C apresentou uma pequena variação, correspondendo a 50 ± 2°C. Dessa forma, visando um

processo de extração com baixa demanda energética a temperatura de 30 °C é mais atrativa para a extração em banho ultrassônico.

E por fim, foi avaliado o tempo de extração em banho ultrassônico utilizando a mistura de solventes acetato de etila: etanol (2:1). Dessa forma foram avaliados os tempos 40 min., 60 min., 80 min., 100 min. e 120 min. conforme apresentado na Figura 19.

Figura 19 - Influência do tempo de extração de lipídio microbiano em banho ultrassônico utilizando a mistura de solvente (temperatura inicial de 30 °C)



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Analisando a extração do lipídio microbiano em temperatura inicialmente de 30 °C, pelo tempo de 40 min., 60 min., 80 min., 100 min. e 120 min., foi atingida as respectivas eficiências de extração: 90,7 ± 2,0%, 93,0 ± 2,4%, 96,6 ± 4,4%, 97,8 ± 3,3% e 97,9 ± 3,2%.

Segundo a análise estatística todos os testes apresentaram o mesmo resultado significativo. Demonstrando, deste modo, que se pode optar pelo menor tempo de extração, 40 minutos, acarretando menor tempo de produção e menor demanda energética, promovendo um melhor aproveitamento da matéria prima e dos recursos e produtos utilizados no processo de extração.

Este fato corrobora com a busca por uma extração verde, conforme afirma Hu *et. al* (2021), em que as melhores tecnologias de extração devem se concentrar no menor impacto ambiental, como neste caso um menor consumo de energia.

4.3 COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO DO PROCESSO ESTUDADO: CULTIVO E EXTRAÇÃO DE LIPÍDIO MICROBIANO DO *A. ORYZAE*

Visando-se avaliar o desempenho do processo de cultivo do fungo filamentosso *A. oryzae* e as condições de extração do lipídio microbiano em banho ultrassônico fazendo-se o uso de solventes orgânicos verdes foi construída a Tabela 11 com o resumo das melhores condições estudadas. Na tabela foram apresentadas as condições de extração, uso de pré-tratamento, tipo de biomassa aplicada, tempo de extração em banho ultrassônico, temperatura de extração em banho ultrassônico, relação sólido: líquido de g biomassa por mL solvente em uso, solvente utilizado e o rendimento da extração em função do lipídio extraído pela biomassa utilizada.

Tabela 11 - Comparação do desempenho do processo cultivo e extração de lipídio microbiano do *A. oryzae*

(continua)

Testes	Pré-tratamento	Condições de extração em b. ultrassônico					Eficiência de extração lipídica (%)
		Tipo de Biomassa	Tempo (min)	Temp. (°C)	Relação Sólido: Líquido (g. mL ⁻¹)	Solvente	
Meio de cultura B (144h de cultivo)	-	Úmida	80	Inicial 42°C	0,5:50	Etanol	73,0 ± 11,0
48h de cultivo	-	Úmida	80	Inicial 42°C	0,5:50	Etanol	62,0 ± 7,1
Extração por solvente (Pré-tratamento)	24h de Extração por solvente	Úmida	80	Inicial 42°C	0,5:50	Etanol	65,1 ± 9,6
Extração com temperatura constante	24h de Extração por solvente	Úmida	80	50 °C	0,5:50	Etanol	61,2 ± 2,9
Tempo de extração	24h de Extração por solvente	Úmida	80	50 °C	0,5:50	Etanol	33,1 ± 9,2
Tipo de Biomassa	24h de Extração por solvente	Seca	80	50 °C	0,5:50	Etanol	84,8 ± 0,8
	-	Seca	80	50 °C	0,5:50	Etanol	84,0 ± 2,3
Extração com solventes orgânicos	-	Seca	80	50 °C	0,5:50	Acetato de etila	96,0 ± 4,5
	-	Seca	80	50 °C	0,5:50	Hexano	94,6 ± 6,7
	-	Seca	80	50 °C	0,5:50	Heptano	94,3 ± 7,5
	-	Seca	80	50 °C	0,5:50	Metanol	100,0 ± 0,0
	-	Seca	80	50 °C	0,5:50	Isopropanol	93,7 ± 5,5

