

Thainá Barbosa de Lima Cordeiro

**Obtenção de Lipídios por Rompimento de
Membrana Celular Usando Plasma Não-Térmico:
uma Abordagem Alternativa para Produção
Sustentável de Lipídios**

**Lipid extraction by cell membrane disruption using
non-thermal plasma: an alternative approach for
sustainable lipid production**

São José dos Campos - SP

2024

Thainá Barbosa de Lima Cordeiro

Obtenção de Lipídios por Rompimento de Membrana Celular Usando Plasma Não-Térmico: uma Abordagem Alternativa para Produção Sustentável de Lipídios

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP

Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - IP&D

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

Orientador: Dr.^a Virginia Klausner de Oliveira

Coorientador: Dr.^a Lúcia Vieira

São José dos Campos - SP

2024

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Cordeiro , Thainá Barbosa de Lima
Obtenção de Lipídios por Rompimento de Membrana Celular Usando Plasma Não-Térmico: uma Abordagem Alternativa para Produção Sustentável de Lipídios / Thainá Barbosa de Lima Cordeiro ; orientadora, Virginia Klausner de Oliveira; co-orientadora Lúcia Vieira. - São José dos Campos, SP, 2024.
1 CD-ROM, 64 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Inclui referências

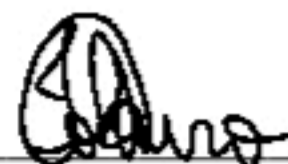
1. Engenharia Biomédica. 2. Rhodosporidium toruloides. 3. Plasma. 4. Lipídios. I. Oliveira, Virginia Klausner de , orient. II. Vieira, Lúcia , co-orient. III. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. IV. Título.

Eu, Thainá Barbosa de Lima Cordeiro , autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 13 de Dezembro de 2024.



Autor(a) da Obra

THAINÁ BARBOSA DE LIMA CORDEIRO

“OBTENÇÃO DE LIPÍDIOS POR ROMPIMENTO DE MEMBRANA CELULAR USANDO PLASMA NÃO-TÉRMICO: UMA ABORDAGEM ALTERNATIVA PARA PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DE LIPÍDIOS.”

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba - Univap, pela seguinte banca examinadora:

| | |
|--------------------------|---------------------------------|
| Maiara L. Castilho | <i>Maiara L. Castilho</i> |
| Virginia K. de Oliveira | <i>Virginia K. de Oliveira</i> |
| Lucia Vieira | <i>Lucia Vieira</i> |
| Rita de C. M. S. Contini | <i>Rita de C. M. S. Contini</i> |

Prof.^a Dr.^a Juliana Ferreira Strixino

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 02 de agosto de 2024.

*Este trabalho é dedicado às crianças adultas que,
quando pequenas, sonharam em se tornar cientistas.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, fonte de força e inspiração ao longo de toda a minha jornada.

Aos meus pais, pelo amor, apoio incondicional e incentivo em todas as etapas da minha vida. Em especial minha mãe que sempre se dedicou, sem você nada disso seria possível, muito obrigada por tudo. À memória do meu irmão Emerson, cuja presença continua a iluminar meu caminho.

Aos meus professores, por transmitirem conhecimentos fundamentais e por seu compromisso com a minha formação acadêmica.

Gostaria de expressar um agradecimento especial à Professora Virginia, minha orientadora, por seu suporte constante, orientação e dedicação ao longo deste trabalho. Sua sabedoria e apoio incondicional foram essenciais para a realização deste estudo.

À Professora Lucia, minha coorientadora, sou grata pelo conhecimento acadêmico transmitido e pela orientação valiosa que tanto contribuíram para o desenvolvimento desta dissertação.

Ao Professor José Pradella, por me acolher em seu laboratório durante a fermentação do microrganismo, e por compartilhar seu vasto conhecimento, proporcionando-me um ambiente de aprendizado único e enriquecedor.

Aos meus amigos, por estarem sempre presentes, oferecendo suporte emocional e motivacional nos momentos mais difíceis.

Agradeço também ao CNPq pelo apoio financeiro e à FVE pela bolsa de mestrado, que possibilitaram a realização deste trabalho.

Aos colegas e colaboradores da Central Multiusuário e do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, meu sincero agradecimento pelo auxílio e convivência, que enriqueceram minha experiência de trabalho.

Por fim, gostaria de expressar minha gratidão a todos os colaboradores da UNIVAP, cujo empenho e dedicação são fundamentais para o funcionamento de instituição e progresso de nossas atividades.

*"Nada na vida é para ser temido, apenas compreendido. Agora é a hora de entender mais,
para que possamos temer menos."
(Marie Curie, 1867-1934)*

RESUMO

Leveduras oleaginosas têm se destacado como produtoras de lipídios de interesse industrial como fonte alternativa de produção de lipídios devido à necessidade de reduzir a dependência de recursos fósseis e promover o desenvolvimento de bioprodutos renováveis. *Rhodospiridium toruloides* (Rt) é uma levedura oleaginosa promissora porque pode acumular grandes quantidades de lipídios neutros intracelulares. Esses lipídios têm valor comercial em diversos setores, incluindo biocombustíveis, produção de alimentos, produtos químicos e farmacêuticos. Nesta dissertação, foram estudados o rendimento da Rt e o rompimento da parede celular para posterior extração lipídica. A ruptura da parede celular foi realizada de duas formas: via plasma não térmico e extração direta do óleo por meios químicos. A morfologia celular foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) antes e depois da ruptura da parede celular por aplicação de plasma não-térmico. As análises do óleo foram realizadas após ruptura da parede celular por meio de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), e cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-FID). O resultado de CG-FID de ambas as vias de rompimento da membrana celular apresentam maior porcentagem de ácido palmítico e ácido oleico e seus derivados, a diferença pode ser notada na quantidade desses ácidos graxos presentes em cada amostra, com tratamento a plasma é possível observar valor elevado da concentração de ácido palmítico em detrimento do tratamento com ácido. O tratamento com plasma não-térmico mostrou-se eficiente na quebra com período de exposição de 5 minutos, e o óleo extraído fica sólido à temperatura ambiente, em torno de 24 °C. Com a técnica de MEV foi possível observar a morfologia e os danos causados à parede celular do o Rt, com espectros de FTIR confirmando a presença de ácido palmítico e ácido oleico na composição dos lipídios extraídos. Por fim, as duas amostras de óleo extraídas, com rompimento via plasma e via ácido, por solventes químicos foram testadas como lubrificante entre um par tribológico de esfera e placa de aço 316L em atmosfera ambiente em uma trilha de 1 mm com força normal de 5N e frequência de 1Hz. Neste contexto, os resultados indicaram uma redução mais significativa no coeficiente de atrito para o óleo obtido via plasma não-térmico. A composição química deste óleo foi analisada para melhor elucidar os resultados obtidos.

Palavras-chave: *Rhodospiridium toruloides*; Plasma não-térmico; Rompimento de parede celular; Lipídios.

LIPID EXTRACTION BY CELL MEMBRANE DISRUPTION USING NON-THERMAL PLASMA: AN ALTERNATIVE APPROACH FOR SUSTAINABLE LIPID PRODUCTION

ABSTRACT

Oleaginous yeasts have gained prominence as lipid producers of industrial interest, serving as an alternative lipid production source due to the need to reduce dependency on fossil resources and to promote the development of renewable bioproducts. *Rhodospiridium toruloides** (Rt) is a promising oleaginous yeast because it can accumulate large quantities of intracellular neutral lipids. These lipids have commercial value in various sectors, including biofuels, food production, chemicals, and pharmaceuticals. In this dissertation, the yield of Rt and the disruption of the cell wall for subsequent lipid extraction were studied. Cell wall disruption was carried out in two ways: via non-thermal plasma and direct oil extraction by chemical means. The cell morphology was analyzed by scanning electron microscopy (SEM) before and after cell wall disruption through the application of non-thermal plasma. Oil analyses were performed after cell wall disruption using Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID). The GC-FID results from both methods of cell membrane disruption showed a higher percentage of palmitic acid and oleic acid and their derivatives. The difference could be noted in the amount of these fatty acids present in each sample, with plasma treatment showing a higher concentration of palmitic acid compared to acid treatment. The non-thermal plasma treatment proved efficient in breaking the cell wall with an exposure period of 5 minutes, and the extracted oil remains solid at room temperature, around 24 °C. The SEM technique allowed for the observation of the morphology and the damage caused to the Rt cell wall, with FTIR spectra confirming the presence of palmitic acid and oleic acid in the composition of the extracted lipids. Finally, the two extracted oil samples, with cell wall disruption via plasma and via acid, using chemical solvents, were tested as a lubricant between a tribological pair of a ball and a 316L steel plate in an ambient atmosphere on a 1 mm track with a normal force of 5N and a frequency of 1Hz. In this context, the results indicated a more significant reduction in the coefficient of friction for the oil obtained via non-thermal plasma. The chemical composition of this oil was analyzed to better elucidate the obtained results.

Keywords: *Rhodospiridium toruloides*; Non-thermal Plasma; Cell Wall Disruption; Lipids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Levedura <i>Rhodosporidium toruloides</i> com acúmulo de lipídios intracelulares, contendo o aumento gradual ao passar do tempo, sendo (a) como inicial e (f) como final. | 7 |
| Figura 2 – Metalose em articulação. | 10 |
| Figura 3 – Fluxograma delineando a divisão desta seção. | 12 |
| Figura 4 – Esquema de fermentação de <i>Rhodosporidium toruloides</i> (Rt), detalhando as etapas de processamento e monitoramento do consumo e crescimento do microrganismo. (a) Cultura de Rt em placa de Petri e coletada com alça de platina. (b) Transferência do microrganismo para erlenmeyer. (c) Incubação do pré-inóculo. (d) Transferência para erlenmeyer com meio definido. (e) Incubação do inóculo. (f) Transferência do meio definido para erlenmeyer. (g) Incubação do meio definido até a fermentação atingir o ponto ótimo, monitorada por DNS e densidade óptica. (h) Transferência do meio fermentado para tubos Falcon e centrifugação. (i) Tubo Falcon após centrifugação, mostrando as fases separadas do sobrenadante e do precipitado. | 14 |
| Figura 5 – Esquema da metodologia de análise de densidade óptica (DO) para <i>Rhodosporidium toruloides</i> . (a) Coleta de uma alíquota contendo a fermentação do microrganismo. (b) Transferência da amostra para um tubo Falcon. (c) Diluição da amostra. (d) Transferência da amostra diluída para uma cubeta, com uma cubeta preenchida com água destilada como padrão. (e) Medição da absorvância no espectrofotômetro a 600 nm. | 15 |
| Figura 6 – Esquema da metodologia da análise com reagente DNS para a determinação de açúcares redutores. (a) Coleta de uma alíquota contendo a fermentação do microrganismo. (b) Transferência da amostra para um tubo Falcon e centrifugação. (c) Separação do sobrenadante. (d) Coleta do sobrenadante e diluição em água destilada. (e) Preenchimento de dois tubos de vidro: um com água destilada e reagente DNS, e o outro com amostra diluída e reagente DNS. (f) Aquecimento dos tubos de vidro em banho-maria. (g) Resfriamento dos tubos de vidro em banho de gelo. (h) Transferência das soluções dos tubos de vidro para cubetas. (i) Medição da absorvância das soluções no espectrofotômetro a 540 nm. | 17 |
| Figura 7 – Sistema de Plasma em arco deslizante. (a) Diagrama esquemático mostrando a configuração do sistema. (b) Fotografia mostra o equipamento em operação. | 19 |

| | |
|--|----|
| Figura 8 – Fermentação A e B. O eixo “x” representa o tempo em horas, enquanto o eixo “y” esquerdo representa a concentração de açúcar redutor em g/L, e o eixo “y” direito representa o crescimento celular em g/L. As linhas amarelas e azuis representam a concentração de açúcar redutor para as fermentações A e B, respectivamente, enquanto as linhas cinza e laranja representam o crescimento celular para as fermentações A e B, respectivamente. | 24 |
| Figura 9 – Fotografia do microscópio das células de Rt. (a) Microscopia de aumento de 40 vezes logo após o cultivo. (b) Microscopia de aumento de 100 vezes mostrando detalhes do interior celular e o acúmulo de lipídios intracelular. | 27 |
| Figura 10 – MEV do <i>Rhodospiridium toruloides</i> . (a) Células de levedura logo após fermentação. (b) Célula de Rt com 24h da fermentação. (c) Rt com tratamento a plasma não-térmico por 5 min. (d) Rt com tratamento a plasma não-térmico por 10 min. (e) Rt com tratamento a plasma não-térmico por 20 min. (f) Rt com tratamento a plasma não-térmico por 30 min. | 27 |
| Figura 11 – Dados de CG-FID do óleo da levedura extraído via ácido sulfúrico. No eixo “x” está representada a quantidade de ácidos graxos em porcentagem, enquanto o eixo “y” lista os diferentes tipos de ácidos graxos analisados. A amostra “Plasma” é representada por barras laranja e representa a amostra do bio óleo com tratamento de plasma, enquanto a amostra “H ₂ SO ₄ ” é representada por barras azuis e representa a amostra do bio óleo com tratamento de ácido sulfúrico. | 28 |
| Figura 12 – Espectros do FTIR-ATR. A linha preta representa a amostra sem tratamento, logo após ser retirada do cultivo. A linha vermelha indica a amostra sem tratamento, que foi deixada em repouso por 24 horas após o cultivo, mantida sob refrigeração a uma temperatura de 10°C. A linha verde clara representa a amostra com o tratamento do plasma não-térmico com exposição de 5 minutos. A linha azul escuro representa a amostra com o tratamento do plasma não-térmico com exposição de 10 minutos. A linha azul clara representa a amostra com o tratamento do plasma não-térmico com exposição de 20 minutos. Por fim, a linha verde-escura representa a amostra com o tratamento do plasma não-térmico com exposição de 30 minutos. | 30 |

Figura 13 – Diferença entre os coeficientes de atrito. O coeficiente de atrito mais baixo é o da amostra “Plasma”, com valores entre 0,061 e 0,058. A amostra "Ácido" possui valor semelhante à amostra “Plasma” com pequena variação entre 0,068 e 0,057. O coeficiente com valor mais elevado, e consequentemente com maior atrito é da amostra “Metal-Metal” com valores entre 0,468 a 0,424. 32

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Fórmula molecular, nomenclatura e ponto de fusão de ácidos graxos estudados. | 6 |
| Tabela 2 – Meio definido utilizado nas culturas do Rt. | 13 |
| Tabela 3 – Desidratação protocolo MEV. | 21 |
| Tabela 4 – DO do cultivo do Rt. | 25 |
| Tabela 5 – DNS do cultivo do Rt. | 26 |
| Tabela 6 – Bandas e atribuições de estiramentos e flexões. | 30 |
| Tabela 7 – Coeficiente de atrito das amostras analisadas. | 31 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------|---|
| Rt | <i>Rhodospordium toruloides</i> |
| MEV | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| FTIR-ATR | Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com reflexão total atenuada |
| CG-FID | Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama |
| MEV | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| DO*FC | Crescimento celular ajustado |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|------|--|
| X | Concentração celular no meio de fermentação em g/L |
| DO | Densidade óptica medida |
| f | Fator de diluição |
| AR | Concentração do açúcar redutor no meio de fermentação em g/L |
| Ab | Absorbância medida |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 | Proposta da Dissertação | 3 |
| 1.2 | Justificativa da Dissertação | 3 |
| 1.3 | Estrutura da Dissertação | 4 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 5 |
| 2.1 | Lipídios | 5 |
| 2.2 | Levedura | 6 |
| 2.3 | Plasma Não-Térmico | 8 |
| 2.4 | Solventes Orgânicos | 8 |
| 2.5 | Ácidos graxos na Engenharia biomédica | 9 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 12 |
| 3.1 | Fermentação | 12 |
| 3.1.1 | Meios de Cultura do Rt | 13 |
| 3.1.2 | Crescimento Celular | 15 |
| 3.1.3 | Consumo de Açúcar Redutor | 16 |
| 3.1.4 | Massa Seca | 18 |
| 3.2 | Rompimento da Parede Celular do Rt | 18 |
| 3.2.1 | Via Método Convencional | 18 |
| 3.2.2 | Via Plasma Não-Térmico de Arco Deslizante | 19 |
| 3.3 | Extração dos Lipídios | 20 |
| 3.4 | Caracterização do Microrganismo | 20 |
| 3.4.1 | Morfologia do Microrganismo | 20 |
| 3.4.2 | Espectroscopia (FTIR-ATR) | 21 |
| 3.4.3 | Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama (CG-FID) | 22 |
| 3.5 | Aplicação - Análise tribológica | 23 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 24 |
| 4.1 | Fermentação do Rt | 24 |
| 4.1.1 | Densidade Óptica (DO) | 25 |
| 4.1.2 | Método DNS | 25 |
| 4.2 | Caracterização do Lipídeo Extraído | 26 |
| 4.2.1 | Morfologia do Microrganismo | 26 |
| 4.2.2 | Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama (CG-FID) | 28 |
| 4.2.3 | Espectroscopia (FTIR-ATR) | 29 |

| | | |
|-----|--|-----------|
| 4.3 | Análise Tribológica | 31 |
| 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 34 |
| | REFERÊNCIAS | 36 |
| | ANEXOS | 40 |
| | ANEXO A – CROMATOGRAMA E TABELA DA AMOSTRA VIA PLASMA | 41 |
| | ANEXO B – CROMATOGRAMA E TABELA DA AMOSTRA VIA ÁCIDO | 43 |
| | ANEXO C – CROMATOGRAMA E TABELA DO PARÃO FAME 37 | 45 |

