

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

ALINE DA SILVA DELABIO

**Efeitos de baixas doses de radiação gama no crescimento e na síntese
lipídica de *Yarrowia lipolytica***

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Piracicaba

2016

ALINE DA SILVA DELABIO

**Efeitos de baixas doses de radiação gama no crescimento e na síntese
lipídica de *Yarrowia lipolytica***

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

**Dissertação apresentada ao Centro de Energia
Nuclear na Agricultura da Universidade de São
Paulo para a obtenção do título de Mestre em
Ciências**

**Área de Concentração: Energia Nuclear na
Agricultura e no Ambiente**

Orientador: Prof. Dr. Valter Arthur

Piracicaba

2016

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Delabio, Aline da Silva

Efeitos de baixas doses de radiação gama no crescimento e na síntese lipídica de *Yarrowia lipolytica* / Aline da Silva Delabio; orientador Valter Arthur. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

83 p. : il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Biomassa 2. Cobalto 60 3. Leveduras 4. Lipídeos 5. Radiação ionizante
I. Título

CDU 54-78 : 663.12

DEDICATÓRIA

*A minha família, em especial a minha mãe Evanilde e minha irmã Amanda, por todo amor,
carinho e compreensão durante toda minha vida acadêmica;
E ao meu noivo Felipe, por estar sempre presente, me ajudando, por todo amor e paciência, e
pelo incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho,*

dedico e ofereço

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida, por me dar fé e coragem para sempre seguir em frente, e nunca desistir;

Ao professor Dr. Valter Arthur pela paciência e orientação, e principalmente pelos valiosos ensinamentos acadêmicos;

À minha família por todo amor e incentivo: Evanilde, Amanda, Vilma, e minha querida avó (*in memoriam*).

Ao meu noivo Felipe Joia, pela compreensão e apoio desde sempre.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) pela oportunidade em desenvolver esse trabalho.

Ao Laboratório de Radiobiologia e Ambiente, em especial aos meus amigos, Juliana, Dâmaris, Gianni, Diogo e André, pela amizade, companheirismo e apoio durante a execução do trabalho.

À professora Dr^a Márcia Nalesso Costa Harder, pela disposição e empenho em ajudar; e principalmente, pela sincera amizade.

Ao professor Dr. Luis Fernando Sanglade Marchiori, pela doação da vinhaça e do xarope de cana, utilizados nesse trabalho.

À professora Dra. Regina Teresa Rosim Monteiro por todo ensinamento e atenção durante o estágio realizado no laboratório de Ecologia Aplicada.

Ao meu amigo Gleison, sempre de bom humor contagiando todos a sua volta.

À minha amiga Carina Nazato, pela amizade, pelo apoio e pelas longas conversas a caminho do Cena.

A Faculdade de Tecnologia de Piracicaba “Deputado Roque Trevisan”, em especial as professoras: Dr^a Érika Gutierrez e Dr^a Daniela Defavari do Nascimento, e à técnica Fernanda Neme pela prontidão e ajuda sempre que necessário.

Aos funcionários da pós-graduação pelos serviços prestados ao longo desses anos.

À bibliotecária Marília por toda a gentileza prestada na correção do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa concedida.

E á todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

MUITO OBRIGADA!!

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

DELABIO, A. S. **Efeitos de baixas doses de radiação gama no crescimento e na síntese lipídica de *Yarrowia lipolytica***. 2016. 83 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

Os lipídios microbianos apresentam composição similar aos óleos vegetais, e tem despertado o interesse de muitos pesquisadores, uma vez que podem suprir a demanda por óleos e gorduras. Além disso, estudos demonstram que ao submeter um microrganismo a baixas doses de radiação gama, estímulos são promovidos, podendo aumentar a função, a resistência celular, e o crescimento. Objetivou-se com esse estudo: avaliar os efeitos de baixas doses de radiação gama no crescimento e na síntese lipídica de *Yarrowia lipolytica*. A levedura foi submetida às doses de: (controle) 0,3; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 e 2,5 kGy de radiação gama, sob taxa de dose de 0,259 kGy/h. Foi utilizada câmara de Neubauer para determinação da viabilidade celular da levedura. Uma curva de crescimento e outra de sobrevivência foi determinada por densidade óptica em um espectrofotômetro. Posteriormente, a levedura foi inoculada em meio composto por xarope de cana-de-açúcar e vinhaça, e incubada por 7, 14 e 21 dias para a obtenção da biomassa seca, por liofilização, e da síntese lipídica, por metodologia de extração. A irradiação não interferiu na produção de biomassa seca, no crescimento e na sobrevivência da levedura *Y. lipolytica*. O período de incubação afetou a produção final de biomassa, sendo a maior produção obtida no 14º dia (13,46 g/L). Para os resultados de síntese lipídica, observou-se interferência na produção final, durante 21 dias de incubação e dose de 0,5 kGy, com produção de 4,17 g/L (34,94%). Conclui-se que não foi observado o efeito hormético durante as análises de crescimento, sobrevivência e produção de biomassa, quando submetidas às doses de radiação. Este efeito foi observado apenas durante a síntese lipídica, quando avaliadas as junções entre dose de radiação e período de incubação.