Tabela 12 - Comparação do desempenho do processo cultivo e extração de lipídio microbiano do *A. oryzae*

(conclusão)

Testes	Pré-tratamento	Condições de extração em b. ultrassônico					Eficiência de extração lipídica (%)
		Tipo de Biomassa	Tempo (min)	Temp. (°C)	Relação Sólido: Líquido (g. mL ⁻¹)	Solvente	
Extração com mistura de solventes orgânicos	-	Seca	80	50 °C	0,5:50	Acetato de etila: etanol (2:1)	100,0 ± 0,0
Relação Sólido: Líquido	-	Seca	80	50 °C	0,5:50	Acetato de etila: etanol (2:1)	100,0 ± 0,0
Temperatura de extração	-	Seca	80	Inicial 30 °C	0,5:50	Acetato de etila: etanol (2:1)	95,5 ± 2,0
Tempo de extração	-	Seca	40	Inicial 30 °C	0,5:50	Acetato de etila: etanol (2:1)	90,7 ± 2,0

Fonte: Autora (2023).

O resumo dos dados apresentados, em geral, foi satisfatório. Inicialmente a extração do lipídio microbiano se deu início com $Y_{P/X}$ de $32,9 \pm 5,1\%$ com o uso de biomassa úmida e extração em banho ultrassônico de etanol como solvente, com tempo de cultivo de 144h. Após a avaliação da curva de crescimento verificou-se que em 48h de cultivo, era obtido um rendimento de extração $Y_{P/X}$ de $27,8 \pm 3,2\%$, desse modo, o *A. oryzae* foi classificado como um microrganismo filamentosos, ou seja, com a capacidade de acumular mais de 20% de lipídio no peso da biomassa seca.

As modificações da extração iniciaram-se com o uso da extração por solvente como pré-tratamento para posterior extração em banho ultrassônico, cujo $Y_{P/X}$ foi de 29,2% em 24h de imersão em etanol que correspondeu a eficiência de extração lipídica de $65,1 \pm 9,6\%$. Em seguida, foi avaliada a influência da temperatura e do tempo de extração houve uma queda no rendimento, justificada pelo acoplamento de bomba peristáltica para manter a temperatura constante durante a extração em ultrassom. Outro aspecto observado foi a dificuldade de trabalhar com a biomassa úmida, pelos percentuais de umidade que podem interferir na concentração do solvente utilizado, já que se fez do etanol, solvente polar facilmente miscível em água. A partir desses questionamentos foi avaliado o processo de extração comparando os resultados obtidos para biomassa seca e úmida. E a biomassa seca apresentou-se bastante vantajosa com $Y_{P/X}$ de 26,4% e eficiência de extração lipídica de $84,8 \pm 0,8\%$ após pré-tratamento com etanol e a extração em banho ultrassônico. Em seguida, foi verificada a necessidade do pré-tratamento para a biomassa seca, e toda via, a biomassa seca sem o pré-tratamento obteve resultados de rendimento significativamente iguais, correspondendo a 26,6% lipídio/biomassa e apresentou eficiência de extração do lipídio microbiano de aproximadamente $84,0 \pm 2,3\%$. A partir desses resultados, o trabalho deu continuidade com a biomassa seca por apresentar a vantagem de poder ser armazenada por longos prazos e a não interferência da umidade no processo de extração do lipídio.