1 INTRODUÇÃO

As moléculas de lipídios são compostos orgânicos que desempenham funções essenciais nos seres vivos. Elas são caracterizadas por serem insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, como hexano, clorofórmio e álcool (DAVID; MICHAEL, 2022). As funções dos lipídios desempenham um papel essencial em processos biológicos, como no armazenamento e liberação de energia, isolamento térmico, formação de barreiras celulares, transporte de emissão lipossolúveis, sinalização celular e proteção contra danos oxidativos (MOLINARO et al., 2013). Essas funções dos lipídios são essenciais em processos biológicos, como o armazenamento e a liberação de energia, isolamento térmico, formação de barreiras celulares, transporte de substâncias lipossolúveis, sinalização celular e proteção contra danos oxidativos (MOLINARO et al., 2013). Além disso, estudos relatam seu uso como biolubrificantes, surfactantes, carregadores de ativos e em diversas outras áreas relacionadas à saúde (TAJAU et al., 2021). No Brasil, existem óleos essenciais de plantas amazônicas com propriedades cicatrizantes e anti-inflamatórias, além de óleos de plantas estrangeiras, como o de girassol. Esses óleos são ricos em ácidos graxos, especialmente oléico, linoléico e linolênico, com potencial de aplicação em cicatrização. Alguns óleos vegetais, como óleo de soja, jojoba e azeite, são amplamente usados no desenvolvimento de biomateriais poliméricos devido à presença de insaturações, que facilitam a reação com grupos reativos, permitindo a produção de poliuretanos, elastômeros e adesivos (TAJAU et al., 2021; FARIAS, 2021). A busca por fontes e alternativas de lipídios tem se intensificado devido à necessidade de reduzir a dependência de recursos fósseis e promover o desenvolvimento de bioprodutos renováveis. Nesse contexto, as leveduras oleaginosas têm se destacado como produtoras de lipídios de interesse industrial (LIMA et al., 2024). *Rhodospiridium toruloides* (Rt) é um microrganismo unicelular pertencente ao reino dos fungos e à classe dos basidiomicetos, uma espécie de levedura capaz de acumular altas quantidades de lipídios intracelulares, apresentando um potencial significativo. Esses lipídios podem ser usados, como matéria-prima na produção de produtos de alto valor agregado (WEN et al., 2020). O Rt é capaz de utilizar uma ampla gama de substratos, incluindo açúcares, carboidratos e resíduos agroindustriais, como fontes de carbono, como por exemplo bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de milho, dentre outros. Possui uma elevada tolerância a diferentes condições ambientais, incluindo pH, temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes (CASSA-BARBOSA, 2012). Dentre essas leveduras, destaca-se a capacidade de acúmulo de lipídios intracelulares em altas proporções, sob condições limitadas de nutrientes, tornando-as candidatas promissoras para a produção de biomassa rica em lipídios. Esses lipídios podem ser posteriormente convertidos em biocombustíveis, entre outras aplicações (TEODORO, 2015). A parede celular é uma estrutura resistente que envolve as células de levedura e desempenha um papel importante na proteção e estabili-

dade da célula. No entanto, o distúrbio controlado da parede celular pode ser desejável em várias aplicações biotecnológicas, como a aquisição de compostos intracelulares de interesse ou a liberação de enzimas produzidas por essas leveduras, como por exemplo o Rt (BOUZON; GARGIONI; OURIQUES, 2010). Dentre os métodos convencionais para o rompimento de paredes celular de leveduras, tem-se o tratamento químico e o choque térmico. O tratamento químico envolve o uso de compostos químicos para enfraquecer ou dissolver a parede celular da levedura. Agentes químicos como ácidos, bases fortes, detergentes ou solventes orgânicos podem ser usados para alterar a estrutura da parede celular e permitir seu colapso. O choque térmico consiste em submedidas como células fermentadas a ciclos alternados de aquecimento e resfriamento rápidos. Essa variação de temperatura pode causar ruptura da parede celular, devido à diferença de dilatação e contração entre a parede celular e o citoplasma (PAESE; MARCZAK, 2016). O colapso da parede celular de levedura usando plasma não-térmico é uma abordagem alternativa e inovadora na biotecnologia. O plasma não-térmico é uma fonte de energia composta por espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e outros radicais que são gerados a partir de gases ionizados. Essas espécies reativas têm a capacidade de interagir com as células vivas e podem causar efeitos como a ruptura da parede celular (NISHIME et al., 2017; PANNGOM et al., 2014). O plasma não-térmico é um estado altamente ionizado da matéria, composto por um gás neutro contendo elétrons livres e íons positivos. A descarga elétrica aplicada ao gás cria um ambiente de alta energia, no qual ocorrem reações químicas, iniciação de espécies e formação de radicais altamente reativos. Essas características tornam o plasma não-térmico uma ferramenta poderosa para uma variedade de aplicações, como esterilização de equipamentos médicos, tratamento de superfícies, degradação de poluentes, entre outros (WHEELER, 2020). O uso de plasma não-térmico tem despertado grande interesse nas últimas décadas devido às suas propriedades únicas e ao potencial de aplicação em diversas áreas, como medicina, indústria, meio ambiente e ciência dos materiais. Diferentemente do plasma térmico convencional, no qual a temperatura é elevada, o plasma não-térmico permite a geração de reações químicas e modificações de superfície com temperaturas próximas ao ambiente (PASSOS, 2018). Este trabalho objetiva utilizar plasma não-térmico para rompimento de parede celular de levedura oleaginosa, o *Rhodospiridium toruloides*, extrair e caracterizar o lipídio intracelular para aplicações futuras. A utilização de Rt como uma fonte de lipídios renováveis não apenas reduz a dependência de recursos fósseis, mas também oferece uma alternativa ambientalmente amigável, promovendo a transição para uma economia mais sustentável. Ao explorar as propriedades e aplicações do plasma não-térmico, visamos contribuir para o desenvolvimento de tecnologias mais eficientes, sustentáveis e seguras para a etapa de recuperação dos lipídeos intracelular e assim uma possível aplicação para área da engenharia biomédica (WHEELER, 2020).

1.1 Proposta da Dissertação

O objetivo da presente dissertação de mestrado é objetivo utilizar plasma não-térmico para rompimento de parede celular da levedura oleaginosa, o *Rhodospodium toruloides*, extrair e caracterizar o lipídio intracelular para aplicações futuras na área de engenharia biomédica. Para isso, propõe-se:

- Obter lipídio a partir da levedura *Rhodospodium toruloides*;
- Analisar a superfície celular e da morfologia do *Rhodospodium toruloides* com a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Identificar nas amostras, com extração da parede celular via plasma não-térmico e via ácido, bandas características presentes através da técnica de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR);
- Identificar a porcentagem de cada ácido graxo presente nas amostras, com extração da parede celular via plasma não-térmico e via ácido, através da técnica de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-FID);
- Verificar o coeficiente de atrito de ambas amostras para aplicações futuras.

1.2 Justificativa da Dissertação

O *Rhodospodium toruloides* é uma levedura oleaginosa promissora devido à sua capacidade de acumular grandes quantidades de lipídios neutros intracelulares, como triglicérides e carotenoides. Esses lipídios têm valor comercial em várias indústrias, incluindo biocombustíveis, produção de alimentos, produtos químicos, farmacêuticos e engenharia biomédica. O uso do plasma não-térmico para o rompimento da parede da levedura oferece a vantagem de preservar os componentes intracelulares de interesse. Ao contrário de métodos mais agressivos, essas técnicas minimizam o aquecimento excessivo e a desnaturação de proteínas, enzimas e outros compostos sensíveis. Isso é especialmente relevante para aplicações que protegem a preservação da atividade biológica desses componentes. Ao contrário de outros métodos convencionais de extração, que utilizam produtos químicos para o rompimento da parede celular, o plasma não-térmico não requer a adição de reagentes químicos externos. Isso pode ser adotado em termos de segurança, redução de custos e impacto ambiental, tornando-o uma abordagem mais sustentável, que pode ser facilmente adaptada para operações em larga escala. Essa técnica tem sido amplamente estudada e aplicada em diferentes setores industriais, com potencial de escalabilidade.

1.3 Estrutura da Dissertação

Com o intuito de atingir a proposta descrita na subseção 1.1, a presente dissertação está estruturada em:

- **Capítulo 2:** Este capítulo revisa a literatura relevante para a pesquisa, abordando tópicos como a estrutura e função dos lipídios, características e cultivo de leveduras oleaginosas, princípios do plasma não-térmico e métodos convencionais de extração de lipídios.
- **Capítulo 3:** Este capítulo descreve detalhadamente os materiais e a metodologia utilizada na pesquisa, incluindo os meios de cultura do *Rhodospiridium torulooides*, análises de densidade óptica e açúcares redutores, técnicas de rompimento de parede celular, e métodos de extração e caracterização dos lipídios.
- **Capítulo 4:** Este capítulo apresenta os resultados obtidos ao longo da pesquisa, incluindo dados de fermentação, análises morfológicas e químicas dos lipídios extraídos, bem como os resultados das comparações entre os métodos de rompimento de parede celular.
- **Capítulo 5:** Este capítulo discute as conclusões da pesquisa, destacando a eficácia do plasma não-térmico no rompimento da parede celular e na extração de lipídios, além de sugerir possíveis aplicações e direções futuras para pesquisas adicionais.

Por fim, o Apêndice A são apresentados o cromatograma e tabela da análise de óleo extraído do *Rhodospiridium torulooides* utilizando o método de rompimento via plasma não-térmico. O Apêndice B apresenta os cromatogramas e tabelas das análises de óleo extraído do *Rhodospiridium torulooides* utilizando o método de rompimento via convencional com ácido sulfúrico.

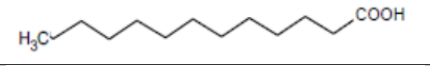
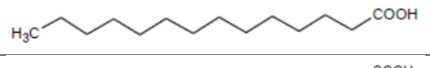

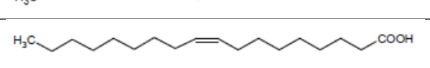
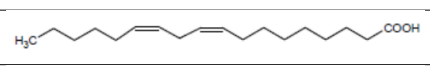
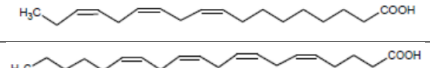


2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lipídios

As moléculas de lipídios são compostas principalmente por carbono, hidrogênio e oxigênio, e sua estrutura básica é formada por um esqueleto de glicerol (um álcool) ligado a copos de gordura. Os ácidos graxos são cadeias hidrocarbonadas longas, geralmente compostas por um número par de átomos de carbono, com um grupo carboxila (-COOH) na extremidade (BERG et al., 2002). Existem vários tipos de lipídios, incluindo triglicerídeos, fosfolipídios, esteroides, ceramidas e carotenoides, entre outros. Cada tipo de lipídio possui uma estrutura e função específica (SOUTO et al., 2011). Os triglicerídeos são a forma mais comum de lipídios e operam principalmente como reserva de energia nos organismos. Eles são compostos por três proteínas dietéticas ligadas a uma molécula de glicerol. Os fosfolipídios são componentes essenciais das membranas celulares, que possuem uma cabeça polar hidrofílica e duas caudas hidrofóbicas de ácidos graxos. Os esteroides são lipídios que possuem uma estrutura característica de quatro anéis de carbono. O colesterol é um exemplo conhecido de esteroide e desempenha papéis importantes na estrutura celular e como precursor de hormônios esteroides. As ceramidas são lipídios encontrados nas membranas celulares e desempenham um papel fundamental na sinalização celular (BERG et al., 2002). Os carotenoides são pigmentos lipídicos encontrados em plantas e alguns organismos, são responsáveis pela coloração alaranjada, possuem propriedades antioxidantes e podem exercer funções de proteção contra a radiação UV (BERG et al., 2002). A forma básica de um lipídio são os ácidos graxos, suas propriedades físicas e químicas podem ser diversificadas e dependem da estrutura molecular, variando de acordo com o tamanho da cadeia carbônica e a presença de insaturações, na Tabela 1 estão representados os principais ácidos graxos (GOMES et al., 2022; RODRIGUES, 2022).

Na Tabela 1, é possível observar a fórmula molecular simplificada de cada ácido graxo, juntamente com seu nome e ponto de fusão. O ácido esteárico destaca-se por possuir a segunda maior cadeia carbônica entre os demais, sendo completamente saturado e apresentando o maior ponto de fusão listado na Tabela 1. Já o ácido araquidônico possui a maior cadeia carbônica e o maior número de insaturações, resultando no menor ponto de fusão em comparação com os outros ácidos graxos listados na tabela. Por outro lado, o ácido palmítico, com 16 carbonos em uma cadeia totalmente saturada, possui um ponto de fusão elevado de 63 °C, o que o torna um óleo com aparência sólida à temperatura ambiente, conforme indicado na Tabela 1. Finalmente, o ácido oleico, com 18 carbonos na cadeia e uma única insaturação central, apresenta um ponto de fusão mais baixo de 13 °C, o que resulta em um óleo com aspecto líquido à temperatura ambiente.

Tabela 1 – Fórmula molecular, nomenclatura e ponto de fusão de ácidos graxos estudados.

| Símbolo | Fórmula molecular | Nome sistemático/comum | Fusão (°C) |
|---------|---|---|------------|
| 12:0 |  | Dodecanóico/Láurico | 44 |
| 14:0 |  | Tetradecanóico/Mirístico | 54 |
| 16:0 |  | Hexadecanóico/Palmitico | 63 |
| 18:0 |  | Octadecanóico/Esteárico | 70 |
| 18:1 |  | 9-octadecenóico/ Oleico | 13 |
| 18:2 |  | cis,cis-9,12-octadecadienóico/Linoleico | -5 |
| 18:3 |  | cis,cis,cis-9,12,15-octadecatrienóico/Linolênico | -11 |
| 20:4 |  | cis,cis,cis,cis-5,8,11,14-icosatetraenóico/Araquidônico | -49 |

Fonte: Modificado de (RODRIGUES, 2022).

2.2 Levedura

A levedura *Rhodospiridium toruloides* tem uma capacidade notável de acumular lipídios intracelulares, como pode ser observado na Figura 1, sendo capaz de converter eficientemente substratos como açúcares, glicerol e resíduos agroindustriais em triglicerídeos, que são os principais compostos lipídicos de armazenamento. Essa capacidade de acumular lipídios em alta quantidade faz dela uma excelente candidata para a produção de biodiesel e outros produtos relacionados (PARK; NICAUD; LEDESMA-AMARO, 2018).

A Figura 1 apresentada mostra células de *Rhodospiridium toruloides* submetidas a condições que induzem o acúmulo gradual de lipídios intracelulares ao longo do tempo. Observa-se que, nas imagens a-f, há um aumento progressivo na intensidade e no volume das regiões fluorescentes dentro das células, indicando o acúmulo de lipídios. Na imagem (a), as células apresentam pequenos pontos fluorescentes, sugerindo o início da formação de gotículas lipídicas. À medida que o tempo avança, conforme mostrado nas imagens subsequentes (b-f), há um aumento tanto no número quanto no tamanho dessas gotículas, o que reflete um acúmulo significativo de lipídios (NICAUD et al., 2017).

A capacidade de utilizar uma ampla variedade de substratos como fonte de carbono e energia possibilita o crescimento e a metabolização de diferentes açúcares, como glicose, sacarose e xilose, bem como outros compostos carbonados, como glicerol e ácidos graxos. Essa versatilidade a torna uma candidata atraente para a produção de bioprodutos a partir de fontes renováveis e resíduos agroindustriais (WEN et al., 2020). A tolerância a uma ampla gama de condições ambientais, pode crescer e sobreviver em uma faixa ampla de pH, temperatura e salinidade. Além dos lipídios, como vantagem a *Rt* também é capaz de produzir outros compostos de interesse como por exemplo, carotenoides, que são pigmentos naturais com aplicações em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos. Essa

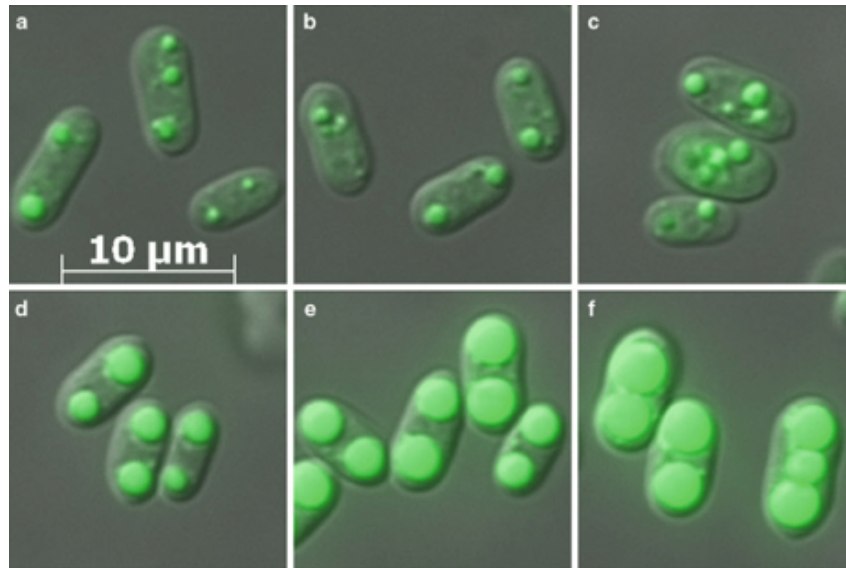


Figura 1 – Levedura *Rhodosporidium toruloides* com acúmulo de lipídios intracelulares, contendo o aumento gradual ao passar do tempo, sendo (a) como inicial e (f) como final.

Fonte: (NICAUD et al., 2017)

levedura tem a capacidade de produzir enzimas, proteínas e outros metabólitos de interesse (MUSSAGY et al., 2022; WEN et al., 2020). Como qualquer organismo utilizado em processos biotecnológicos, ela enfrenta limitações que podem afetar sua eficácia e eficiência na produção de lipídios. A eficiência com que a *Rt* converte substratos (alimentação) em lipídios pode variar dependendo da composição do meio de cultivo, da presença de inibidores e da concentração de nutrientes. Substratos de baixa qualidade ou a presença de compostos tóxicos podem reduzir a eficiência da conversão (RABELO; PRADELLA; IENCZAK, 2019). Os custos associados ao cultivo de *Rt*, incluindo o meio de cultivo, controle de condições ambientais (temperatura, pH, oxigênio), e a extração subsequente de lipídios podem ser proibitivos, especialmente em grande escala. A busca por meios de cultivo econômicos e métodos de extração eficientes é essencial para tornar a produção comercialmente viável (RABELO; PRADELLA; IENCZAK, 2019). A taxa de crescimento e a densidade celular alcançável em fermentações podem limitar a quantidade total de lipídios produzidos. Cepas de crescimento lento ou condições subótimas de cultivo podem resultar em processos de produção longos e menos eficientes (RABELO; PRADELLA; IENCZAK, 2019). A manipulação genética para melhorar a capacidade de produção de lipídios pode enfrentar desafios relacionados à estabilidade genética. Alterações genéticas que aumentam a produção de lipídios podem afetar outras características celulares, como a taxa de crescimento ou a resistência a estresses ambientais (RABELO; PRADELLA; IENCZAK, 2019). A ruptura eficaz da parede celular para extração de lipídios pode ser difícil. Métodos físicos e químicos têm suas próprias limitações, como o custo, eficiência e potenciais danos aos lipídios extraídos (RABELO; PRADELLA; IENCZAK, 2019). A sensibilidade de *Rt* a variações nas condições ambientais, como mudanças de temperatura, pH, e concentrações de oxigênio, pode afetar seu metabolismo e, por consequência, a

acumulação de lipídios (RABELO; PRADELLA; IENCZAK, 2019). O uso de substratos que competem com a cadeia alimentar humana ou animal para o cultivo de *Rt* pode levantar questões éticas e de sustentabilidade, além de potencialmente aumentar os custos (RABELO; PRADELLA; IENCZAK, 2019). A superação dessas limitações requer pesquisa contínua, e poderão ser temas para trabalhos futuros para otimizar as condições de cultivo, desenvolver métodos de extração mais eficientes e possivelmente modificar geneticamente as cepas de *Rt* para melhorar sua eficiência produtiva e estabilidade genética.

2.3 Plasma Não-Térmico

O plasma não-térmico pode ser gerado utilizando diferentes métodos, tais como descargas elétricas, radiofrequência, laser e micro-ondas. O processo geralmente começa com a introdução de um gás neutro na câmara de plasma. Em seguida, é aplicada uma fonte de energia para ionizar o gás e gerar o plasma. A energia fornecida pode ser suficiente para ionizar completamente os átomos ou apenas para ionizar uma fração deles, dependendo do tipo de plasma desejado (STRYCZEWSKA, 2020). A ionização ocorre quando a energia fornecida é suficiente para remover elétrons dos átomos, criando íons positivos, negativos e elétrons livres. Esses elétrons livres possuem uma alta energia cinética e são considerados a componente "quente" do plasma. Por outro lado, os átomos e moléculas do gás mantêm uma temperatura mais baixa e são considerados a componente "fria" do plasma (SCHOLTZ *et al.*, 2015; STRYCZEWSKA, 2020). Uma vez formado, o plasma não-térmico exibe propriedades físicas e químicas peculiares. Os elétrons livres têm alta mobilidade e alta energia, o que lhes permite colidir com outras moléculas e átomos, gerando espécies reativas como radicais livres, íons e moléculas excitadas. Essas espécies reativas são altamente reativas e podem interagir com outras moléculas presentes no sistema, iniciando reações químicas ou modificando as propriedades dos materiais (ALMEIDA, 2023). As espécies reativas no plasma não-térmico desempenham um papel importante em várias aplicações. Por exemplo, em aplicações de esterilização e descontaminação, as espécies reativas podem reagir com componentes biológicos, danificando e inativando microrganismos, como bactérias, fungos e vírus. Isso ocorre por meio de processos de oxidação e quebra de ligações químicas essenciais nas células microbianas (NISHIME *et al.*, 2017; PANNGOM *et al.*, 2014). Um aspecto importante do plasma não-térmico é sua capacidade de operar em temperaturas relativamente baixas. Isso é particularmente relevante em aplicações biomédicas, onde o calor excessivo pode danificar materiais sensíveis, como tecidos biológicos ou dispositivos médicos (PINA, 2022).