Palavras-chave: *Yarrowia lipolytica*. Biomassa. Rendimento Lipídico. Co-60. Radio-hormesis.

ABSTRACT

DELABIO, A. S. **Effect of low doses of gamma radiation on the growth and lipid synthesis of *Yarrowia lipolytica***. 2016. 83 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

Microbial lipids present similar composition to vegetable oils and has aroused great interest among researchers. In addition, studies show that by submitting a microorganism to low doses of gamma radiation, stimuli are promoted, which could increase the function, cell resistance, and the growth. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of low doses of gamma radiation on the growth and lipid synthesis of *Yarrowia lipolytica*. The yeast received irradiation doses of: (control); 0.3; 0.5; 0.75; 1.0; 1.25 and 2.5 kGy gamma radiation dose rate in 0.259 kGy/h. Neubauer Chamber was used to analyze cell viability of the yeast. A growth curve and survival curve was determined by spectrophotometry. Then, the yeast was inoculated in the medium composed of syrup sugarcane and vinasse and incubated for 7, 14 and 21 days for the obtaining of dry biomass, by lyophilization, and lipid synthesis, by extraction methodology. The low doses of irradiation had no effect on the growth, survival, and production of dry biomass of *Y. lipolytica*. For the incubation periods, there was interference in the final production; the highest production was obtained on day 14 (13.46 g/L). The results for lipid synthesis revealed interference with the final production of lipids, being better at a dose of 0.5 kGy to 21 days incubation with yield of 4.17 g/L (34.94%). In conclusion, the low doses of irradiation had no effect on the growth, survival and biomass production of *Y. lipolytica*. Hormetic effect was observed only in the lipid synthesis, when the radiation dose was associated with the incubation time.

Keywords: *Yarrowia lipolytica*. Biomass. Lipid Yield. Co-60. Radiation hormesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema das formas de dose resposta hormética	41
Figura 2- Fonte de Cobalto-60, tipo Gammacell-220	47
Figura 3- Fonte de Cobalto-60, tipo Gammacell-220	47
Figura 4- Microscopia da levedura <i>Y. lipolytica</i>	48
Figura 5- Imagem ilustrativa da câmara de Neubauer.....	48
Figura 6- Cultivo da levedura <i>Y. lipolytica</i> em frascos agitados.....	50
Figura 7- Espectofotômetro <i>Thermo Genesys 10 UV</i> utilizado nas análises de curva de crescimento e de sobrevivência	50
Figura 8- Espectofotômetro <i>Thermo Genesys 10 UV</i> utilizado nas análises de curva de crescimento e de sobrevivência	50
Figura 9- Biomassa seca da levedura utilizada para a extração dos lipídios	52
Figura 10- Extração lipídica: amostra filtrada para a separação dos sólidos presentes.....	52
Figura 11- Amostras após centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos para separação de fases	53
Figura 12- Amostras após centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos para separação de fases	53
Figura 13- Relação da viabilidade celular (%) versus doses de radiação (kGy) para a levedura <i>Y. lipolytica</i>	56
Figura 14- Relação do número de células/mL versus doses de radiação (kGy) para a levedura <i>Y. lipolytica</i>	56
Figura 15- Microscopia da levedura <i>Y. lipolytica</i> (controle) visualizada em microscópio biológico trinocular (NOVA 180 iPL).....	58
Figura 16- Microscopia da levedura <i>Y. lipolytica</i> (controle) visualizada em microscópio biológico trinocular (NOVA 180 iPL).....	58
Figura 17- Microscopia da levedura <i>Y. lipolytica</i> (0,3 kGy) visualizada em microscópio <i>Olympus BX41TF</i>	58