Também foi realizado um screening de solventes orgânicos, ou seja, uma varredura, para determinar os solventes orgânicos com maior afinidade pelos

lipídios acumulados pelo *A. oryzae*. Dessa forma, foram testados os solventes apolares: acetato de etila, hexano e heptano. E os solventes polares: metanol, etanol, isopropanol. Estes em sua maioria apresentaram resultados muito semelhantes, destacando-se o etanol com $Y_{P/X}$ de 31,4% e eficiência de extração do lipídio microbiano de 100%. No entanto, como o intuito do trabalho foi promover uma extração com uso de solventes verdes, este foi apenas utilizado para comparação com os demais solventes polares, assim como o hexano. Além disso, o screening de solvente possibilitou verificar que o acetato de etila se mostrou uma alternativa promissora para a substituição do hexano na extração do lipídio proveniente do *A. oryzae*, com $Y_{P/X}$ de 30,8%, ou seja, apresentou a extração de 96% do lipídio presente na biomassa.

Dessa forma, com o intuito de melhorar o rendimento da extração foi avaliado a mistura do solvente apolar, acetato de etila, com os solventes polares, metanol, etanol e isopropanol nas relações (2:1), (1:1) e (1:2). E a mistura que foi acetato de etila: etanol em todas as proporções promoveu a extração total do lipídio presente na biomassa. Além disso, o perfil de ácidos graxos extraídos corrobora com o intuito do trabalho, ou seja, a extração dos ácidos graxos de interesse nutracêuticos como o ácido oleico (C18:1) e ácido linolênico (C18:2) presentes em considerações consideráveis.

Assim, com base nos resultados obtidos foi realizado o melhoramento do processo de extração com o intuito de promover a extração com menor gasto energético e baixo consumo de solventes. Então foi avaliado a relação g de biomassa por g de solvente, que não apresentou mudança. Em seguida, foi realizado um novo teste da temperatura e verificou-se que a temperatura inicial de 30 °C sofre um aumento de aproximadamente 11°C durante o uso do banho ultrassônico devido a energia sonora liberada pelo equipamento. E este resultado mostrou-se mais vantajoso que a temperatura de 50 °C, diminuindo o gasto energético desse processo. E por fim, o último aspecto da avaliado foi o tempo de extração, que foi diminuído pela metade o tempo gasto nesse processo.

5 CONCLUSÕES

Com base nos dados relatados neste trabalho, pôde-se concluir que:

- O *Aspergillus oryzae* é um fungo filamentosos com potência para o acúmulo de lipídio microbiano.
- O trabalho possibilitou o melhoramento do processo de extração de lipídio microbiano em banho ultrassônico, cujas melhores condições foram: uso da biomassa seca, temperatura de extração inicial de 30 °C, tempo de extração de 40 min., relação sólido: líquido 0,5g: 50 mL, que possibilitou a extração de 90,4% do lipídio presente na biomassa.
- O perfil de ácidos graxos do lipídio obtido possui potencial nutracêuticos correspondendo a 14% PUFAs, 40% MUFAs e 45% SFAs. E são boa alternativa para o futuro no âmbito da suplementação alimentar de ácidos graxos essenciais, como o ácido linoleico.

De maneira geral, foi possível atingir os objetivos empregando-se uma tecnologia verde e fungo pouco explorado na literatura. Contudo, para os próximos estudos necessitando de outros estudos para o cultivo do *A. oryzae* em biorreator e estudos de novos processos de extração lipídica, como ultrassom e extração por micro-ondas.