2.4 Solventes Orgânicos

Um solvente orgânico é uma substância química que tem a capacidade de dissolver, dispersar ou extrair outras substâncias orgânicas. Esses solventes são compostos principal-

mente por carbono e hidrogênio, podendo também conter outros elementos como oxigênio, gases, enxofre, entre outros (BELUSSO, 2022). Os solventes orgânicos possuem propriedades que facilitam a solubilização de lipídios, proteínas e outros compostos presentes na parede celular. Eles podem atuar de diferentes maneiras, dependendo da composição e estrutura da parede celular da espécie em estudo. Alguns solventes orgânicos comumente utilizados incluem alcoóis (como etanol e isopropanol), éteres (como éter etílico), acetona, metanol, hexano, entre outros (MEROIÇO, 2023). A utilização de solventes orgânicos para extração dos lipídios após o rompimento da parede celular pode ser feita por meio de diferentes técnicas, como maceração, banhos de sonificação ou agitação em vórtice. A escolha da técnica e do solvente específico depende das características da parede celular, do tipo de célula e dos componentes intracelulares desejados (ALVES, 2022). A utilização de solventes orgânicos para extração de algum produto intracelular de interesse pode afetar a integridade e atividade de alguns componentes celulares, como enzimas e proteínas específicas. Portanto, é necessário considerar a compatibilidade dos solventes com os componentes intracelulares de interesse (ALVES, 2022).

2.5 Ácidos graxos na Engenharia biomédica

Os ácidos graxos são moléculas orgânicas e versáteis que podem ser aplicados em diversas áreas. Na engenharia biomédica as aplicações são encapsulamento, onde esse lipídio pode fazer o carregamento de um fármaco em caso de problemas na articulações como artrose é indicado o uso de próteses, no caso da prótese metálica o bio óleo pode ser empregue como lubrificante, outra possível aplicação é como surfactante para formulação, possibilitando a interação entre meios hidrofóbicos e hidrofílicos(VYVER et al., 2020; TAJAU et al., 2021; FARIAS, 2021).

Ácidos graxos presentes em óleos naturais, como o óleo de palma que possui partes magoritárias de ácido palmítico e oleico, são matérias-primas valiosas para o desenvolvimento de materiais poliméricos avançados, incluindo resinas de revestimento, nanopartículas, scaffolds, nanocompósitos e técnicas de litografia. A estrutura química do óleo de palma, que contém cadeias de hidrocarbonetos, ligações duplas de carbono e ligações éster, permite a modificação e aperfeiçoamento dessas estruturas para novos materiais. Além disso, ácidos graxos, ésteres metílicos, álcoois graxos e aminas graxas derivados do óleo de palma são fundamentais na produção de poliuretanos, surfactantes e lubrificantes, desempenhando um papel na sustentabilidade ambiental. O óleo de palma também tem sido objeto de pesquisas para entrega de medicamentos, com técnicas como microemulsão e nanoemulsão permitindo a criação de partículas com menos de 500 nm, úteis para diversas formas de administração de medicamentos, especialmente no tratamento do câncer de mama(TAJAU et al., 2021).

Os ácidos graxos saturados, como o ácido palmítico, e os ácidos graxos insaturados,

como o ácido oleico, estão presentes no líquido sinovial, o lubrificante natural das articulações sinoviais do corpo humano. Devido à sua presença no líquido sinovial, esses ácidos graxos podem ter aplicações como lubrificantes, sendo possível estudar sua aplicação direta nas articulações para reposição ou em próteses metálicas, como por exemplo utilizando o aço 316L, contribuindo assim para a preservação das articulações(VYVER *et al.*, 2020).

O aço 316L é amplamente utilizado em aplicações de saúde pública, incluindo como material para próteses e implantes médicos. Existem preocupações substanciais quanto aos efeitos da metalose, que ocorre devido à infiltração de partículas provenientes do desgaste de implantes metálicos. A metalose, pode ser observado um caso desse na Figura 2 pode comprometer tanto os tecidos quanto os ossos, levando a complicações como infecções e necrose tecidual, em razão da corrosão do material, o que é frequentemente relacionado ao uso inadequado de metais em implantes permanentes em contato prolongado com fluidos corporais (SENE *et al.*, 2023; SAYED-NOOR; SJöDéN, 2010).



Figura 2 – Metalose em articulação.
Fonte: (SAYED-NOOR; SJöDéN, 2010)

Diversos microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos, são capazes de produzir compostos metabólicos, como por exemplo ácidos graxos. Entre esses compostos, os que possuem propriedades surfactantes, ou seja, que reduzem a tensão superficial e têm alta capacidade de emulsificação, são conhecidos como biossurfactantes. Estes biossurfactantes são moléculas anfipáticas, com uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica, o que lhes permite se distribuir nas interfaces entre fluidos com diferentes níveis

de polaridade. Devido a essas propriedades, os biossurfactantes têm uma ampla gama de aplicações industriais, como detergência, emulsificação, lubrificação, formação de espuma, molhagem, solubilização e dispersão de fases. A presença de ácidos graxos na estrutura dos biossurfactantes é vantajosa, pois esses ácidos desempenham um papel crucial no metabolismo humano, servindo como precursores de substâncias como as prostaglandinas, que têm funções importantes, incluindo a proteção da mucosa gástrica, aumento do fluxo renal e regulação das funções endócrinas([ALVES et al., 2019](#)).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos utilizados nesta dissertação, descritos nesta seção, estão ilustrados na Figura 3. Inicialmente, *Rhodospiridium toruloides* (Rt) é cultivado e seu crescimento é monitorado utilizando análises de densidade óptica (DO) e do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Após a etapa de análise, as células de Rt passam por dois diferentes métodos de tratamento para rompimento da parede celular do microrganismo: tratamento a plasma não-térmico e tratamento com ácido sulfúrico. Em ambos os casos, a extração de lipídios é realizada utilizando uma solução de solventes orgânicos. Os lipídios extraídos são então caracterizados para avaliar sua morfologia e composição química. Finalmente, os lipídios são aplicados em testes de atrito para investigar suas propriedades tribológicas, fornecendo uma compreensão abrangente das suas potencialidades e limitações como bio-lubrificantes.



Figura 3 – Fluxograma delineando a divisão desta seção.
Fonte: A Autora (2024)

Os procedimentos descritos a seguir foram conduzidos no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, localizado em São José dos Campos, São Paulo.

3.1 Fermentação

Essa seção descreve os procedimentos detalhados utilizados para cultivar *Rhodospiridium toruloides*, monitorar seu crescimento durante o processo de fermentação. A subseção 3.1.1 fornece informações sobre os diferentes meios de cultura utilizados e as condições de crescimento. Em seguida, a subseção 3.1.2 detalha a metodologia empregada para monitorar o crescimento celular. Finalmente, a subseção 3.1.3 descreve o procedimento para a quantificação dos açúcares redutores no meio de fermentação.

3.1.1 Meios de Cultura do Rt

Uma linhagem de *Rhodospiridium toruloides*, CCT 0783 com nível de biossegurança 1, fornecida pela Fundação André Tosello foi disposta em todos os cultivos.

O pré-inóculo foi utilizado meio Saboraund 0,12 g e 4 mL de água destilada, conforme descrito no rótulo, para fim de melhor aeração foi preparado uma solução de 40 mL com a mesma concentração, armazenada em um erlenmeyer de 125 mL e esterilizada na autoclave vertical CS Primatec a 121 °C por 15 min, após a solução chegar a temperatura ambiente foi inoculada com uma alça metálica de platina.

O frasco inoculado permanece no agitador de incubadora INFORS HT modelo Ecotron com temperatura em 28,5 °C por 48 h e 180 rpm.

O preparo do inóculo utiliza a receita adaptada de Pradella (1980) da Tabela 2, com a massa dos reagentes para 36 mL em um erlenmeyer de 250 mL, essa solução é esterilizada na autoclave vertical CS Primatec a 121 °C por 15 min, ao chegar a temperatura ambiente, é adicionada 4 mL da solução do pré-tratamento, o frasco permanece no incubador rotativo INFORS HT modelo Ecotron por 48 h nas mesmas condições já citadas anteriormente.

O meio de fermentação, após o pré-inóculo e inóculo, é o meio definido com 360 mL volume final em um erlenmeyer de 2 L, essa solução é esterilizada na autoclave vertical CS Primatec a 121 °C por 15 min, após estabilizar na temperatura ambiente, adiciona 40 mL do inóculo, o frasco permanece no agitador de incubadora INFORS HT modelo Ecotron por 96 h, sendo acompanhado com coletas de amostra estéreis para análise de densidade óptica e DNS, a última coleta é destinada a massa seca total. O inóculo foi empregue o meio de cultivo definido com a composição disposta na Tabela 2, pode ser visto a presença dos cloretos de cálcio e ferro e sódio.

Tabela 2 – Meio definido utilizado nas culturas do Rt.

| Reagente | Quantidade (g/L) |
|-----------------------|------------------|
| Glicose | 40,00 |
| Extrato de levedura | 2,00 |
| Cloreto de cálcio | 0,02 |
| Cloreto de ferro 3 | 0,01 |
| Cloreto de sódio | 1,00 |
| Sulfato de amônio | 1,00 |
| Sulfato de magnésio | 2,00 |
| Fosfato monopotássico | 1,00 |
| Fosfato de sódio | 1,00 |

Fonte: Adaptado de Pradella (1980)

A levedura Rt possui perfil de acumulo de lipídios intracelulares com a razão entre carbono e nitrogênio equilibrada pois componente essenciais para o crescimento o celular, entretanto o nitrogênio precisa ser limitado e a fonte de carbono precisa ser excessiva. A

formação do lipídio intracelular ocorre em resposta a necessidade da levedura criar uma reserva energética utilizando a fonte de carbono quando ocorre o esgotamento de nitrogênio no meio de cultivo (LEITE, 2019).

As culturas foram conservadas em meio Dextrose ágar em placa de petri, armazenadas em refrigeração em temperatura de 5 °C em média. As etapas de fermentação então representadas na Figura 4.

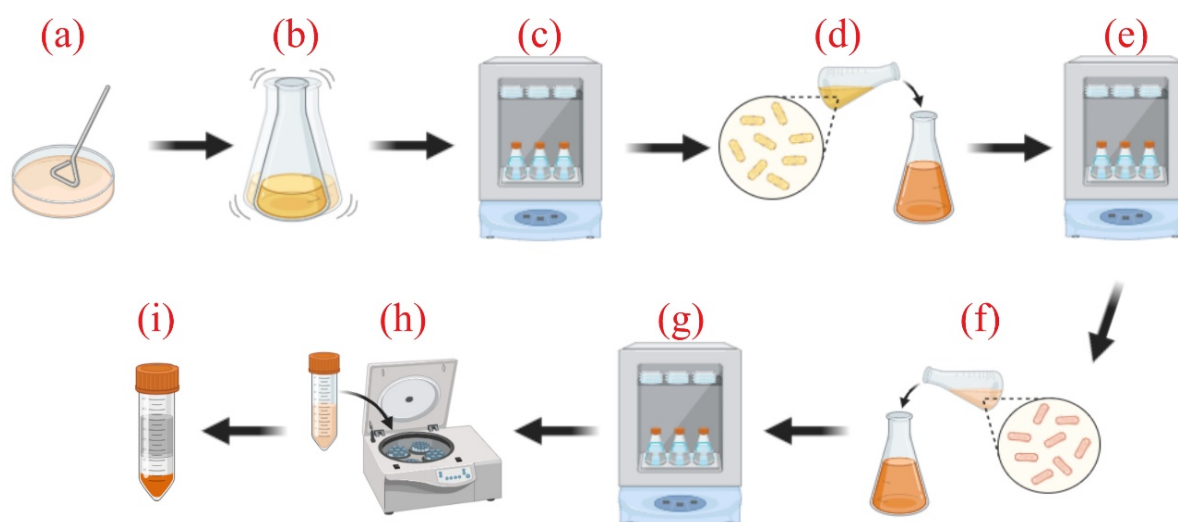


Figura 4 – Esquema de fermentação de *Rhodosporidium toruloides* (Rt), detalhando as etapas de processamento e monitoramento do consumo e crescimento do microrganismo. (a) Cultura de Rt em placa de Petri e coletada com alça de platina. (b) Transferência do microrganismo para erlenmeyer. (c) Incubação do pré-inóculo. (d) Transferência para erlenmeyer com meio definido. (e) Incubação do inóculo. (f) Transferência do meio definido para erlenmeyer. (g) Incubação do meio definido até a fermentação atingir o ponto ótimo, monitorada por DNS e densidade óptica. (h) Transferência do meio fermentado para tubos Falcon e centrifugação. (i) Tubo Falcon após centrifugação, mostrando as fases separadas do sobrenadante e do precipitado.

Fonte: A Autora (2024)

A Figura 4 contém o esquema de fermentação de Rt, detalhando as etapas de processamento e monitoramento do consumo e crescimento do microrganismo. Na Figura 4(a), a placa de Petri com a cultura de Rt é levada ao fluxo laminar previamente higienizado. Utilizando uma alça de platina, é coletada uma alíquota desse microrganismo. Na Figura 4(b), o microrganismo coletado na etapa (a) é transferido para um erlenmeyer de 125 mL contendo meio Saboraund, preparado com 1,2 g dissolvido em 40 mL de água destilada e autoclavado a 121 °C por 15 min. Na Figura 4(c), o erlenmeyer com o pré-inóculo é levado ao incubador rotativo, onde permanece por 48 h a 180 rpm e a 28,5 °C. Na Figura 4(d), ocorre a transferência de 4 mL do meio Saboraund para um erlenmeyer de 250 mL contendo 36 mL de meio definido, também previamente preparado e autoclavado a 121 °C por 15 min. Na Figura 4(e), o erlenmeyer com o meio definido é novamente levado ao incubador rotativo, onde permanece por 48 h a 180 rpm e a 28,5 °C. Na Figura 4(f), o meio definido é transferido para um erlenmeyer de 2 litros contendo 360 mL de meio definido, previamente

preparado e autoclavado a 121 °C por 15 min, totalizando 400 mL de volume. Na Figura 4(g), o erlenmeyer de 2 litros é levado ao incubador rotativo até atingir o ponto ótimo de fermentação, identificado quando o açúcar do meio está esgotado e o microrganismo apresenta maior crescimento. Esses parâmetros são monitorados por análises com reagente DNS e densidade óptica, variando de 72 a 120 h. Na Figura 4(h), após a fermentação, o meio fermentado é transferido para tubos Falcon de 50 mL e centrifugado por 15 min a 4000 rpm. Na Figura 4(i), é apresentado o tubo Falcon após o processo de centrifugação.

3.1.2 Crescimento Celular

A análise de densidade óptica (DO) consiste na medição da transmitância da luz no comprimento de onda de 600 nm, foi utilizada para acompanhar o crescimento de célula. A densidade é determinada pelo espectrofotômetro Kasvi modelo K37-VIS, baseada na metodologia descrita por [Oliveira e Damiani \(2024\)](#).

A Figura 5 contém um esquema detalhado, passo a passo, da metodologia utilizada na análise de DO. No item (a) da Figura 5, é coletada, com o auxílio de uma pipeta, uma alíquota de 5 mL do erlenmeyer contendo a fermentação do microrganismo. No item (b), essa amostra é transferida para um tubo Falcon. Em seguida, no item (c), a amostra é diluída 100 vezes, utilizando 0,1 mL da amostra e 9,9 mL de água destilada. Essa suspensão é homogeneizada e transferida para uma cubeta mostrada no item (d). A cubeta preenchida com água destilada será o padrão para essa análise. No item (e), ambas as cubetas são levadas ao espectrofotômetro para medição da absorbância ao comprimento de onda de 600 nm.



Figura 5 – Esquema da metodologia de análise de densidade óptica (DO) para *Rhodosporidium toruloides*. (a) Coleta de uma alíquota contendo a fermentação do microrganismo. (b) Transferência da amostra para um tubo Falcon. (c) Diluição da amostra. (d) Transferência da amostra diluída para uma cubeta, com uma cubeta preenchida com água destilada como padrão. (e) Medição da absorbância no espectrofotômetro a 600 nm.

Fonte: A Autora (2024)

A concentração celular foi obtida utilizando

$$X(g/L) = 0.4583 \times DO \times f, \quad (3.1)$$

na qual X é a concentração celular no meio de fermentação em g/L, DO é a densidade óptica medida no espectrofotômetro a 600 nm, f é o fator de diluição e o coeficiente 0.4583 foi obtido a partir de uma curva de calibração de concentrações celular conhecidas fazendo-se a correlação linear entre a concentração celular e o valor de DO obtido.

3.1.3 Consumo de Açúcar Redutor

O método com DNS, ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), consiste na determinação da concentração de açúcares redutores presentes em um determinado meio. A análise foi baseada na metodologia descrita por MILLER GL (1959) com alterações na diluição. Para medição foi utilizada a diluição de 100x, sendo 1 μ L da amostra retirada da fermentação e 9.9 mL de água destilada, agitação manual seguido por adicionar 2.5 mL dessa solução com 2.5 mL da solução do ácido 3,5-dinitrosalicílico, agitação manual com finalidade de homogeneizar e banho-maria a 100 °C por 15 min, em seguida banho de gelo por 5 min. O branco da análise é composto por 2.5 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico e 2.5 mL de água destilada, passa pela mesma etapa da amostra. O espectrofotômetro Kasvi modelo K37-VIS é zerado com a amostra branco na faixa de 540 nm e realizada a leitura das amostras.

O preparo do reagente DNS é baseado em duas soluções A e B, preparadas separadamente e unidas no final. A solução A é composta por uma solução de 50 mL de NaOH na concentração de 2 M e adicionada 2.5 g do ácido 3-5dinitrosalicílico, é necessário o uso de agitador magnético com aquecimento. Enquanto a solução A é agitada, inicia-se o preparo da solução B com 125 mL de água destilada e 75 g de tartarato de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), também se faz necessário a agitação da solução sob agitador magnético com aquecimento e após ambas soluções dissolvidas foi unidas em frasco com tampa envolto em papel alumínio para armazenamento.

Após o preparo da solução do reagente DNS, este é utilizado na análise de açúcares redutores presentes na amostra. A Figura 6 contém um esquema da metodologia de análise de DNS.