Figura 18- Microscopia da levedura <i>Y. lipolytica</i> (0,3 kGy) visualizada em microscópio <i>Olympus</i> BX41TF.....	58
Figura 19- Microscopia da levedura <i>Y. lipolytica</i> (0,5 kGy) visualizada em microscópio <i>Olympus</i> BX41TF.....	58
Figura 20- Microscopia da levedura <i>Y. lipolytica</i> (0,5 kGy) visualizada em microscópio <i>Olympus</i> BX41TF.....	58
Figura 21- Microscopia da levedura <i>Y. lipolytica</i> (0,75 kGy) visualizada em microscópio biológico trinocular (NOVA 180 iPL)	59
Figura 22- Microscopia da levedura <i>Y. lipolytica</i> (0,75 kGy) visualizada em microscópio biológico trinocular (NOVA 180 iPL)	59
Figura 23- Microscopia da levedura <i>Y. lipolytica</i> (1,0 kGy) visualizada em microscópio biológico trinocular (NOVA 180 iPL)	59
Figura 24- Microscopia da levedura <i>Y. lipolytica</i> (1,0 kGy) visualizada em microscópio biológico trinocular (NOVA 180 iPL)	59
Figura 25- Microscopia da levedura <i>Y. lipolytica</i> (1,25 kGy) visualizada em microscópio biológico trinocular (NOVA 180 iPL)	59
Figura 26- Microscopia da levedura <i>Y. lipolytica</i> (1,25 kGy) visualizada em microscópio biológico trinocular (NOVA 180 iPL)	59
Figura 27- Microscopia da levedura <i>Y. lipolytica</i> (2,5 kGy) visualizada em microscópio biológico trinocular (NOVA 180 iPL)	60
Figura 28- Microscopia da levedura <i>Y. lipolytica</i> (2,5 kGy) visualizada em microscópio biológico trinocular (NOVA 180 iPL)	60
Figura 29- Curva de crescimento microbiano.	61
Figura 30- Curva de crescimento da levedura <i>Y. lipolytica</i> de acordo com os tratamentos medidos em termos de densidade óptica.....	61
Figura 31- Curva de sobrevivência da levedura <i>Y. lipolytica</i> de acordo com os tratamentos (n =3).....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Exemplos de unidades usadas em publicações para descrever a produção de lipídios por leveduras oleaginosas	31
Tabela 2- Composição química média da vinhaça obtida a partir da fermentação de diferentes mostos.....	34
Tabela 3- Uso potencial da vinhaça, vantagens e desvantagens.....	35
Tabela 4- Valor nutritivo do melado de cana-de-açúcar	37
Tabela 5- Conceitos de estimulação por baixas doses.....	43
Tabela 6- Valores médios referentes à viabilidade celular e ao número de células/mL para a amostra controle e para as amostras submetidas à radiação gama	55
Tabela 7- Valores médios da produção de biomassa seca e lipídios em função dos dias de incubação e das doses de radiação.....	64
Tabela 8- Valores médios da interação entre dias de incubação versus doses de radiação para a produção de biomassa (g/L)	65
Tabela 9- Valores médios da interação entre dias de incubação versus doses de radiação para a produção de lipídios totais em (g/L).....	66
Tabela 10- Valores médios da interação entre dias de incubação versus doses de radiação para a produção de lipídios totais em (%).....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

TAG	Triacilglicerol
EE	Esteril Éstere
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ZEP	Ponto Zero Equivalente
YEPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
OD	Densidade Óptica
pH	Potencial Hidrogeniônico
g	Gramma
l	Litro
mL	Mililitro
%	Porcentagem
rpm	Rotação por minuto
μL	Microlitro
cal/g	Caloria/grama