REFERÊNCIAS

- ABILHÔA, Hélen Caroline Zonta *et al.* Composição em ácidos graxos e índices de qualidade lipídica de biomassa microbiana de leveduras do gênero *Saccharomyces*. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 27630-27643, 2020.
- AGHBASHLO, Mortaza *et al.* Tecnologia de aprendizado de máquina na pesquisa de biodiesel: uma revisão. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 85, p. 100904, 2021.
- AGUIAR NETO, Wanderlino de Sousa. **Um breve levantamento bibliográfico sobre os ácidos graxos ômega-3 e suas características**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2018.
- ANANTHI, V. *et al.* Impact of abiotic factors on biodiesel production by microalgae. **Fuel, Elsevier**, v. 284, April 2020, p. 118962, 2021.
- ATHENAKI, Maria *et al.* Lipids from yeasts and fungi: physiology, production and analytical considerations. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, n. 2, p. 336-367, 2018.
- BARDHAN, Pritam *et al.* Microbial lipids from cellulolytic oleaginous fungus *Penicillium citrinum* PKB20 as a potential feedstock for biodiesel production. **Annals of Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 1135-1146, 2019.
- BELLOU, Stamatia *et al.* Microbial oils as food additives: recent approaches for improving microbial oil production and its polyunsaturated fatty acid content. **Current opinion in Biotechnology**, v. 37, p. 24-35, 2016.
- BENTO, Heitor BS *et al.* One-pot fungal biomass-to-biodiesel process: Influence of the molar ratio and the concentration of acid heterogenous catalyst on reaction yield and costs. **Fuel**, v. 300, p. 120968, 2021.
- BRANDALIZE, Marcus Vinicius *et al.* Extração de óleo de *Chlorella pyrenoidosa* assistida em ultrassom. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, p. 14754-14760, 2014.
- BRASIL. Ministério do Trabalho. Limite de tolerância. Portaria 3214 de 1978 - NR 15 - anexo 11.
- BUNDHOO, Zumar MA; MOHEE, Romeela. Ultrasound-assisted biological conversion of biomass and waste materials to biofuels: A review. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 40, p. 298-313, 2018.

CAROTA, Eleonora *et al.* Bioconversion of agro-industrial waste into microbial oils by filamentous fungi. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 117, p. 143-151, 2018.

CARVALHO, Ana Karine F. *et al.* Approaches to convert *Mucor circinelloides* lipid into biodiesel by enzymatic synthesis assisted by microwave irradiations. **Renewable energy**, v. 125, p. 747-754, 2018.

CHEMAT, Farid *et al.* Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. **TRAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 248-263, 2019.

CHEN, Wei *et al.* Automated accelerated solvent extraction method for total lipid analysis of microalgae. **Algal Research**, v. 51, p. 102080, 2020.

CHEN, Xiaolin *et al.* Ionic liquid-assisted subcritical water promotes the extraction of lipids from wet microalgae *Scenedesmus* sp. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 117, n. 8, p. 1192-1198, 2015.

CHI, Zhanyou *et al.* Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* culture with dark fermentation hydrogen production effluent as feedstock for microbial lipid production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 16, p. 9542-9550, 2011.

DALMAS NETO, C. J. *et al.* New method for the extraction of single-cell oils from wet oleaginous microbial biomass: efficiency, oil characterisation and energy assessment. **Waste and biomass valorization**, v. 11, p. 3443-3452, 2020.

DE ABREU, Jéssica Aline Soares; ROVIDA, Amanda Flávia da Silva; PAMPHILE, João Alencar. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Revista UNINGÁ Review**, v. 21, n. 1, 2015.

DE JESUS, Sérgio S. *et al.* Comparison of several methods for effective lipid extraction from wet microalgae using green solvents. **Renewable Energy**, v. 143, p. 130-141, 2019.

DONG, Tao *et al.* Lipid recovery from wet oleaginous microbial biomass for biofuel production: a critical review. **Applied Energy**, v. 177, p. 879-895, 2016.

DOUROU, Marianna *et al.* Critical steps in carbon metabolism affecting lipid accumulation and their regulation in oleaginous microorganisms. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 6, p. 2509-2523, 2018.

FORFANG, Kristin *et al.* FTIR spectroscopy for evaluation and monitoring of lipid extraction efficiency for oleaginous fungi. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0170611, 2017.