No item (a) da Figura 6, é coletada, com o auxílio de uma micropipeta, uma alíquota de 5 mL. No item (b), essa amostra é transferida para um tubo Falcon e levada à centrífuga por 15 min a 4000 rpm. O item (c) representa o tubo Falcon retirado da centrífuga, onde as duas fases estão bem definidas: a mais escura é o sobrenadante e a mais clara é o precipitado. Para essa análise, utiliza-se o sobrenadante. No item (d), é coletado 0,1 mL do sobrenadante, transferido para um tubo Falcon e diluído 100 vezes com a adição de 9,9 mL de água destilada. No item (e), são preenchidos dois tubos de

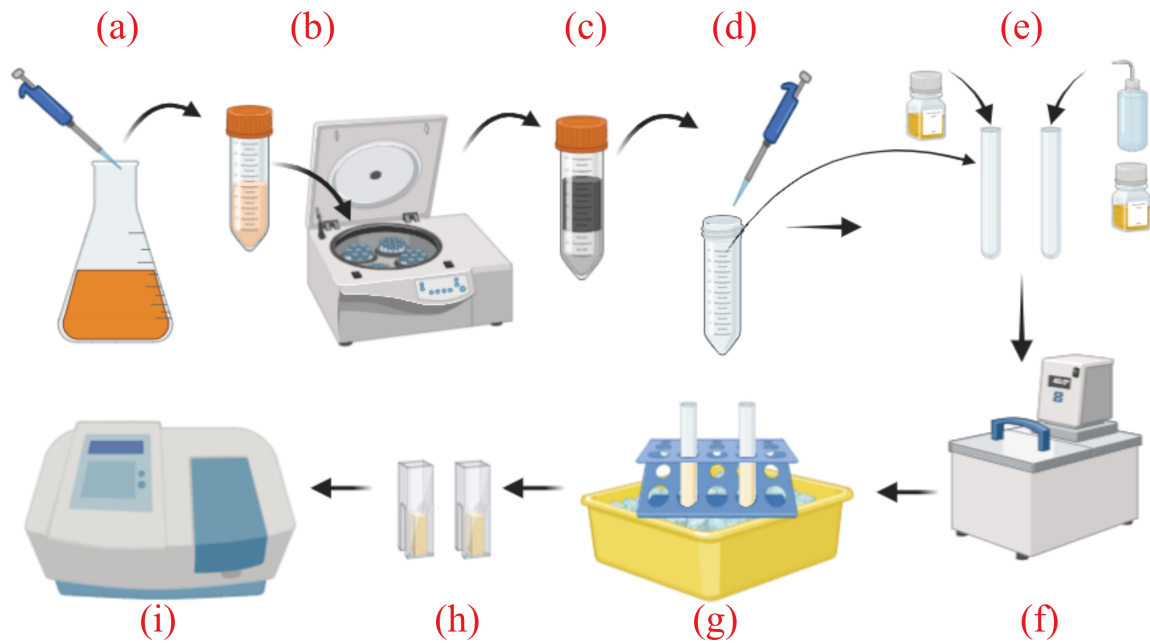


Figura 6 – Esquema da metodologia da análise com reagente DNS para a determinação de açúcares redutores. (a) Coleta de uma alíquota contendo a fermentação do microrganismo. (b) Transferência da amostra para um tubo Falcon e centrifugação. (c) Separação do sobrenadante. (d) Coleta do sobrenadante e diluição em água destilada. (e) Preenchimento de dois tubos de vidro: um com água destilada e reagente DNS, e o outro com amostra diluída e reagente DNS. (f) Aquecimento dos tubos de vidro em banho-maria. (g) Resfriamento dos tubos de vidro em banho de gelo. (h) Transferência das soluções dos tubos de vidro para cubetas. (i) Medição da absorbância das soluções no espectrofotômetro a 540 nm.

Fonte: A Autora (2024)

vidro: um com 2.5 mL de água destilada e 2.5 mL do reagente DNS, e o outro com 2.5 mL da amostra diluída e 2.5 mL do reagente DNS. No item (f), os tubos de vidro são levados ao banho-maria a 100 °C por 15 min. No item (g), a estante com os tubos de vidro é levada ao banho de gelo por 5 min para resfriar as soluções dos tubos. No item (h), as cubetas são preenchidas com as soluções dos tubos. Finalmente, no item (i), as cubetas são levadas ao espectrofotômetro para leitura da absorbância.

A concentração dos açúcares redutores foi obtida utilizando

$$AR(g/L) = 0.293 \times Ab \times f, \quad (3.2)$$

na qual AR é a concentração do açúcar redutor no meio de fermentação em g/L, Ab é a absorbância medida no espectrofotômetro a 540 nm, f é o fator de diluição e o coeficiente 0.293 foi obtido a partir de uma curva de calibração de soluções de concentração conhecida de glicose, fazendo sua correlação linear com os valores de absorbância obtidos.

3.1.4 Massa Seca

O procedimento de determinação da massa seca foi utilizado para verificar e quantificar o crescimento do Rt, complementando as medições de densidade óptica (DO) realizadas durante o processo de fermentação.

A massa seca consiste no peso em massa do conteúdo sólido da levedura. Neste trabalho a metodologia foi baseada no artigo de [Martins \(2017\)](#) com alterações referente a temperatura para secagem da membrana. O método utilizado neste trabalho consiste em coletar uma amostra de 5 mL do frasco de fermentação com 96 h. A amostra é filtrada através de uma membrana, previamente pesada em balança analítica, utilizando um sistema de filtração a vácuo. Posteriormente a membrana foi seca em estufa à 60 °C até total evaporação de solvente. A massa seca, então, é determinada pela diferença entre a massa da membrana antes e após filtração.

3.2 Rompimento da Parede Celular do Rt

O rompimento da parede celular do Rt é uma etapa crucial para a extração eficiente dos lipídios intracelulares acumulados durante a fermentação. Esta seção detalha os dois métodos utilizados para romper a parede celular do Rt: o método convencional utilizando ácido sulfúrico e o método inovador utilizando plasma não-térmico de arco deslizante. Ambos os métodos têm suas vantagens e limitações, e são essenciais para a compreensão das técnicas de extração de lipídios. As subseções a seguir descrevem os procedimentos e as condições específicas de cada método, bem como as adaptações feitas para otimizar os resultados.

3.2.1 Via Método Convencional

O método convencional com ácido sulfúrico, de acordo com [Pradella \(1980\)](#), [Vieira \(2016\)](#), foi utilizado para rompimento da parede celular da levedura e possibilitar assim a extração dos lipídios neutros acumulados no interior das células.

Conforme descrito por [Pradella \(1980\)](#), a lise celular pode ser conduzida utilizando 10 mL de cultivo e 0,5 mL de HCl concentrado (10 mol L^{-1}), ambos adicionados em frascos apropriados. A reação é então realizada a 120 °C por 30 min em autoclave. Após a conclusão da autoclavagem, o sistema é resfriado à temperatura ambiente, e então 20 mL de éter de petróleo e 5 mL de etanol hidratado com 95% de pureza são adicionados ao frasco. O conteúdo é agitado por 6 h para promover a lise celular.

Conforme mencionado por [Vieira \(2016\)](#), a lise celular pode ser executada utilizando 300 mg de biomassa e 3 mL de ácido sulfúrico. Essa solução ácida e a biomassa são então submetidas a 120 °C por 30 min.

A metodologia adaptada foi realizada após a etapa de fermentação, onde o volume

foi dividido em tubos Falcon para possibilitar a centrifugação a 4000 rpm por 15 min, o conteúdo do tubo Falcon formou duas fases onde a fase sobrenadante foi descartada. O precipitado contém a biomassa do Rt a qual é adicionado o ácido sulfúrico PA com uma relação massa:ácido de 0,23 g de ácido para cada grama de célula. O ácido sulfúrico e a biomassa são transferidos para um frasco de vidro com tampa, então submetido a 120 °C por 13 min.

3.2.2 Via Plasma Não-Térmico de Arco Deslizante

O tratamento do Rt a plasma foi realizado utilizando um reator tipo plasma de arco deslizante com argônio e ar comprimido baseado na metodologia de [Doria et al. \(2015\)](#) conforme visualizado na Figura 7, com modificação no tempo de exposição e volume da amostra. Para esse tratamento foi utilizado um béquer com 50 mL de amostra, por 5 min. Após o tratamento as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 15 min, e armazenadas sob resfriamento entre 5 °C e 10 °C.

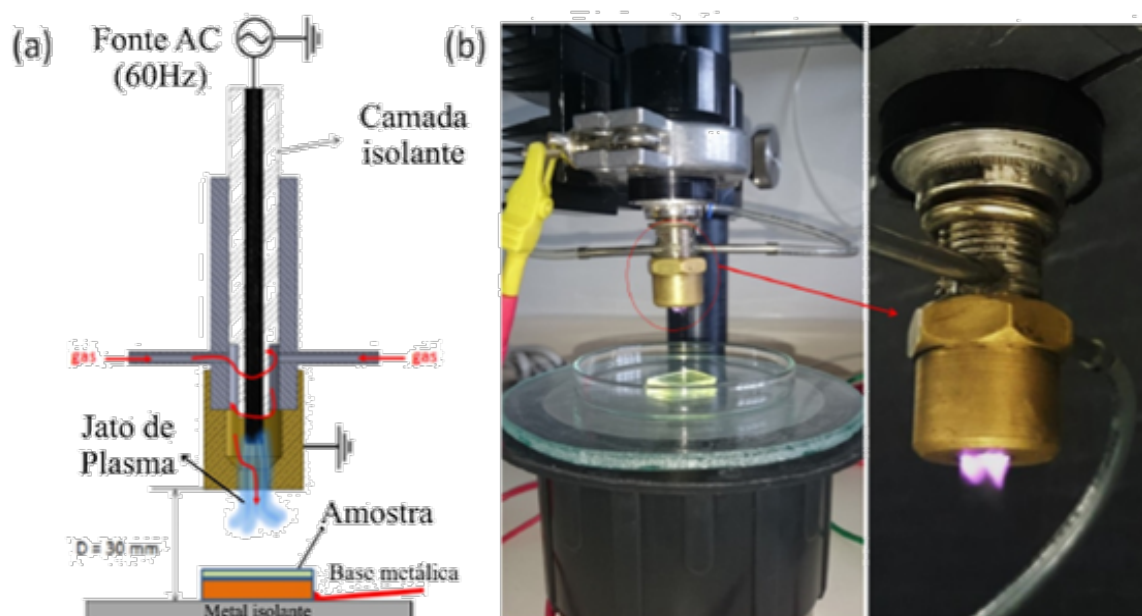


Figura 7 – Sistema de Plasma em arco deslizante. (a) Diagrama esquemático mostrando a configuração do sistema. (b) Fotografia mostra o equipamento em operação.

Fonte: Adaptado de [Doria et al. \(2015\)](#).

A Figura 7 ilustra um sistema de plasma em arco deslizante utilizado para o tratamento de amostras. Na Figura 7(a), o diagrama esquemático mostra a configuração do sistema, que inclui uma fonte de corrente alternada (AC) de 60Hz para gerar o jato de plasma. O sistema é composto por uma camada isolante que separa a fonte de energia do jato de plasma, garantindo segurança e eficiência no processo. O jato de plasma é direcionado para a amostra, posicionada sobre uma base metálica isolada. O diâmetro do jato de plasma é especificado como 30 mm, indicando a área de tratamento do plasma sobre a amostra. Na Figura 7(b), a fotografia mostra o equipamento em operação, com

o jato de plasma gerado e direcionado para a amostra, que está colocada em uma placa de Petri. A imagem à esquerda apresenta a configuração completa, incluindo a amostra sob o jato de plasma. Este sistema é utilizado para tratamento do Rt como mencionado anteriormente.

3.3 Extração dos Lipídios

O processo de extração dos lipídios ocorre após as etapas de fermentação e rompimento da parede celular, via plasma não-térmico e via ácido, em ambas as amostras.

Conforme mencionado por [Vieira \(2016\)](#), após a conclusão da reação de lise celular, 6 mL de hexano são adicionados e o conteúdo é agitado em vortex por 2 min. Em seguida, é agitado em um incubador rotativo a 350 rpm e 28 °C por 4 h para extrair os lipídios. Após essa etapa, o material é centrifugado a 4000 rpm por 7 min.

A metodologia adaptada utilizada nesta dissertação utilizou uma mistura de solventes orgânicos. No frasco de vidro com a biomassa, em temperatura ambiente, é adicionado uma solução solvente orgânico, com concentração 80% de hexano e 20% de álcool etílico. O frasco é levado para incubadora por 4 h a 18 °C e 180 rpm. Após a extração a fase leve é retirada e colocada em vidro relógio de massa conhecida, e levado a estufa em 60 °C até a evaporação total dos solventes, ficando apenas o bio óleo.

3.4 Caracterização do Microrganismo

3.4.1 Morfologia do Microrganismo

A análise de morfologia é importante para verificar em alta resolução as características microestruturais de amostras sólidas e pode ser empregue em diversos materiais ([DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007](#)).

Foi preparado uma amostra de levedura para microscopia óptica que envolveu alguns passos. Primeiro, foi necessário limpar as lâminas e lamínulas de vidro com álcool para remover qualquer resíduo. Em seguida, a cultura de levedura em meio de fermentação foi coletada com uma micropipeta retirando uma pequena amostra. A amostra foi transferida para uma gota de água destilada no centro de uma lâmina de vidro, com a auxílio da pipeta, a amostra é espalhada suavemente para formar uma camada fina, o que ajuda a separar as células de levedura, tornando-as mais fáceis de visualizar. Em seguida, uma lamínula de vidro é colocada cuidadosamente sobre a amostra, evitando a formação de bolhas de ar, inclinando a lamínula e abaixando-a lentamente sobre a gota. A lâmina é então colocada no microscópio e ajusta-se a objetiva para focar na amostra, começando com uma objetiva de baixa potência, como 10x, e mudando para uma potência maior, 40x ou 100x, para uma visualização mais detalhada. A iluminação e o foco são ajustados

conforme necessário para obter a melhor imagem possível. [Alcântara, Cunha e Almeida \(2001\)](#).

O estudo da morfologia de amostras biológicas requer um tratamento prévio para evitar o colapso das células em ambiente a vácuo com soluções e tempo de descanso, descritas no próximo parágrafo, posteriormente as amostras passam pela metalizadora modelo K550X (Emitech). As fotomicrografias são realizadas no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), modelo EVO MA 10 (Zeiss), para a análise da formação, distribuição e morfologia do microrganismo.

O tratamento das amostras biológicas possui etapas, sendo necessário o preparo de uma solução com: 5 mL de uma solução tampão fosfato (concentração 0,2 M), 1,2 mL de glutaraldeído 25% e 3,8 mL de água destilada. Essa solução é utilizada para lavagem das amostras, nas quais devem acrescentar o dobro da quantidade da amostra, agitar para homogeneizar e deixar em repouso por 30 min, após o tempo centrifugar e descartar sobrenadante, esse processo se repete por 3 vezes, sendo que na última lavagem deixa em repouso de um dia para o outro, e centrifugar descartando o sobrenadante para a próxima etapa. A próxima etapa é a desidratação com o reagente utilizado é acetona, abaixo estão dispostas as porcentagens do reagente e tempo de reação (Tabela 3).

Tabela 3 – Desidratação protocolo MEV.

| Acetona | Água destilada | Tempo de reação |
|---------|----------------|-----------------|
| 30% | 70% | 10 min |
| 50% | 50% | 10 min |
| 70% | 30% | 10 min |
| 90% | 10% | 10 min |
| 90% | 10% | 20 min |
| 100% | 0% | 10 min |
| 100% | 0% | 20 min |

Fonte: A Autora (2024)

3.4.2 Espectroscopia (FTIR-ATR)

A espectroscopia de transformada de Fourier é uma técnica empregada para caracterização de grupos funcionais, com comprimentos de ondas específicos. A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier modo de reflexão total atenuada (ATR), o princípio deste tipo de espectroscopia baseia-se no fato de que quando um feixe de radiação passa de um meio mais denso (cristal de diamante utilizado no ATR) para um meio menos denso (amostra), ocorre reflexão. A técnica de ATR é principalmente utilizada para a análise de superfície em na forma de filme ou pó ([CONCEIÇÃO et al., 2014](#)).

Neste trabalho o preparo da amostra para essa análise consistiu em coletar uma alíquota de 0,200 g das células foi transferida dos frascos de agitação para tubos Eppendorf, e a biomassa de levedura foi lavada três vezes com solução de NaCl (1 g/L) para remover

o meio de crescimento restante. Após a última etapa de lavagem, aproximadamente 0,100 g de células permaneceram nos tubos Eppendorf e foram posteriormente utilizados para análise com o espectrofotômetro Spectrum Spotlight 400 com Transformada de Fourier com tecnologia de refletância total atenuada (ATR) da fabricante PerkinElmer. Os espectros serão registrados na região entre 4000 e 500 cm^{-1} com uma resolução espectral de 6 cm^{-1} no modo transmissão.

3.4.3 Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama (CG-FID)

A cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-FID) é uma técnica que combina a separação e a identificação de compostos orgânicos, tanto voláteis quanto semivoláteis. O princípio fundamental dessa técnica reside na migração diferencial dos constituintes de uma mistura através de uma coluna contendo uma fase estacionária, impulsionados por uma fase móvel conhecida como gás de arraste (MENDHAM et al., 2002).

As amostras passarão por processo de transesterificação, uma vez que a técnica cromatográfica somente consegue determinar ésteres de ácidos graxos, sendo descrita sua metodologia a seguir.

Pesou-se 0,05 g de amostra em tubo de ensaio com tampa, adicionaram-se 5 mL de metanol e agitou-se por 30 s, adicionaram-se 0,5 mL de solução KOH (14 mol/L) e agitou-se em vórtex por 10 s. Deixou-se em repouso em banho por 15 min a 85 °C e resfriou-se a amostra com água até alcançar a temperatura ambiente. Adicionaram-se 0,58 mL de solução de H_2SO_4 em metanol (12 mol/L) e agitou-se no vórtex por 1 min. Deixou-se em repouso em banho por 15 min a 85 °C, seguido de resfriamento até temperatura ambiente. Adicionaram-se 2 mL de hexano e de água ao tubo de ensaio, agitando-se em seguida no vórtex por 2 min. Centrifugou-se a 1500 rpm por 2 min, coletou-se a fase menos densa (cerca de $\frac{2}{3}$ da fase) e armazenou-se para análise de cromatografia gasosa.

A análise por cromatografia gasosa com amostra com rompimento via ácido sulfúrico empregou um cromatógrafo gasoso Clarus 580 PerkinElmer equipado com um detector de ionização de chama (FID) e uma coluna Elite-5 PerkinElmer, medindo 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm . As condições operacionais foram definidas da seguinte forma: as temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 250 °C. O programa de temperatura da coluna começou em 120 °C, mantido isotermicamente por 0,5 min, seguido por uma rampa de 3,0 °C/min até 235 °C, e depois uma rampa de 1,0 °C/min até 255 °C, que foi mantido por 1,2 min. O nitrogênio foi usado como gás de arraste, fluindo a uma taxa constante de 0,5 mL/min. O volume de injeção foi ajustado em 1 μL no modo splitless. Os ésteres metílicos foram identificados e quantificados comparando os tempos de retenção e as áreas dos picos com a mistura padrão 37 FAME da Supelco.

A análise por cromatografia gasosa com amostra com rompimento via plasma foi

utilizado um cromatógrafo gasoso Clarus 600 PerkinElmer equipado com um detector de ionização de chama (FID) e uma coluna SP-2560 Supelco, medindo 100 m x 0,25 mm x 0,2 μ m. As condições operacionais foram definidas da seguinte forma: as temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 260 °C. O programa de temperatura da coluna começou em 140 °C, mantido isotermicamente por 5 min, seguido por uma rampa de 2,0 °C/min até 240 °C. O nitrogênio foi usado como gás de arraste, fluindo a uma taxa constante de 16 mL/min. O volume de injeção foi ajustado em 1 μ L no modo splitless. Os ésteres metílicos foram identificados e quantificados comparando os tempos de retenção e as áreas dos picos com a mistura padrão 37 FAME da Supelco.