- GOMI, K. *Aspergillus: Aspergillus oryzae*. In ROBINSON, Richard K: **Encyclopedia of Food Microbiology**. 2. ed. Tohoku Universi, Sendai, Japan: Elsevier, 2014. Volume 1. p.92.
- GONZÁLEZ-BALDERAS, R.M. *et al.* Intensified recovery of lipids, proteins, and carbohydrates from wastewater-grown microalgae *Desmodesmus sp.* by using ultrasound or ozone. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 62, p. 104852, 2020.
- GORTE, Olga *et al.* Evaluation of downstream processing, extraction, and quantification strategies for single cell oil produced by the oleaginous yeasts *Saitozymapodzoica* DSM 27192 and *Apiotrichumporosum* DSM 27194. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 8, p. 355, 2020.
- GRANATO, Daniel *et al.* Functional foods: Product development, technological trends, efficacy testing, and safety. **Annual review of food science and technology**, v. 11, p. 93-118, 2020.
- HASHEM, Amr H.; KHATTAB, Abdelrahman M.; ABDELRAOF, Mohamed. A facile one-pot bioconversion of frying oil waste to single cell oils and related products using fungi via response surface methodology. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-11, 2022.
- HU, Bin *et al.* A comparison of extraction yield, quality and thermal properties from *Sapindusmukorossi* seed oil between microwave assisted extraction and Soxhlet extraction. **Industrial Crops and Products**, v. 161, p. 113185, 2021.
- HUSSAIN, Ghulam *et al.* Fattening the brain: a brief of recent research. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 7, p. 144, 2013.
- IDO, Alexander L. *et al.* Application of central composite design in the optimization of lipid yield from *Scenedesmus obliquus* microalgae by ultrasound-assisted solvent extraction. **Energy**, v. 157, p. 949-956, 2018.
- IMATOUKENE, Nabila *et al.* Combination of cell disruption technologies for lipid recovery from dry and wet biomass of *Yarrowia lipolytica* and using green solvents. **Process Biochemistry**, v. 90, p. 139-147, 2020.
- ISO – ISO 12966 de 2014. Animal and vegetable fats and oils. Gas chromatography of fatty acid methyl esters. 2014.
- JI, Xiao-Jun; LEDESMA-AMARO, Rodrigo. Microbial lipid biotechnology to produce polyunsaturated fatty acids. **Trends in Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 832-834, 2020.
- JOVANOVIC, Sofija *et al.* Microbial production of polyunsaturated fatty acids — high-value ingredients for aquafeed, superfoods, and pharmaceuticals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 69, p. 199–211, jun. 2021.

- KARAMEROU, Eleni E.; WEBB, Colin. Cultivation modes for microbial oil production using oleaginous yeasts—a review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 151, p. 107322, 2019.
- KOUBAA, Mohamed *et al.* Current insights in yeast cell disruption technologies for oil recovery: a review. **Chemical Engineering and Processing-Process Intensification**, v. 150, p. 107868, 2020.
- KUMAR, Dipesh; SINGH, Bhaskar; KORSTAD, John. Utilization of lignocellulosic biomass by oleaginous yeast and bacteria for production of biodiesel and renewable diesel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 654-671, 2017.
- LAPORNIK, Brigita; PROŠEK, Mirko; WONDRA, Alenka Golc. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of food engineering**, v. 71, n. 2, p. 214-222, 2005.
- LIANG, Xiaona *et al.* Effects of enzymatic treatments on the hydrolysis and antigenicity reduction of natural cow milk. **Food science & nutrition**, v. 9, n. 2, p. 985-993, 2021.
- LU, Weidong; WANG, Zhongming; YUAN, Zhenhong. Characteristics of lipid extraction from *Chlorella sp.* cultivated in outdoor raceway ponds with mixture of ethyl acetate and ethanol for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 433-437, 2015.
- MADIGAN, Michael T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.
- MARTÍNEZ, Juan M. *et al.* Organic-solvent-free extraction of carotenoids from yeast *Rhodotorulaglutinis* by application of ultrasound under pressure. **Ultrasonicsonochemistry**, v. 61, p. 104833, 2020.
- MARZZOCO, Anita; TORRES, Bayardo B. **Bioquímica básica**. 3. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2007.
- MENEGAZZO, Mariana Lara; FONSECA, Gustavo Graciano. Biomass recovery and lipid extraction processes for microalgae biofuels production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 107, p. 87-107, 2019.
- MHLONGO, Sizwe *et al.* The potential of single-cell oils derived from filamentous fungi as alternative feedstock sources for biodiesel production. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 57, 2021.
- MIAO, Zhengang *et al.* Bioconversion of corncob hydrolysate into microbial lipid by an oleaginous yeast *Rhodotorulataiwanensis* AM2352 for biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 161, p. 91-97, 2020.