3.5 Aplicação - Análise tribológica

As análises tribológicas de atrito foram realizadas conforme descrito por [Nehme \(2017\)](#) com algumas modificações. Para realização do ensaio foi utilizado o Micro-Tribometer Basic System UMT-2MT, uma força normal de 5 N, com duração de 300 segundos, utilizando um par tribológico composto por esfera e placa de aço 316L, em atmosfera ambiente, com uma trilha de deslizamento de 1 mm e frequência de 1 Hz. Este estudo teve como objetivo investigar o comportamento de diferentes lubrificantes sob carga constante e condições controladas. A utilização da esfera de aço 316L permitiu uma avaliação precisa da resistência ao desgaste e ao atrito, enquanto a trilha de 1 mm e a frequência de 1 Hz garantiram um contato constante e uniforme durante o teste. Os resultados obtidos são fundamentais para compreender o desempenho dos materiais em aplicações nas quais o controle do atrito e do desgaste é essencial.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados e discussões estão apresentados de acordo com a sequência da metodologia e consistem na análise sobre o microrganismo e sua morfológica, e bio óleo produzido.

4.1 Fermentação do Rt

A fermentação da levedura pode ser representada ao longo do tempo por um gráfico de dispersão com linhas, como por exemplo a Figura 8, que mostra o consumo de açúcar e o crescimento celular durante a etapa de fermentação.

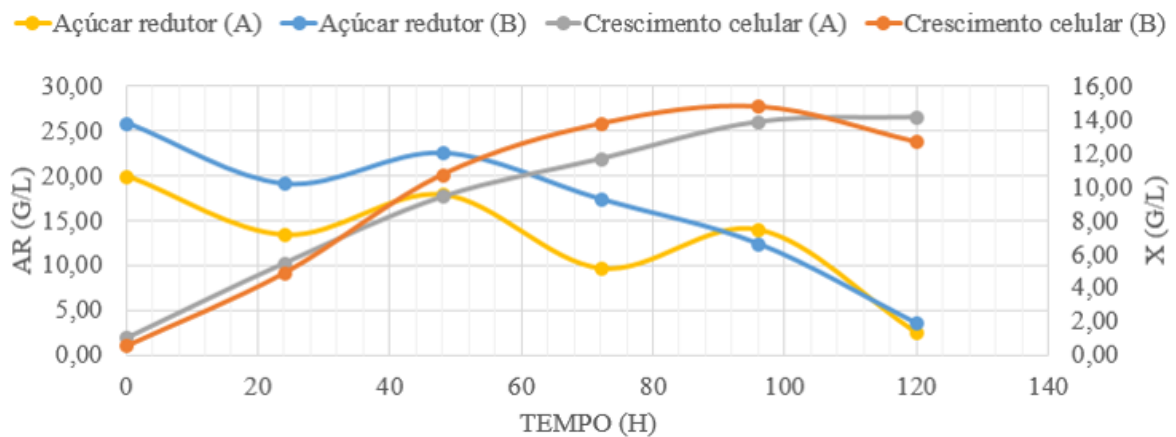


Figura 8 – Fermentação A e B. O eixo “x” representa o tempo em horas, enquanto o eixo “y” esquerdo representa a concentração de açúcar redutor em g/L, e o eixo “y” direito representa o crescimento celular em g/L. As linhas amarelas e azuis representam a concentração de açúcar redutor para as fermentações A e B, respectivamente, enquanto as linhas cinza e laranja representam o crescimento celular para as fermentações A e B, respectivamente.

Na Figura 8, ambas as fermentações A e B mostram um aumento inicial no açúcar redutor seguido de uma diminuição ao longo do tempo, indicando consumo de açúcar durante o processo de fermentação. A quantidade de açúcares redutores nas fermentações A começa com 20 g/L, e decresce ao longo do tempo, chegando a cerca de 5 g/L em 120 horas. A quantidade de açúcares redutores na fermentação B começa com 25 g/L, e decresce ao longo do tempo, chegando a cerca de 5 g/L em 120 horas. O crescimento celular mostra um padrão inverso ao de AR, com um aumento inicial seguido de uma estabilização após 80 horas. A Figura 8 sugere que no início, há uma fase de adaptação e crescimento celular, seguida por uma fase de consumo de açúcar, com as células atingindo um estado estacionário.

4.1.1 Densidade Óptica (DO)

A Tabela 4 contém os parâmetros utilizados para o cultivo de Rt, exibindo a Densidade Óptica (DO) ao longo do tempo, e a relação entre a diluição, o fator de correção da DO (FC DO) e o crescimento celular ajustado (DO*FC). Os principais dados incluem: o tempo varia de 0 a 120 horas, com intervalos de 24 horas. A diluição é consistentemente de 100 vezes para todas as amostras. Com o passar do tempo, a DO, indicativa da concentração celular, aumenta de 0,0230 a 0,3090. O FC DO é mantido em 0,4583 durante todo o período de estudo. O produto DO*FC, calculado multiplicando DO por FC DO, representa o crescimento celular ajustado, aumentando de 1,0541 a 14,1615, indicando o crescimento celular total durante o processo de fermentação. Observa-se que a taxa de crescimento diminui durante a fase final da fermentação, mostrando um padrão de crescimento cumulativo atingindo um limite máximo à medida que as células atingem a maturidade.

Tabela 4 – DO do cultivo do Rt.

| Tempo (h) | Diluição | DO | FC DO | DO*FC |
|-----------|----------|--------|--------|---------|
| 0 | 100x | 0,0230 | 0,4583 | 1,0541 |
| 24 | 100x | 0,1200 | 0,4583 | 5,4996 |
| 48 | 100x | 0,2060 | 0,4583 | 9,4410 |
| 72 | 100x | 0,2550 | 0,4583 | 11,6867 |
| 96 | 100x | 0,3030 | 0,4583 | 13,8865 |
| 120 | 100x | 0,3090 | 0,4583 | 14,1615 |

Fonte: A Autora (2024)

Na Tabela 4, é perceptível que o aumento do tempo está diretamente relacionado ao aumento do crescimento celular, sendo mais lento no estágio final da fermentação.

4.1.2 Método DNS

A fonte de carbono foi acompanhada durante o cultivo do Rt por meio da análise de DNS, conforme a Tabela 5, com o fator de correção (FC DNS). As amostras foram coletadas e analisadas a cada 24 horas durante o período de fermentação, e foram diluídas cem vezes para todas as análises. O resultado da última coluna DO*FC é o valor correspondente à quantidade total restante da fonte de carbono presente no meio.

Em contraste com a Tabela 4, a Tabela 5 contém uma relação inversamente proporcional, pois registra a quantidade de fonte de carbono no meio de cultivo, que diminui ao longo do tempo. Nota-se, no entanto, uma exceção no período de 96 horas, onde ocorre um aumento nesse valor. Isso pode indicar que o Rt consumiu a reserva interna por um período de tempo e, em seguida, retornou à fase de acumulação de reservas internas em forma de lipídios.

Tabela 5 – DNS do cultivo do Rt.

| Tempo (h) | Diluição | DNS | FC DNS | DNS*FC |
|-----------|----------|--------|--------|---------|
| 0 | 100x | 0,6820 | 0,2930 | 19,9826 |
| 24 | 100x | 0,4580 | 0,2930 | 13,4194 |
| 48 | 100x | 0,6100 | 0,2930 | 17,8730 |
| 72 | 100x | 0,3310 | 0,2930 | 9,6983 |
| 96 | 100x | 0,4770 | 0,2930 | 13,9761 |
| 120 | 100x | 0,0850 | 0,2930 | 2,4905 |

Fonte: A Autora (2024)

4.2 Caracterização do Lipídeo Extraído

A caracterização é necessária para identificar e compreender as propriedades do microrganismo analisado.

4.2.1 Morfologia do Microrganismo

A microscopia possibilita de forma prática e de rápido preparo a visualização de amostras biológicas, sendo possível ampliar em até 100 vezes. A Figura 9(a) contém a foto de uma microscopia de aumento de 40 vezes do Rt logo após o cultivo, pode ser observado um acúmulo intracelular. A Figura 9(b) contém a foto de uma microscopia de aumento de 100 vezes, sendo possível visualizar com mais detalhes o interior da célula e o acúmulo de lipídios intracelular. As Figuras 9(a) e 9(b) mostram que a levedura Rt possui células de parede fina, e formam longos metabásidios não septados e afilados apicalmente, com a ponta inflada. Essa levedura é considerada oleaginosa, pois pode acumular lipídios em mais de 70% de sua massa seca (SANTANA, 2022).

O processo de plasma não térmico, com ar comprimido e argônio, foi realizado em triplicata com 5 amostras, com alteração no tempo de exposição, sendo 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, os demais parâmetros foram mantidos. A caracterização das amostras, antes e após o tratamento com plasma, ocorreu via microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A Figura 10 contém seis fotomicrografias obtidas por MEV do Rt. Pode ser visto na Figura 10(a) a imagem das células de levedura logo após fermentação, observa-se nesta Figura que as células do Rt possuem conformação oval. A Figura 10(b) contém a fotomicrografia da célula do Rt com 24h da fermentação, pode ser observado nesta Figura que o tempo de 24 h de armazenamento em 10°C não impactou na morfologia celular. A Figura 10(c) contém a fotomicrografia do Rt com tratamento a plasma não-térmico por 5 min, pode ser visto nesta Figura o início do rompimento da parede celular do microrganismo apontado por seta amarela. A Figura 10(d) contém a fotomicrografia do Rt com tratamento a plasma não-térmico por 10 min, onde pode ser visto uma difusão do meio intracelular propiciando um aumento de área, conforme indicado na seta amarela. A Figura 10(e) contém a fotomicrografia do Rt com tratamento a plasma não-térmico por 20 min, a

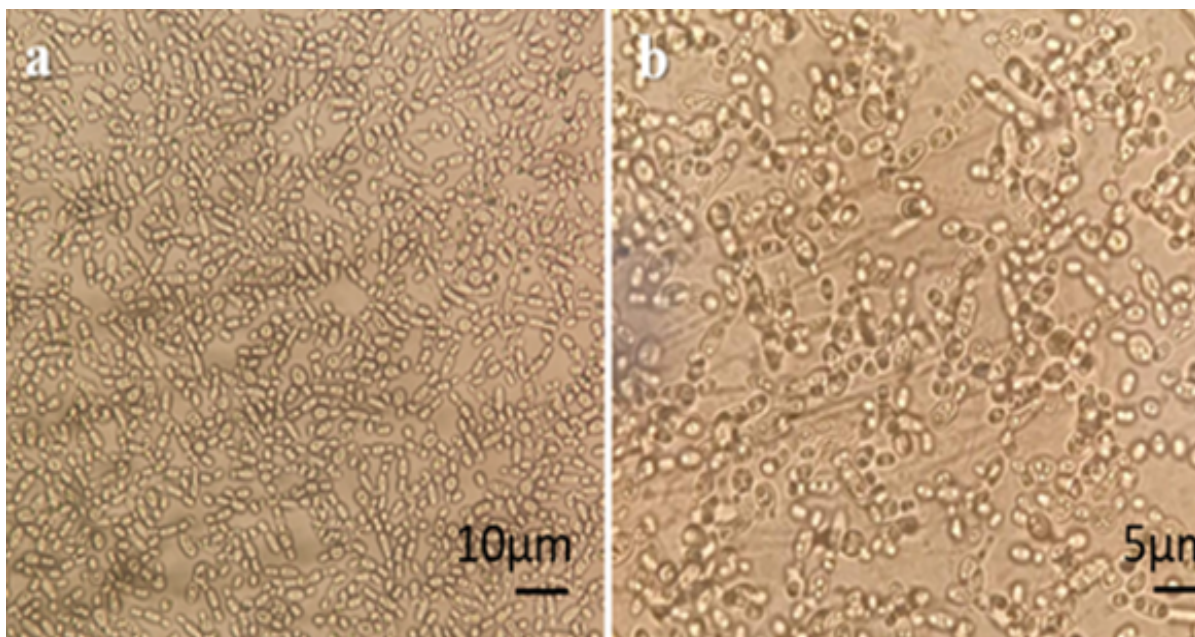


Figura 9 – Fotografia do microscópio das células de Rt. (a) Microscopia de aumento de 40 vezes logo após o cultivo. (b) Microscopia de aumento de 100 vezes mostrando detalhes do interior celular e o acúmulo de lipídios intracelular.

Fonte: A Autora (2024)

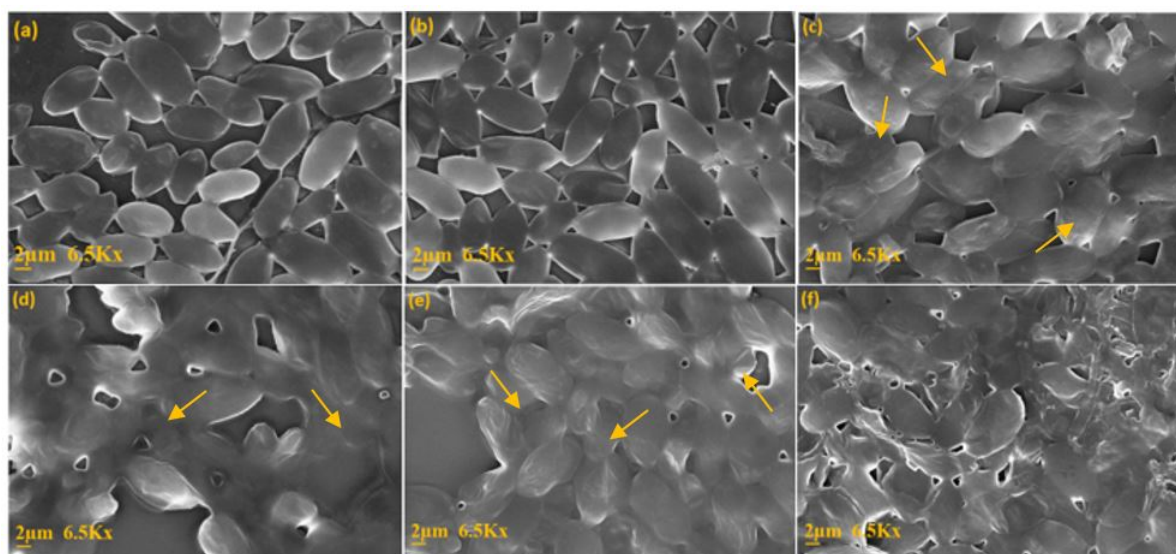


Figura 10 – MEV do *Rhodospiridium toruloides*. (a) Células de levedura logo após fermentação. (b) Célula de Rt com 24h da fermentação. (c) Rt com tratamento a plasma não-térmico por 5 min. (d) Rt com tratamento a plasma não-térmico por 10 min. (e) Rt com tratamento a plasma não-térmico por 20 min. (f) Rt com tratamento a plasma não-térmico por 30 min.

Fonte: A Autora (2024)

qual pode ser observado um aumento da destruição da parede celular caracterizado como lise causado pelo estresse produzido pelo plasma. A Figura 10(f) contém a fotomicrografia do Rt com tratamento a plasma não-térmico por 30 min, ocorre a liberação do conteúdo intracelular, incluindo organelas e moléculas como ácidos nucleicos e metabólitos.

A exposição das amostras ao plasma não térmico a partir de 5 min, representado na Figura 10(c), apresentou gradual rompimento de parede celular das leveduras durante os períodos de tempo testado no estudo, sendo que em 30 min, representado na Figura 10(f), observou-se a completa destruição da parede celular.

4.2.2 Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama (CG-FID)

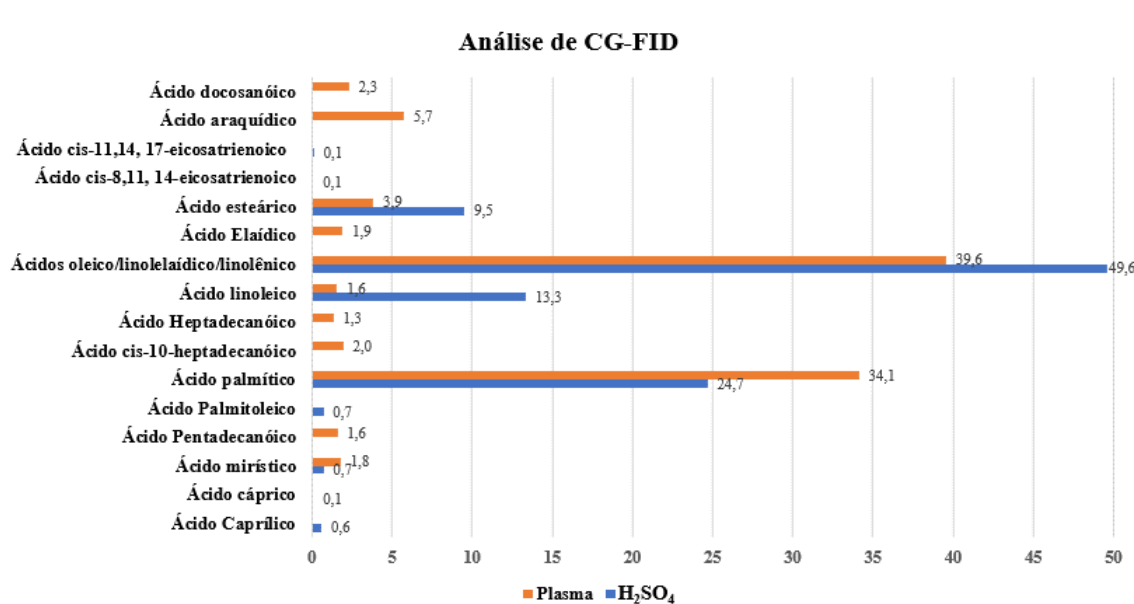


Figura 11 – Dados de CG-FID do óleo da levedura extraído via ácido sulfúrico. No eixo “x” está representada a quantidade de ácidos graxos em porcentagem, enquanto o eixo “y” lista os diferentes tipos de ácidos graxos analisados. A amostra “Plasma” é representada por barras laranjas e representa a amostra do bio óleo com tratamento de plasma, enquanto a amostra “H₂SO₄” é representada por barras azuis e representa a amostra do bio óleo com tratamento de ácido sulfúrico.

Fonte: A Autora (2024)

A Figura 11 contém os dados dos cromatogramas do óleo produzido pela levedura, com rompimento via ácido e via plasma, ambos extraído com solventes orgânicos. Os picos de separação cromatográfica foram identificados através do padrão FAME 37, disponível no Anexo C. Os cromatogramas e tabela de dados de ambas análises estão disponíveis nos Anexos A e B. A porcentagem na Figura 11 referente a amostra “H₂SO₄” é a média de duas amostras que foram analisadas no CG-FID.

É possível notar que há uma variação significativa na quantidade de alguns ácidos graxos entre as duas amostras, como é o caso dos ácidos caprílico e cáprico que estão com pequena porcentagem de 0,6% e 0,1% respectivamente na amostra “H₂SO₄”. O ácido araquídico e o ácido pentadecanoico não estão presentes no “H₂SO₄”, mas têm concentrações notáveis em “Plasma”.

Os ácidos oleico e seus derivados são os mais abundantes em ambas as amostras, apresentando uma concentração significativamente maior em “H₂SO₄” de 49,6% em

comparação ao “Plasma” com 39,6%. O ácido palmítico também mostra uma diferença notável entre as amostras, com “Plasma” possuindo uma quantidade superior 34,1% em relação ao 24,7% do “H₂SO₄”.

Comparando a quantidade de ácidos graxos presentes nas análises, observa-se que a análise do rompimento via plasma produz um número maior de espécies de ácidos, com 11 tipos diferentes, enquanto a análise do rompimento via ácido possui 10 tipos. No entanto, a diferença numérica é mínima, sendo de apenas uma unidade.

4.2.3 Espectroscopia (FTIR-ATR)

As características químicas dos óleos extraídos a partir do tratamento com plasma não térmico foram avaliadas por infravermelho com transformada de Fourier de reflexão total atenuada (FTIR-ATR). Os espectros observados na Figura 12 obtidos para cada óleo em seu tempo de exposição ao plasma não térmico.

A Figura 12 pode ser usada para confirmar as estruturas do óleo, no item seguinte de CG-FID será abordado a composição do mesmo. Levando em consideração o resultado do CG-FID junto com as bandas na região do infravermelho, é possível identificar a presença de óleo palmítico e oleico.

O espectro contém bandas características do ácido oleico e palmítico onde, são verificadas bandas na região de 1635 cm⁻¹ (estiramento =C-H), de 3410 até 2350 cm⁻¹ (estiramento O-H do ácido carboxílico) e em 1708 cm⁻¹ característica do estiramento simétrico da ligação carbonila (vibração C=O) de ácidos graxos, os quais confirmam que trabalhamos com o ácido oleico. Há ainda bandas em 2922 cm⁻¹, 1465 cm⁻¹ (C-H deformação angular) (SANTOS, 2023; RODRIGUES, 2022).

Durante o período de exposição do material ao plasma não térmico, não foram observadas alterações substanciais nas bandas espectrais nas análises de FTIR.

A Tabela 6 apresenta as bandas e atribuições de estiramentos e flexões observadas no espectro de infravermelho de uma amostra. As identificações das bandas são numeradas de 1 a 13, e cada entrada inclui a frequência da banda em cm⁻¹ e a respectiva atribuição. A banda identificada como 1, com frequência de 3410 cm⁻¹, é atribuída ao estiramento O-H. A banda 2, com 2922 cm⁻¹, corresponde à deformação angular C-H. A banda 3, com 2849 cm⁻¹, é atribuída ao estiramento simétrico do grupo C-H₂. A banda 4, com 1699 cm⁻¹, está relacionada ao estiramento assimétrico do grupo C=O. A banda 5, com 1464 cm⁻¹, refere-se à flexão assimétrica dos grupos de -CH₃. A banda 6, com 1419 cm⁻¹, corresponde ao alongamento C-H. A banda 7, com 1298 cm⁻¹, é atribuída ao estiramento do grupo C-O e vibração dentro do plano do grupo -OH. A banda 8, com 1259 cm⁻¹, está relacionada ao alongamento de C-H e O-H. A banda 9, com 1241 cm⁻¹, corresponde ao alongamento do grupo C-O. A banda 10, com 1033 cm⁻¹, é atribuída ao alongamento do

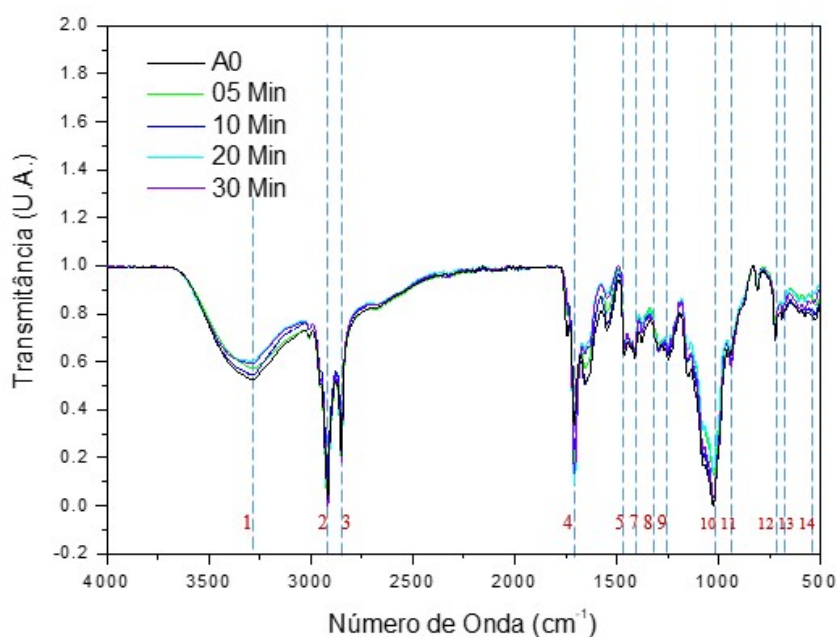


Figura 12 – Espectros do FTIR-ATR. A linha preta representa a amostra sem tratamento, logo após ser retirada do cultivo. A linha vermelha indica a amostra sem tratamento, que foi deixada em repouso por 24 horas após o cultivo, mantida sob refrigeração a uma temperatura de 10°C. A linha verde clara representa a amostra com o tratamento do plasma não-térmico com exposição de 5 minutos. A linha azul escuro representa a amostra com o tratamento do plasma não-térmico com exposição de 10 minutos. A linha azul clara representa a amostra com o tratamento do plasma não-térmico com exposição de 20 minutos. Por fim, a linha verde-escuro representa a amostra com o tratamento do plasma não-térmico com exposição de 30 minutos.

Fonte: A Autora (2024)

Tabela 6 – Bandas e atribuições de estiramentos e flexões.

| Identificação | Bandas (cm ⁻¹) | Atribuição |
|---------------|----------------------------|--|
| 1 | 3410 | Estiramento O-H |
| 2 | 2922 | Deformação angular C-H |
| 3 | 2849 | Estiramento simétrico de grupo C-H ₂ |
| 4 | 1699 | Estiramento assimétrico de grupo C=O |
| 5 | 1464 | Flexão assimétrica dos grupos de -CH ₃ |
| 6 | 1419 | Alongamento C-H |
| 7 | 1298 | Estiramento do grupo C-O e vibração dentro do plano do grupo -OH |
| 8 | 1259 | Alongamento de C-H e O-H |
| 9 | 1241 | Alongamento do grupo C-O |
| 10 | 1033 | Alongamento do grupo C-O |
| 11 | 939 | Flexão fora do plano do grupo C-O-H |
| 12 | 719 | Flexão do grupo -OH |
| 13 | 688 | Flexão do grupo -OH |

Fonte: Adaptado de [Stuart \(2004\)](#), [Ibarra et al. \(2015\)](#), [Krishna et al. \(2020\)](#).

grupo C-O. A banda 11, com 939 cm^{-1} , refere-se à flexão fora do plano do grupo C-O-H. A banda 12, com 719 cm^{-1} , está relacionada à flexão do grupo -OH, assim como a banda 13, com 688 cm^{-1} (IBARRA et al., 2015; KRISHNA et al., 2020; STUART, 2004).

4.3 Análise Tribológica

A análise do coeficiente de atrito ao longo de 300 segundos comparou quatro tipos de óleos: óleo de girassol comercial, óleo tratado com ácido, óleo tratado com plasma e metal-metal, conforme ilustrado na Figura 13. Os resultados revelaram que o óleo tratado com plasma apresentou o valor médio de 0,061 do coeficiente de atrito durante o período de teste, indicando sua superioridade na redução do atrito. Em contraste, o óleo de girassol comercial exibiu o valor médio de 0,077 do coeficiente de atrito, evidenciando sua menor eficácia, dentre as amostras de lubrificantes testados, na diminuição do atrito nas condições experimentais. Esses resultados são importantes para aplicações onde a redução do atrito é relevante, como em componentes mecânicos e sistemas de lubrificação de modo geral.

Tabela 7 – Coeficiente de atrito das amostras analisadas.

| Amostra | COF | Desvio Padrão |
|---------------|-------|---------------|
| Ácido 1 | 0,068 | 0,025 |
| Ácido 2 | 0,057 | 0,025 |
| Ácido 3 | 0,065 | 0,024 |
| Média | 0,063 | 0,025 |
| Plasma 1 | 0,059 | 0,028 |
| Plasma 2 | 0,059 | 0,024 |
| Plasma 3 | 0,066 | 0,022 |
| Média | 0,061 | 0,024 |
| Girassol 1 | 0,080 | 0,037 |
| Girassol 2 | 0,075 | 0,032 |
| Girassol 3 | 0,076 | 0,300 |
| Média | 0,077 | 0,123 |
| Metal/Metal 1 | 0,425 | 0,164 |
| Metal/Metal 2 | 0,460 | 0,170 |
| Metal/Metal 3 | 0,468 | 0,167 |
| Média | 0,451 | 0,167 |

Fonte: A Autora (2024)

A Tabela 7 fornece informações sobre o coeficiente de atrito (COF) médio e o desvio padrão de várias amostras, permitindo uma análise comparativa de suas propriedades. Na Tabela 7 contém uma comparação detalhada dos coeficientes de atrito (COF) médios e seus desvios padrão para as amostras que foram submetidas ao atrito, sendo elas: óleo tratado com ácido, óleo tratado com plasma, óleo de girassol comercial e uma amostra de contato metal/metal (o metal do par tribológico desta amostra é o aço 316L), seus

dados foram dispostos na Figura 13. Estes resultados são significativos para entender as propriedades tribológicas dos materiais e suas possíveis aplicações.

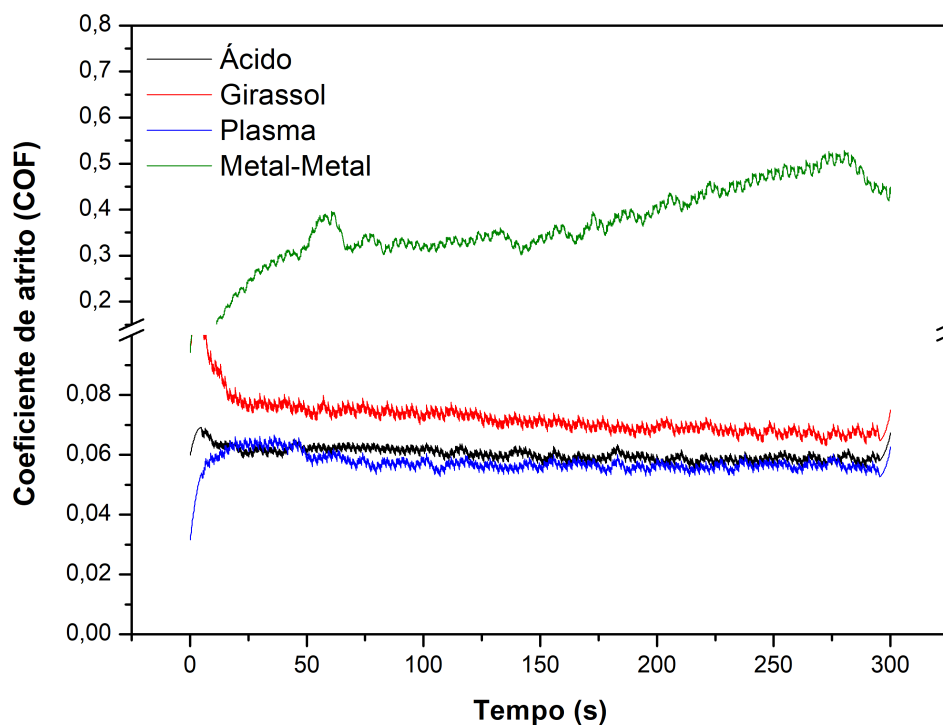


Figura 13 – Diferença entre os coeficientes de atrito. O coeficiente de atrito mais baixo é o da amostra “Plasma”, com valores entre 0,061 e 0,058. A amostra “Ácido” possui valor semelhante à amostra “Plasma” com pequena variação entre 0,068 e 0,057. O coeficiente com valor mais elevado, e conseqüentemente com maior atrito é da amostra “Metal-Metal” com valores entre 0,468 a 0,424.

Fonte: A Autora (2024)

As amostras de contato metal/metal, com esfera e placa de aço 316L, tiveram valores significativamente maiores do que os observados para as amostras com todos os óleos testados, indicando que o atrito é muito maior sem a presença de lubrificantes, isso ressalta a eficácia dos tratamentos com ácido e plasma na redução do atrito.

As amostras de óleo de girassol comercial mostraram uma variação significativamente maior nos resultados, especialmente a amostra “Girassol 3”, que apresentou um desvio padrão elevado de 0,300. Estes dados sugerem que o óleo de girassol é menos consistente em suas propriedades lubrificantes comparado aos óleos tratados com ácido e plasma.

As amostras de óleo tratado com ácido indicam uma consistência razoável entre as amostras, com uma ligeira variação. Essa amostra possui em maior porcentagem o ácido oleico na sua composição, portanto, os constituintes da estrutura molecular mantém uma camada lubrificante em contato com superfícies sujeitas a movimentos de

rolamento/deslizamento, causando assim uma redução considerável no coeficiente de atrito quando comparado a amostra de Metal/Metal (KAMARAPU et al., 2024). Na Tabela 7, a amostra "Ácido 2" exibiu o menor coeficiente de atrito, sugerindo uma melhor eficiência lubrificante entre as três.

As amostras de óleo tratadas com plasma mostraram consistência, com uma variação mínima em relação ao método convencional de rompimento. O ácido palmítico possui maior concentração, possivelmente indicando que é perceptível que com o tratamento com plasma não-térmico é possível obter uma eficiência para lubrificante melhor se comparada ao método convencional (via ácido), com um coeficiente de atrito ligeiramente menor, indicando uma potencial superioridade no desempenho tribológico.

Comparando os diferentes tratamentos, observa-se que tanto os óleos tratados com ácido quanto os tratados com plasma apresentam coeficientes de atrito mais baixos e consistentes, indicando boas propriedades lubrificantes. O óleo tratado com plasma, em particular, mostrou um desempenho ligeiramente melhor, com um COF médio de 0,061. O óleo de girassol comercial, embora efetivo, apresentou maior variabilidade nos resultados, sugerindo menor consistência. O contato metal/metal, como esperado, mostrou os maiores valores de atrito, destacando a importância dos lubrificantes para reduzir o desgaste e melhorar a eficiência em sistemas mecânicos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta dissertação revelou que o plasma não-térmico é uma técnica eficaz para o rompimento da parede celular do *Rt*, permitindo a extração de lipídios com uma eficiência considerável em comparação com métodos convencionais. Os principais resultados do projeto incluem a fermentação do *Rt*, a caracterização morfológica, a análise química e os resultados tribológicos das amostras tratadas.

Durante a fermentação do *Rt*, dados detalhados foram apresentados sobre o consumo de açúcar e o crescimento celular do microrganismo na produção de lipídios. Em duas fermentações distintas, a concentração de açúcar redutor iniciou em 20 g/L e 25 g/L, respectivamente, e diminuiu para cerca de 5 g/L em 120 horas. O crescimento celular mostrou um aumento inicial seguido por uma estabilização após 80 horas em ambos os casos. A densidade óptica (DO), indicativa da concentração celular, aumentou de 0,0230 para 0,3090 ao longo de 120 horas, e o crescimento celular ajustado (DO*FC) aumentou, indicando um crescimento celular durante o processo de fermentação.

A morfologia do *Rt* foi avaliada utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV), permitindo uma análise detalhada da estrutura celular antes e após o tratamento com plasma. As imagens mostraram que as células de *Rt* possuem paredes finas e formam longos metabásidios não septados, afilados apicalmente e com a ponta inflada. Foi observado um acúmulo intracelular de lipídios, uma característica importante desta levedura oleaginosa, que pode acumular lipídios em mais de 70% de sua massa seca. As imagens foram capturadas em diferentes ampliações, proporcionando uma análise detalhada do interior celular e do acúmulo de lipídios intracelulares.

A caracterização química dos lipídios foi realizada utilizando FTIR e CG-FID, confirmando não apenas o sucesso na extração dos lipídios, mas também a preservação das estruturas químicas de interesse, como o ácido palmítico e o ácido oleico.

Os resultados da análise tribológica, que investigou o desempenho de diferentes lubrificantes extraídos do *Rt*, mostraram os seguintes pontos principais: a configuração do teste foi realizada utilizando um par tribológico composto por uma esfera e uma placa de aço 316L, sob uma força normal de 5 N, durante 300 segundos, com uma trilha de deslizamento de 1 mm e frequência de 1 Hz, garantindo um contato constante e uniforme durante o teste. Os testes indicaram que o óleo obtido através do tratamento com plasma não térmico apresentou uma redução no coeficiente de atrito em comparação ao óleo extraído por métodos químicos, sugerindo que o tratamento com plasma melhora as propriedades lubrificantes do óleo. A análise demonstrou que os óleos extraídos, tanto pelo método convencional quanto pelo tratamento a plasma, têm potencial para serem

utilizados como lubrificantes, mas o óleo tratado com plasma se destacou por suas melhores propriedades tribológicas.

Em conclusão, esta dissertação reforça o potencial da biotecnologia na exploração de métodos não convencionais, como o plasma não-térmico, para o rompimento de paredes celulares em microrganismos oleaginosos. Isso representa um passo em direção à produção mais eficiente e ambientalmente sustentável de lipídios, essenciais para a indústria de biocombustíveis e outros setores bioquímicos, não apenas contribuindo para o avanço do conhecimento científico na área de engenharia biomédica, mas também destaca a importância de desenvolver tecnologias que aliam eficácia e sustentabilidade na obtenção de recursos.

REFERÊNCIAS

ALCANTARA, F.; CUNHA, M. A.; ALMEIDA, M. A. *Microbiologia: práticas laboratoriais*. 2ª. ed. Aveiro: Universidade de Aveiro, 2001. 297 p. Citado na página 21.

ALMEIDA, A. C. de P. L. *Estudo de temperaturas rotacional e vibracional das espécies excitadas produzidas por jatos de plasma frio em pressão atmosférica para aplicações biomédicas*. Dissertação (Dissertação (Mestrado em Física)) — Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2023. Citado na página 8.

ALVES, A. L. R. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia), *Extração de limoneno empregando técnicas sustentáveis*. Araraquara: [s.n.], 2022. Citado na página 9.

ALVES, M. F. et al. Composição de Ácidos graxos de biosurfactantes produzidos por fungos filamentosos. *Higiene Alimentar*, v. 33, n. 288/289, p. 530–534, Abril / Maio 2019. Citado na página 11.

BELUSSO, A. C. *Estudo da interação de líquidos iônicos com solventes orgânicos e água*. Tese (Tese (Doutorado em Engenharia Química)) — Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2022. Citado na página 9.

BERG, J. M. et al. *Bioquímica*. Estados Unidos: W.H. Freeman, 2002. v. 5. Citado na página 5.

BOUZON, Z. L.; GARGIONI, R.; OURIQUES, L. C. *Biologia Celular*. 2. ed. Florianópolis: Biologia/EAD/UFSC, 2010. Citado na página 2.

CASSA-BARBOSA, L. A. *Isolamento e caracterização de leveduras capazes de utilizar o hidrolisado hemicelulósico como fonte de carbono*. Tese (Tese (Doutorado em Biotecnologia)) — Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012. Citado na página 1.