MIRONOV, Aleksei A. *et al.* The effect of pH and temperature on arachidonic acid production by glycerol-grown *Mortierella alpina* NRRL-A-10995. **Fermentation**, v. 4, n. 1, p. 17, 2018.

MOTTA, Valter T. **Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações**. 4. ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau, 2003.

MUNIRAJ, Iniya Kumar *et al.* Microbial lipid production from potato processing wastewater using oleaginous filamentous fungi *Aspergillus oryzae*. **Water research**, v. 47, n. 10, p. 3477-3483, 2013.

MUSSAGY, Cassamo U. *et al.* Integrative platform for the selective recovery of intracellular carotenoids and lipids from *Rhodotorula glutinis* CCT-2186 yeast using mixtures of bio-based solvents. **Green Chemistry**, v. 22, n. 23, p. 8478-8494, 2020.

MUSSAGY, Cassamo U. *et al.* Selective recovery and purification of carotenoids and fatty acids from *Rhodotorula glutinis* using mixtures of biosolvents. **Separation and Purification Technology**, v. 266, p. 118548, 2021.

NAVEENA, Balakrishnan; ARMSHAW, Patricia; PEMBROKE, J. Tony. Ultrasonic intensification as a tool for enhanced microbial biofuel yields. **Biotechnology for biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2015.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7.ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.

NIEMI, Calle; GENTILI, Francesco G. Extraction technologies for functional lipids. **Recent advances in micro and macroalgal processing: food and health perspectives**, p. 123-140, 2021.

OCHSENREITHER, Katrin *et al.* Production strategies and applications of microbial single cell oils. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1539, 2016.

PAPANIKOLAOU, Seraphim; AGGELIS, George. Sources of microbial oils with emphasis to *Mortierella (Umbelopsis) isabellina* fungus. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 4, p. 1-19, 2019.

PATEL, Alok *et al.* An overview of potential oleaginous microorganisms and their role in biodiesel and omega-3 fatty acid-based industries. **Microorganisms**, v. 8, n. 3, p. 434, 2020.

PAULA, Ariela Veloso de. **Reestruturação da gordura de leite por interesterificação enzimática empregando lipase imobilizada: otimização das condições reacionais e operacionais**. 2012. 202 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Lorena, SP, 2011.