CONCEIÇÃO, V. N. et al. Estudo do teste de scott via técnicas espectroscópicas: um método alternativo para diferenciar cloridrato de cocaína e seus adulterantes. *Química Nova*, v. 37, p. 1538–1544, 2014. Citado na página 21.

DAVID, L. N.; MICHAEL, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2022. 1248 p. Citado na página 1.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. *Microscopia Eletrônica De Varredura - Aplicações E Preparação de Amostras - Materiais Poliméricos, Metálicos e Semicondutores*. [S.l.]: Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP), 2007. Citado na página 20.

DORIA, A. C. O. C. et al. Application of post-discharge region of atmospheric pressure argon and air plasma jet in the contamination control of candida albicans biofilms. *Research On Biomedical Engineering*, v. 31, n. 4, p. 358–362, 2015. Citado na página 19.

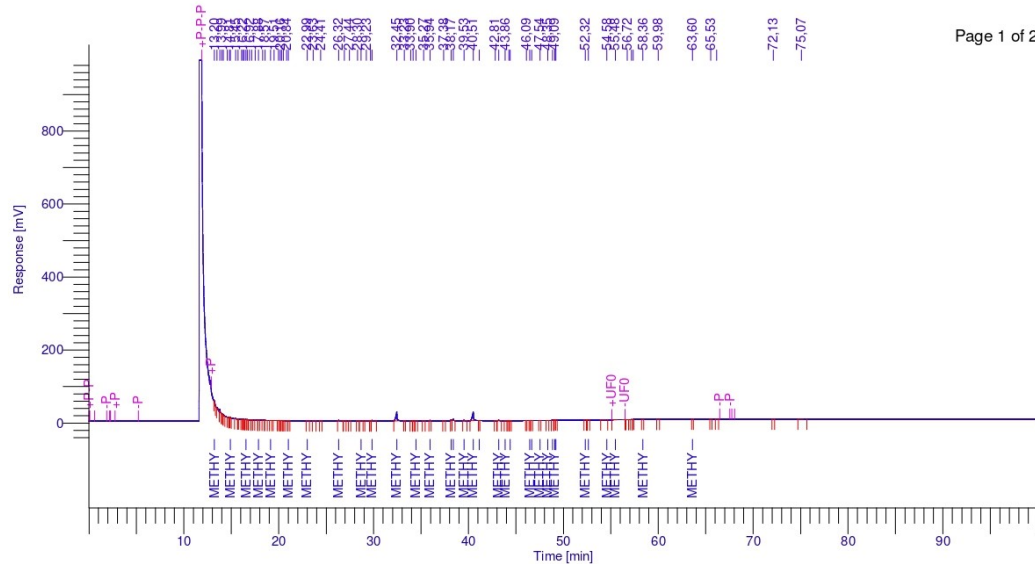
- FARIAS, T. L. S. *Desenvolvimento e Caracterização de Membranas de Poli (- Caprolactona) Eletrofiadas e Modificadas com Heparina e Ácidos Graxos Essenciais para Aplicação Biomédica*. Dissertação (Dissertação de Mestrado) — Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil, fevereiro 2021. Orientador: Prof. Dr. Marcos Marques da Silva Paula, Co-orientador: Prof. Dr. Walter Ricardo Brito. Citado 2 vezes nas páginas 1 e 9.
- GOMES, J. D. et al. *Pesquisas e Atualizações em Ciência dos Alimentos*. Jardim do Seridó, RN: Agroon Food Academy, 2022. Citado na página 5.
- IBARRA, J. et al. Synthesis and characterization of magnetite/plga/chitosan nanoparticles. *Materials Research Express*, v. 2, n. 9, p. 5–7, 2015. Citado 2 vezes nas páginas 30 e 31.
- KAMARAPU, S. K. et al. Tribological and vibration characteristics of the palm-mineral blend as a sustainable lubricant in steel-steel contacts. *Biomass Conversion and Biorefinery*, Springer, v. 14, p. 14107–14137, 2024. Citado na página 33.
- KRISHNA, Y. et al. Enhancing the thermal properties of organic phase change material (palmitic acid) by doping mxene nanoflakes. In: *AIP Conference Proceedings*. [S.l.: s.n.], 2020. v. 2233. Citado 2 vezes nas páginas 30 e 31.
- LEITE, L. F. Bacharelado (Engenharia Química), *Produção de Single-Cell-Oil em Batelada Alimentada*. 2019. Citado na página 14.
- LIMA, F. S. et al. Competitividade do biodiesel: Desafios e perspectivas na região matopiba. v. 28, n. 1, p. 208–230, 2024. Citado na página 1.
- MARTINS, M. Bacharelado (Engenharia de Minas), *Influência da Adição de Surfactante na Filtração de Rejeito Fosfático*. Araxá: [s.n.], 2017. Citado na página 18.
- MENDHAM, J. et al. *Vogel Análise Química Quantitativa*. 6. ed. [S.l.]: LTC, 2002. 488 p. Citado na página 22.
- MEROIÇO, N. L. C. *Extração de Lipídios da Microalga Tetrademus Obliquus*. Dissertação (Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos)) — Universidade Federal de Viçosa, 2023. Citado na página 9.
- MOLINARO, E. M. et al. *Conceitos e Métodos para Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde*. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2013. v. 3. 28–130 p. Citado na página 1.
- MUSSAGY, C. U. et al. Rhodotorula sp.-based biorefinery: a source of valuable biomolecules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 106, p. 7431–7447, 2022. Citado na página 7.
- NEHME, G. Tribological behavior and wear prediction of molybdenum disulfide grease lubricated rolling bearings under variable loads and speeds via experimental and statistical approach. *Wear*, p. 876–884, 2017. Citado na página 23.
- NICAUD, J.-M. et al. Protocols for monitoring growth and lipid accumulation in oleaginous yeasts. In: MCGENITY, T. et al. (Ed.). *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols*. [S.l.]: Springer Protocols Handbooks, 2017. p. 153–169. Citado 2 vezes nas páginas 6 e 7.

- NISHIME, T. M. C. et al. Non-thermal atmospheric pressure plasma jet applied to inactivation of different microorganisms. *Surface and Coatings Technology*, v. 312, p. 19–24, 2017. Citado 2 vezes nas páginas 2 e 8.
- OLIVEIRA, P. V. P.; DAMIANI, G. V. Tratamento da vinhaça de cana de açúcar com bacillus subtilis durante 72 horas. *Brazilian Journal of Development*, v. 10, p. 1012–1020, 2024. Citado na página 15.
- PAESE, L. T.; MARCZAK, L. D. F. Bacharelado (Engenharia Química), *Aumento da Vida de Prateleira de Leite de Castanha de Caju Através de Tratamento Térmico Convencional*. 2016. Citado na página 2.
- PANNINGOM, K. et al. Non-thermal plasma treatment diminishes fungal viability and up-regulates resistance genes in a plant host. *PLoS ONE*, v. 9, p. 12, 2014. Citado 2 vezes nas páginas 2 e 8.
- PARK, Y.-K.; NICAUD, J.-M.; LEDESMA-AMARO, R. The engineering potential of rhodosporidium toruloides as a workhorse for biotechnological applications. *Biotechnology*, v. 36, n. 3, p. 304–317, 2018. Citado na página 6.
- PASSOS, I. de A. G. *Influência da Aplicação do Plasma Não-Térmico na Resistência ao Cisalhamento de dois Sistemas Adesivos*. Dissertação (Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica)) — Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2018. Citado na página 2.
- PINA, C. P. *Estudo de Comparação das Tecnologias de Plasma Não-Térmico E Ozonização para a Remoção de Fármacos das Águas Residuais Através de Análise de Ciclo de Vida*. Dissertação (Dissertação (Mestrado em Engenharia Química e Bioquímica)) — Universidade Nova de Lisboa, 2022. Citado na página 8.
- PRADELLA, J. G. C. *Contribuição ao Estudo da Cinética do Crescimento Celular e Acúmulo de Lipídios Por Rhodoturula Gracilis*. Dissertação (Dissertação (Mestrado em Engenharia)) — UNICAMP, 1980. Citado 2 vezes nas páginas 13 e 18.
- RABELO, S. C.; PRADELLA, J. G. C.; IENCZAK, J. L. *Biotechnologia industrial*. [S.l.: s.n.], 2019. v. 3. 107–212 p. Citado 2 vezes nas páginas 7 e 8.
- RODRIGUES, J. D. O. *Poli(acil-uretanos) livres de isocianato e originadas de óleos vegetais*. Tese (Tese (Química)) — Universidade de Brasília, 2022. Citado 3 vezes nas páginas 5, 6 e 29.
- SANTANA, I. P. *Análise integrativa de dados de expressão gênica de Rhodosporidium toruloides em condições relevantes para a indústria biotecnológica*. Dissertação (Dissertação de Mestrado) — Universidade de São Paulo, 2022. Dissertação (Mestrado em ciência). Citado na página 26.
- SANTOS, R. F. *Desenvolvimento de Miniemulsões Com Ácido Oleico e Líquidos Iônicos Próticos Para Tratamento de Dermatofitoses*. Tese (Tese (Química)) — Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, 2023. Citado na página 29.
- SAYED-NOOR, A. S.; SJÖDÉN, G. O. Severe metallosis after total elbow arthroplasty—a case report. *HAND*, American Association for Hand Surgery, v. 5, n. 1, p. 86–89, 2010. Published online: 15 May 2009. Citado na página 10.

- SCHOLTZ, V. et al. Nonthermal plasma - a tool for decontamination and disinfection. *Biotechnology Advances*, v. 33, p. 1108–1119, 2015. Citado na página 8.
- SENE, A. et al. Tribocorrosion susceptibility and cell viability study of 316l stainless steel and ti6al4v titanium alloy with and without dlc coatings. *Coatings*, v. 13, n. 9, p. 1549, 2023. Citado na página 10.
- SOUTO, E. B. et al. Nanopartículas de lipídios sólidos: Métodos clássicos de produção laboratorial. *Química Nova*, v. 34, p. 1762–1769, 2011. Citado na página 5.
- STRYCZEWSKA, H. D. Supply systems of non-thermal plasma reactors. construction review with examples of applications. *Applied Sciences*, v. 10, p. 25, 2020. Citado na página 8.
- STUART, B. H. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2004. v. 1. 208 p. Citado 2 vezes nas páginas 30 e 31.
- TAJAU, R. et al. Emergence of polymeric material utilising sustainable radiation curable palm oil-based products for advanced technology applications. *Polymers*, v. 13, n. 1865, p. 22, 2021. Citado 2 vezes nas páginas 1 e 9.
- TEODORO, M. M. G. Monografia de Bacharelado, *Avaliação da Produção e Determinação do Perfil de Ácidos Graxos de Óleos Produzidos por Fungos Filamentosos*. Departamento de Química, Curso de Química Tecnológica: [s.n.], 2015. Citado na página 1.
- VIEIRA, J. P. F. *Biotransformação de carboidratos da cana-de-açúcar em lipídios e avaliação técnica-econômica*. Tese (Tese (Engenharia Química)) — Universidade Estadual de Campinas, 2016. Citado 2 vezes nas páginas 18 e 20.
- VYVER, A. V. de et al. Synovial fluid fatty acid profiles differ between osteoarthritis and healthy patients. *Journal of Biomaterials Applications*, SAGE Publications, v. 11, n. 4, p. 473–478, 2020. Citado 2 vezes nas páginas 9 e 10.
- WEN, Z. et al. *Rhodosporidium toruloides* - a potential red yeast chassis for lipids and beyond. *FEMS Yeast Research*, v. 20, n. 5, 2020. Citado 3 vezes nas páginas 1, 6 e 7.
- WHEELER, R. M. Bacharelado (Engenharia Ambiental e Sanitária), *Degradação de Glifosato em Água Utilizando Plasma Não-Térmico*. 2020. Citado na página 2.

Anexos

ANEXO A – CROMATOGRAMA E TABELA DA AMOSTRA VIA PLASMA



Page 1 of 2

Central Analítica - UNIVAP

Relatório de Cromatografia Gasosa - CG- FID Pekin Elmer Clarus 600

| Pico # | Tempo [min] | Area [µV·s] | Resultado [ug/mL] | Componentes # | Area [%] | Amount [%] |
|--------|-------------|-------------|-------------------|----------------------|----------|------------|
| 1 | 13,197 | 22803,02 | 3649,37 | METHYL BUTYRATE | 2,97 | 0,18 |
| 2 | 13,476 | 21784,78 | 1512,79 | | 2,84 | 0,00 |
| 3 | 13,801 | 30343,19 | 7749,44 | | 3,95 | 0,00 |
| 4 | 13,989 | 6441,31 | 850,15 | | 0,84 | 0,00 |
| 5 | 14,164 | 5410,92 | 939,26 | | 0,70 | 0,00 |
| 6 | 14,585 | 4239,81 | 628,06 | | 0,55 | 0,00 |
| 7 | 14,806 | 1623,49 | 537,09 | | 0,21 | 5e-05 |
| 8 | 14,898 | 4014,94 | 1064,40 | METHYL HEXANOATE | 0,52 | 0,00 |
| 9 | 15,452 | 6358,53 | 866,53 | | 0,83 | 0,00 |
| 10 | 15,711 | 194,46 | 76,05 | | 0,03 | 6e-06 |
| 11 | 16,080 | 5021,46 | 1150,51 | | 0,65 | 0,00 |
| 12 | 16,221 | 1289,67 | 345,73 | | 0,17 | 4e-05 |
| 13 | 16,353 | 1227,07 | 314,75 | | 0,16 | 4e-05 |
| 14 | 16,551 | 4425,99 | 910,49 | METHYL OCTANOATE | 0,58 | 0,19 |
| 15 | 16,689 | 2762,36 | 636,61 | | 0,36 | 8e-05 |
| 16 | 16,920 | 3210,29 | 437,24 | | 0,42 | 1e-04 |
| 17 | 17,150 | 2444,39 | 494,46 | | 0,32 | 7e-05 |
| 18 | 17,522 | 897,81 | 166,13 | | 0,12 | 3e-05 |
| 19 | 17,875 | 1165,53 | 207,42 | METHYL DECANOATE | 0,15 | 0,17 |
| 20 | 18,309 | 846,37 | 114,45 | | 0,11 | 3e-05 |
| 21 | 18,569 | 682,58 | 109,16 | | 0,09 | 2e-05 |
| 22 | 19,130 | 1068,69 | 160,43 | METHYL UNDECANOATE | 0,14 | 0,07 |
| 23 | 19,513 | 1144,05 | 93,52 | | 0,15 | 3e-05 |
| 24 | 19,959 | 801,70 | 144,25 | | 0,10 | 2e-05 |
| 25 | 20,159 | 607,12 | 126,33 | | 0,08 | 2e-05 |
| 26 | 20,304 | 390,97 | 66,13 | | 0,05 | 1e-05 |
| 27 | 20,483 | 186,23 | 50,06 | | 0,02 | 6e-06 |
| 28 | 20,836 | 886,25 | 135,08 | | 0,12 | 3e-05 |
| 29 | 21,013 | 930,04 | 171,43 | METHYL DODECANOATE | 0,12 | 0,09 |
| 30 | 22,994 | 2332,55 | 464,04 | METHYL TRIDECANOATE | 0,30 | 0,27 |
| 31 | 23,631 | 830,41 | 75,10 | | 0,11 | 3e-05 |
| 32 | 24,413 | 729,41 | 120,76 | | 0,09 | 2e-05 |
| 33 | 26,321 | 13579,69 | 2142,04 | METHYL MYRISTATE | 1,77 | 1,85 |
| 34 | 26,911 | 615,07 | 84,51 | | 0,08 | 2e-05 |
| 35 | 27,435 | 496,65 | 75,99 | | 0,06 | 1e-05 |
| 36 | 28,304 | 745,77 | 90,51 | | 0,10 | 2e-05 |
| 37 | 28,682 | 1645,79 | 229,79 | METHYL MYRISTOLEATE | 0,21 | 0,24 |
| 38 | 29,231 | 1357,92 | 117,52 | | 0,18 | 4e-05 |
| 39 | 29,675 | 234,23 | 56,72 | | 0,03 | 7e-06 |
| 40 | 29,831 | 11936,74 | 1940,24 | METHYL PENTADECANOAT | 1,55 | 1,60 |

16/7/2024 16:16:15 Result:

| Pico # | Tempo [min] | Area [μ V·s] | Resultado [ug/mL] | Componentes # | Area [%] | Amount [%] |
|--------|-------------|-------------------|-------------------|----------------------|----------|------------|
| - | 31,807 | 0,00 | 0,00 | METHYL CIS-10 PENTAD | 0,00 | 0,00 |
| 41 | 32,450 | 248791,86 | 25006,56 | METHYL PALMITATE | 32,40 | 34,06 |
| 42 | 33,227 | 637,76 | 121,34 | | 0,08 | 2e-05 |
| 43 | 33,899 | 678,26 | 99,49 | | 0,09 | 2e-05 |
| 44 | 34,155 | 319,33 | 79,52 | | 0,04 | 1e-05 |
| 45 | 34,468 | 2550,94 | 494,11 | METHYL PALMITOLATE | 0,33 | 0,42 |
| 46 | 35,275 | 1008,15 | 149,72 | | 0,13 | 3e-05 |
| 47 | 35,940 | 7581,27 | 1516,58 | METHYL HEPTADECANOAT | 0,99 | 1,34 |
| 48 | 37,377 | 442,05 | 68,98 | | 0,06 | 1e-05 |
| 49 | 38,172 | 11671,43 | 2284,54 | METHYL CIS-10 HEPTAD | 1,52 | 1,97 |
| 50 | 38,410 | 22096,84 | 3558,68 | METHYL STEARATE | 2,88 | 3,86 |
| 51 | 39,526 | 10280,27 | 1567,44 | METHYL TRANS-9 ELADI | 1,34 | 1,93 |
| 52 | 40,508 | 250026,63 | 24035,39 | METHYL CIS-9 OLEATE | 32,56 | 39,69 |
| 53 | 41,125 | 398,81 | 102,62 | METHYL LINOLELAIDATE | 0,05 | 0,07 |
| 54 | 42,809 | 568,15 | 92,35 | | 0,07 | 2e-05 |
| 55 | 43,184 | 9934,13 | 1684,43 | METHYL LINOLEATE | 1,29 | 1,57 |
| 56 | 43,857 | 1167,63 | 187,24 | METHYL ARACHIDATE | 0,15 | 5,76 |
| 57 | 44,251 | 225,74 | 47,91 | | 0,03 | 7e-06 |
| 58 | 44,391 | 342,53 | 60,78 | METHYL-GAMMA-LINOLEN | 0,04 | 0,03 |
| 59 | 46,091 | 161,53 | 37,00 | | 0,02 | 5e-06 |
| 60 | 46,454 | 198,03 | 45,20 | METHYL CIS-11 EICOSE | 0,03 | 0,03 |
| 61 | 46,655 | 272,36 | 48,01 | METHYL LINOLENATE | 0,04 | 0,06 |
| 62 | 47,537 | 436,62 | 58,93 | METHYL HENEICOSANOAT | 0,06 | 0,06 |
| 63 | 48,346 | 1068,87 | 167,89 | METHYL CIS-11,14-EIC | 0,14 | 0,18 |
| 64 | 48,866 | 6634,37 | 1060,47 | METHYL BEHENATE | 0,86 | 2,33 |
| 65 | 49,092 | 6509,37 | 1021,72 | METHYL CIS-8,11,14 E | 0,85 | 0,66 |
| 66 | 49,210 | 3653,68 | 773,44 | METHYL ERUCATE | 0,48 | 0,57 |
| - | 51,844 | 0,00 | 0,00 | METHYL CIS-11,14,17 | 0,00 | 0,00 |
| 67 | 52,319 | 1369,44 | 238,37 | METHYL TRICOSANOATE | 0,18 | 0,21 |
| 68 | 52,626 | 746,06 | 106,40 | METHYL ARACHIDONATE | 0,10 | 2e-05 |
| - | 52,872 | 0,00 | 0,00 | METHYL CIS-13,16 DOC | 0,00 | 0,00 |
| 69 | 54,583 | 896,07 | 50,21 | METHYL LIGNOCERATE | 0,12 | 0,32 |
| 70 | 55,476 | 246,71 | 129,29 | METHYL CIS-5,8,11,14 | 0,03 | 0,03 |
| 71 | 56,720 | 523,01 | 59,22 | | 0,07 | 2e-05 |
| 72 | 57,163 | 556,78 | 87,18 | | 0,07 | 2e-05 |
| 73 | 57,347 | 445,50 | 87,20 | | 0,06 | 1e-05 |
| 74 | 58,362 | 728,21 | 111,43 | METHYL NERVONATE | 0,09 | 0,14 |
| 75 | 59,984 | 1045,47 | 135,48 | | 0,14 | 3e-05 |
| 76 | 63,604 | 401,70 | 65,80 | METHYL CIS-4,7,10,13 | 0,05 | 0,07 |
| 77 | 65,526 | 391,13 | 58,26 | | 0,05 | 1e-05 |
| 78 | 66,151 | 1140,12 | 133,56 | | 0,15 | 3e-05 |
| 79 | 72,126 | 549,89 | 64,51 | | 0,07 | 2e-05 |
| 80 | 75,075 | 3453,29 | 151,85 | | 0,45 | 0,00 |
| | | 767857,27 | 94953,67 | | 100,00 | 100,00 |

Central Analítica - IP&D/UNIVAP/FVE

ANEXO B – CROMATOGRAMA E TABELA DA AMOSTRA VIA ÁCIDO

Page 1 of 1

Software Version : 6.3.2.0646
 Sample Name : 1 amostra
 Instrument Name : Clarus
 Rack/Vial : 0/0
 Sample Amount : 1.000000
 Cycle : 2

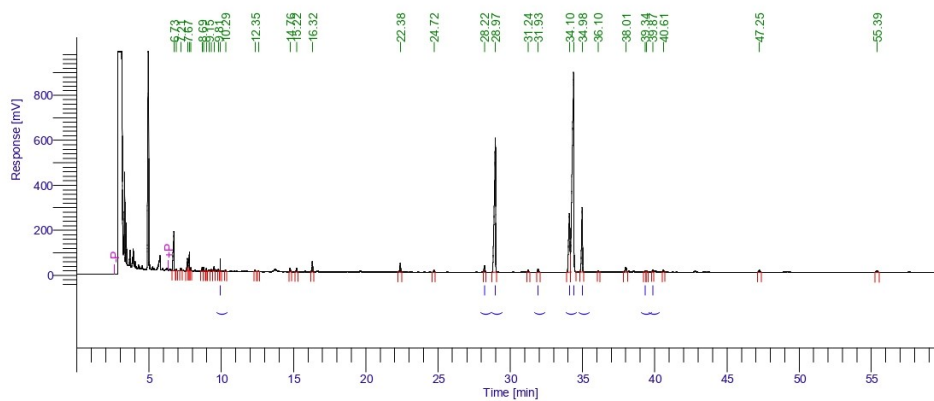
Date : 11/10/2023 3:20:53 PM
 Data Acquisition Time : 11/3/2010 4:30:44 AM
 Channel : A
 Operator : manager
 Dilution Factor : 1.000000

Amostra1_2.rst

Result File : e:\20231108 - perfil lipidico joséAugusto\20231110 - amostras reprocessadas\30_10_2023 amostra2_2.rst
 Sequence File : C:\PenExe\TcWS\Ver6.3.2\Sequencias_-03_11_2010-201011103-040448.seq

Sample Notes:

Esteres Metilicos - Splitb 9:1



Perfil de Ácidos Graxos

Perfil de ácidos graxos - Padrão FAME 37

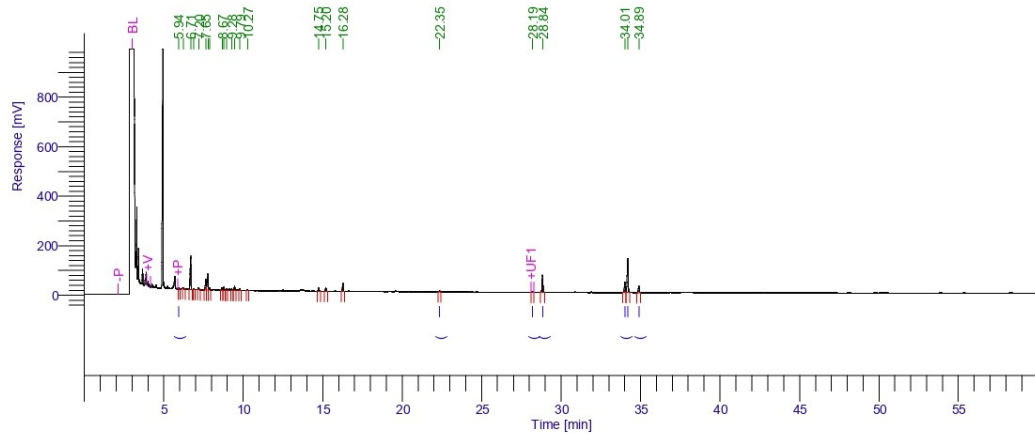
| Peak # | Nomo do Componente | Tempo [min] | Area [uV*sec] | Area [%] |
|--------|---------------------------------|-------------|---------------|----------|
| 14 | (C10:0) Capric Acid | 9.938 | 27311.77 | 0.20 |
| 23 | (C16:1) Palmitoleic Acid Methyl | 28.223 | 119858.23 | 0.86 |
| 24 | (C16:0) Palmitic Acid Methyl E | 28.970 | 3638738.23 | 26.13 |
| 26 | (C17:0) Heptadecanoic Acid Met | 31.932 | 67662.59 | 0.49 |
| 27 | (C18:2n6c) Linoleic Acid Methyl | 34.096 | 1716153.56 | 12.33 |
| 28 | (C18:1n9t) Elaidic Acid Methyl | 34.386 | 6851731.50 | 49.21 |
| 29 | (C18:0) Stearic Acid Methyl Es | 34.985 | 1437368.90 | 10.32 |
| 32 | (C20:3n6)cis-8,11,14-Eicosatri | 39.339 | 27788.98 | 0.20 |
| 34 | (C20:3n3) cis-11,14,17-Eicosat | 39.873 | 36846.90 | 0.26 |
| | | | 13923460.65 | 100.00 |

EEL-USP-Lorena

Software Version : 6.3.2.0646
 Sample Name : 2 amostra
 Instrument Name : Clarus
 Rack/Vial : 0/0
 Sample Amount : 1.000000
 Cycle : 3

Date : 11/10/2023 3:38:48 PM
 Data Acquisition Time : 11/3/2010 6:36:55 AM
 Channel : A
 Operator : manager
 Dilution Factor : 1.000000

Result File : e:\20231108 - perfil lipidico José Augusto,20231110 - amostras reprocessadas\30_10_2023 amostra2_2.rst
 Sequence File : C:\PenExe\TcW\SI\Ver6.3.2\Sequencias_-03_11_2010-20101103-040448.seq
 Sample Notes:
 Esteres Metilicos - Splitb 9:1



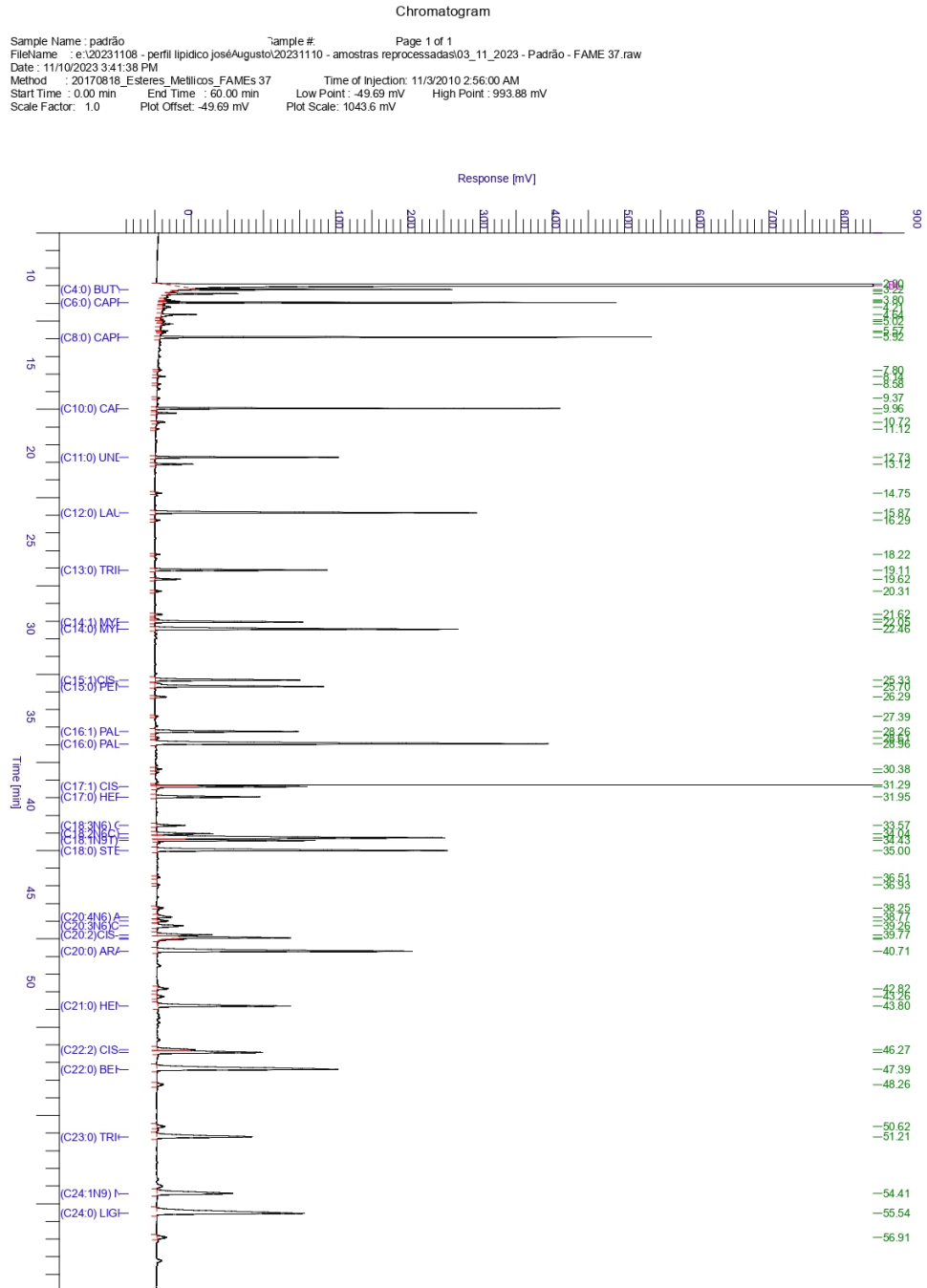
Perfil de Ácidos Graxos

Perfil de ácidos graxos - Padrão FAME 37

| Peak # | Nomo do Componente | Tempo [min] | Area [uV*sec] | Area [%] |
|--------|--------------------------------|-------------|---------------|-----------------------------------|
| 1 | (C8:0) Caprylic Acid | 5.942 | 15147.86 | 1.20 |
| 19 | (C14:0) Myristic Acid Methyl E | 22.350 | 18271.13 | 1.45 |
| 20 | (C16:1) Palmitoleic Acid Methy | 28.192 | 7127.07 | 0.57 |
| 21 | (C16:0) Palmitic Acid Methyl E | 28.835 | 292813.63 | 23.21 |
| 22 | (C18:2n6c) Linoleic Acid Methy | 34.008 | 187107.87 | 14.83 |
| 23 | (C18:3n3) alfa-Linolenic Acid | 34.195 | 630643.68 | 49.99 |
| 24 | (C18:0) Stearic Acid Methyl Es | 34.890 | 110311.02 | 8.74 |
| | | | | Oleic/linoleaidic/linolenic Acids |
| | | | 1261422.26 | 100.00 |

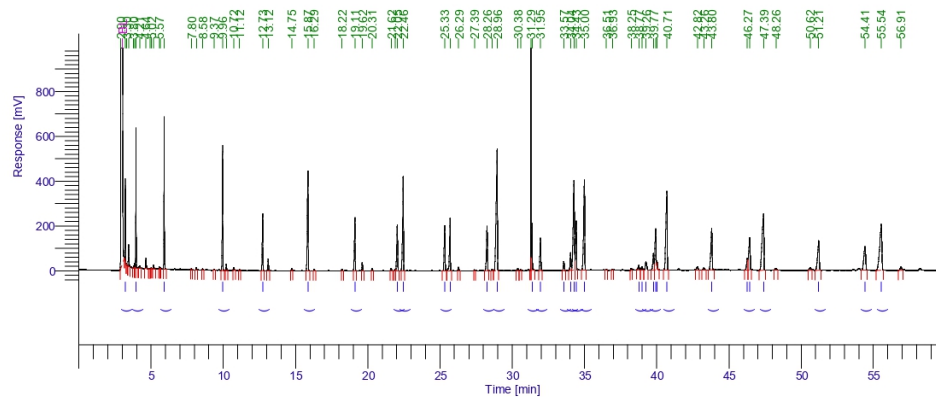
EEL-USP-Lorena

ANEXO C – CROMATOGRAMA E TABELA DO PARÃO FAME 37



Software Version : 6.3.2.0646 Date : 11/10/2023 3:41:34 PM
 Sample Name : padrão Data Acquisition Time : 11/3/2010 2:56:00 AM
 Instrument Name : Clarus Channel : A
 Rack/Vial : 0/0 Operator : manager
 Sample Amount : 1.000000 Dilution Factor : 1.000000
 Cycle : 1

Result File : e:\20231108 - perfil lipidico José Augusto 2023 1110 - amostras reprocessadas\03_11_2023 - padrão - fame 37.rst
 Sequence File : C:\PenExe\TcWS\Ver6.3.2\Sequencias_-03_11_2010.seq
 Sample Notes:
 Esteres Metilicos - Splitb 9:1



Perfil de Ácidos Graxos

Perfil de ácidos graxos - Padrão FAME 37

| Peak # | Nomo do Componente | Tempo [min] | Area [uV*sec] | Area [%] |
|--------|---------------------------------|-------------|---------------|----------|
| 2 | (C4:0) Butyric Acid | 3.219 | 850624.69 | 2.21 |
| 7 | (C6:0) Caproic Acid | 3.956 | 1290551.42 | 3.35 |
| 15 | (C8:0) Caprylic Acid | 5.917 | 1619007.16 | 4.20 |
| 20 | (C10:0) Capric Acid | 9.963 | 1745980.04 | 4.53 |
| 24 | (C11:0) Undecanoic Acid | 12.727 | 867303.60 | 2.25 |
| 27 | (C12:0) Lauric Acid | 15.866 | 1873205.16 | 4.86 |
| 30 | (C13:0) Tridecanoic Acid | 19.110 | 935346.66 | 2.43 |
| 35 | (C14:1) Myristoleic Acid Methyl | 22.047 | 871145.03 | 2.26 |
| 36 | (C14:0) Myristic Acid Methyl E | 22.459 | 1978511.22 | 5.14 |
| 37 | (C15:1)cis-10-Pentadecanoic Ac | 25.335 | 884648.86 | 2.30 |
| 38 | (C15:0) Pentadecanoic Acid Met | 25.699 | 1046515.92 | 2.72 |
| 41 | (C16:1) Palmitoleic Acid Methyl | 28.255 | 886804.41 | 2.30 |
| 43 | (C16:0) Palmitic Acid Methyl E | 28.955 | 3126563.03 | 8.12 |
| 47 | (C17:1) cis-10-Heptadecanoic A | 31.372 | 915853.87 | 2.38 |
| 48 | (C17:0) Heptadecanoic Acid Met | 31.953 | 633118.79 | 1.64 |
| 49 | (C18:3n6) Gama-Linolenic Acid | 33.572 | 177754.46 | 0.46 |
| 50 | (C18:2n6c) Linoleic Acid Methyl | 34.044 | 371060.33 | 0.96 |
| 51 | (C18:1n9c) Oleic Acid Methyl E | 34.277 | 2554973.76 | 6.63 |
| 52 | (C18:1n9t) Elaidic Acid Methyl | 34.428 | 928725.97 | 2.41 |
| 53 | (C18:0) Stearic Acid Methyl Es | 34.999 | 2215129.24 | 5.75 |
| 57 | (C20:4n6) Arachidonic Acid Met | 38.766 | 115365.15 | 0.30 |
| 58 | (C20:5n3)cis-5,8,11,14,17-Eico | 38.974 | 83079.31 | 0.22 |
| 59 | (C20:3n6)cis-8,11,14-Eicosatri | 39.257 | 237325.19 | 0.62 |
| 60 | (C20:2)cis-11,14-Eicosadienoic | 39.774 | 382465.15 | 0.99 |
| 61 | (C20:3n3) cis-11,14,17-Eicosat | 39.932 | 1025170.09 | 2.66 |
| 62 | (C20:1n9) cis-11-Eicosenoic | 40.020 | 92110.00 | 0.24 |
| 63 | (C20:0) Arachidic Acid Methyl | 40.706 | 2208291.19 | 5.73 |
| 66 | (C21:0) Heneicosanoic | 43.803 | 1084133.21 | 2.81 |
| 67 | (C22:2) cis-13,16-Docosadieno | 46.273 | 317986.95 | 0.83 |
| 68 | (C22:1n9) Erucic Acid Methyl E | 46.435 | 909883.31 | 2.47 |
| 69 | (C22:0) Behenic Acid Methyl Es | 47.393 | 2155873.24 | 5.60 |
| 72 | (C23:0) Tricosanoic Acid Methyl | 51.208 | 1067003.94 | 2.77 |
| 73 | (C24:1n9) Nervonic Acid Methyl | 54.415 | 901429.35 | 2.34 |
| 74 | (C24:0) Lignoceric Acid Methyl | 55.541 | 2092325.29 | 5.43 |

This document was created by an application that isn't licensed to use [novaPDF](#).

Purchase a license to generate PDF files without this notice.

38526264.99 100.00

11/10/2023 3:41:34 PM Result: e:\20231108 - perfil lipidico JoséAugusto\20231110 - amostras reprocessadas\03_11_2023 - padrão - fame 37.rst

Page 2 of 2

| Peak # | Nomo do Componente | Tempo [min] | Area [uV*sec] | Area [%] |
|--------|---------------------------------|-------------|---------------|----------|
| 69 | (C22:0) Behenic Acid Methyl Es | 47.393 | 2155873.24 | 5.60 |
| 72 | (C23:0) Tricosanoic Acid Methyl | 51.208 | 1067003.94 | 2.77 |
| 73 | (C24:1n9) Nervonic Acid Methyl | 54.415 | 901429.35 | 2.34 |
| 74 | (C24:0) Lignoceric Acid Methyl | 55.541 | 2092325.29 | 5.43 |
| | | | 38526264.99 | 100.00 |

Warning -- Signal level out-of-range in peak

EEL-USP-Lorena