- PEREIRA, Renata Nunes. **Produção de lipídios por *Rhodotorula mucilaginosa* em diferentes condições de processo a partir de glicerol bruto**. 2018. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2018.
- PERINI, João Ângelo De Lima *et al.* Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 1075-1086, 2010.
- PERRIER, A. *et al.* Effect of ultrasound and green solvents addition on the oil extraction efficiency from rapeseed flakes. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 39, p. 58-65, 2017.
- SAKURADANI, Eiji *et al.* Improved production of various polyunsaturated fatty acids through filamentous fungus *Mortierella alpina* breeding. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 1-10, 2009.
- SALLET, Daniela *et al.* Ultrasound-assisted extraction of lipids from *Mortierella isabellina*. **Journal of Food Engineering**, v. 242, p. 1-7, 2019.
- SATO, P. M. *et al.* Influência das condições de cultivo na produção de lipase ligada ao micélio por células íntegras de *Aspergillus oryzae*. In: XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. **Anais [...]** São Paulo: Blucher, 2019. p. 2702-2708.
- SCHMIDELL, W. *et al.* **Biotechnologia Industrial**. São Paulo: E. Blücher, v. 2, p.93, 2001.
- SELVAKUMAR, P.; SIVASHANMUGAM, P. Ultrasound assisted oleaginous yeast lipid extraction and garbage lipase catalyzed transesterification for enhanced biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, v. 179, p. 141-151, 2019.
- SHENG, Jie; VANNELA, Raveender; RITTMANN, Bruce E. Evaluation of methods to extract and quantify lipids from *Synechocystis* PCC 6803. **Bioresource technology**, v. 102, n. 2, p. 1697-1703, 2011.
- SHI, Rui; HANDLER, Robert M.; SHONNARD, David R. Life cycle assessment of novel technologies for algae harvesting and oil extraction in the renewable diesel pathway. **Algal Research**, v. 37, p. 248-259, 2019.
- SHOAIB, Abeer *et al.* Optimization of cultural conditions for lipid accumulation by *Aspergillus wentii* Ras101 and its transesterification to biodiesel: application of response surface methodology. **3 Biotech**, v. 8, n. 10, p. 1-11, 2018.
- SPALVINS, Kriss; VAMZA, Ilze; BLUMBERGA, Dagnija. Single Cell Oil Production from Waste Biomass: Review of Applicable Industrial By-Products. **Environmental & Climate Technologies**, v. 23, n. 2, 2019.

STEVANATO, Natália; DA SILVA, Camila. Radish seed oil: Ultrasound-assisted extraction using ethanol as solvent and assessment of its potential for ester production. **Industrial Crops and Products**, v. 132, p. 283-291, 2019.

SUBRAMANIAM, Ramalingam *et al.* Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 12, p. 1271-1287, 2010.

TAN, Jia Sen *et al.* A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids. **Bioengineered**, v. 11, n. 1, p. 116-129, 2020.

TIWARI, Brijesh K. Ultrasound: A clean, green extraction technology. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 100-109, 2015.

TROIANO, D.; ORSAT, V.; DUMONT, M. J. Status of filamentous fungi in integrated biorefineries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 117, p. 109472, 2020.

TUTUNCHI, Helda *et al.* Association between Dietary Patterns and Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Results from a Case-Control Study. **Archives of Iranian Medicine (AIM)**, v. 24, n. 1, 2021.

VALENZUELA, Alfonso *et al.* Alimentos funcionales, nutraceúticos y foshu: ¿vamos hacia un nuevo concepto de alimentación?. **Revista Chilena de nutrición**, v. 41, n. 2, p. 198-204, 2014.

VENDITTI, Silvia; HERR, Patrick; HANSEN, Joachim. Assessment of the production of biodiesel from urban wastewater-derived lipids. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 162, p. 105044, 2020.

WAKAI, Satoshi *et al.* Modified expression of multi-cellulases in a filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. **Bioresource technology**, v. 276, p. 146-153, 2019.

YEN, Nguyen Thi Hoang *et al.* Chemical composition of dried Bertoni leaves and effect of ultrasound-assisted extraction on total steviosides content in extract. **Herba Polonica**, v. 67, n. 1, p. 1-7, 2021

ZHAO, Chen *et al.* Microbial oil production by *Mortierella isabellina* from sodium hydroxide pretreated rice straw degraded by three-stage enzymatic hydrolysis in the context of on-site cellulase production. **Renewable Energy**, v. 130, p. 281-289, 2019.

ZHONG, Jinfeng *et al.* A aplicação de ultra-som e micro-ondas para aumentar a extração de óleo de sementes de *Moringa oleifera*. **Culturas e Produtos Industriais**, v. 120, p. 1-10, 2018.

ZHOU, Cuixia *et al.* Combining Ultrasound and Microwave to Improve the Yield and Quality of Single-Cell Oil from *Mortierella isabellina* NTG1– 121. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 95, n. 12, p. 1535-1547, 2018.

ZHU, M.; ZHOU, P. P.; YU, L. J. Extraction of lipids from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids. **Bioresourcetechnology**, v. 84, n. 1, p. 93-95, 2002.