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo Geral	23
2.2	Objetivos Específicos	23
3	REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1	Leveduras	24
3.2	<i>Yarrowia lipolytica</i>	25
3.3	Lipídios	26
3.4	Leveduras Oleaginosas	27
3.5	Componentes do Meio de Cultura	32
3.5.1	Nutrientes	32
3.5.2	Vinhaça	33
3.5.3	Melado e Melaço de cana-de-açúcar	35
3.6	Radiações Ionizantes	37
3.6.1	Raios Gama	38
3.6.2	Efeitos de radiações ionizantes em microrganismos	38
3.7	<i>Hormesis</i>	40
3.8	Extração Lipídica	44
4	METODOLOGIA	46
4.1	Microrganismos e condições de crescimento	46
4.1.2	Criopreservação de células em freezer a -85°C	46
4.1.3	Meio de crescimento do inóculo	46
4.2	Irradiação da levedura	47
4.2.1	Viabilidade Celular	48
4.3	Preparo do meio de cultivo para a produção de lipídios	49
4.4	Determinação da curva de crescimento e sobrevivência por Densidade Óptica	50
4.5	Determinação do peso seco	51
4.5.1	Liofilização	51
4.6	Extração de lipídios totais pelo método de Bligh e Dyer	52
4.6.1	Determinação do conteúdo lipídico	53
4.7	Delineamento experimental e análise estatística	54

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	Viabilidade Celular e Número de células/mL	55
5.2	Determinação da curva de crescimento e de sobrevivência por Densidade Óptica	60
5.3	Produção de biomassa seca e lipídios	63
5.3.1	Biomassa Seca	64
5.3.2	Lipídios	65
6	CONCLUSÃO	71
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
	REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos e seus derivados, presentes em óleos e gorduras, são as principais matérias-primas utilizadas em muitos setores das indústrias química, alimentar e de energia. (DONOT et al., 2014). A busca por combustíveis obtidos de fontes renováveis, também despertou o interesse de muitos pesquisadores na utilização desses óleos como matéria-prima para a produção de biodiesel (OLIVEIRA; SUAREZ; SANTOS, 2008).

Em função disso, muitos autores estudam o potencial dos óleos microbianos como matéria-prima alternativa para os abastecimentos das demandas de alimentos e de combustíveis renováveis (CASTANHA, 2012).

Há uma diversidade enorme de microrganismos que armazenam lipídios, e que são considerados uma boa alternativa para a conversão em biodiesel.

Segundo Ratledge (1996), as principais classes de microrganismos utilizados para a produção de lipídios e considerados microrganismos oleaginosos, são as leveduras e os fungos; estes podem produzir até 40% de sua biomassa em lipídios.

Para que as leveduras acumulem lipídios, elas devem ser cultivadas em meios que forneçam condições ideais para o seu crescimento e desenvolvimento. Meios alternativos podem ser explorados, como por exemplo, subprodutos agroindustriais, como forma de reduzir custos durante o processo, e também como forma de reaproveitar os subprodutos de forma sustentável.

Segundo Lima e Sato (2001), a literatura é um tanto desconcertante com relação ao rendimento lipídico e à presença de nutrientes nos meios. A concentração dos nutrientes que é boa ou ótima para uma levedura, pode não ser adequada para outra.

Além disso, muitos autores observaram efeitos positivos que baixas doses de um agente estressante podem causar a organismos vivos, o chamado efeito *Hormesis*. Atkinson (1898)¹, citado por Wiendl (2010) observou efeitos biopositivos na aceleração do crescimento em *Oscillatoria* (alga verde-azulada) quando submetida a baixas doses de irradiação.

¹ ATKINSON, G. F. Report upon some preliminary experiments with the Roentgen rays on plants. **Science**, Washington, DC, v. 7, n. 158, p. 7-13, 1898.

Segundo Calabrese (2015), Schulz (1888)², também observou efeitos biopositivos no crescimento de leveduras, quando submetidas a baixas doses de um antibiótico.

Assim, em virtude da importância da utilização de novas fontes lipídicas, o estudo teve como objetivo avaliar o crescimento de *Yarrowia lipolytica*, bem como a produção de biomassa seca e lipídios ao submeter a levedura à baixas doses de radiação gama.

² SCHULZ, H. Über Hefegifte. **Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere**, Heidelberg, v. 42, n. 1, p. 517–541, 1888.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de baixas doses de radiação gama do Cobalto-60 no crescimento e na síntese lipídica de *Y. lipolytica*.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a produção de biomassa seca e de lipídios em três períodos de incubação: 7, 14 e 21 dias;
- Aproveitar subprodutos agroindustriais (xarope de cana-de-açúcar e vinhaça) como fonte de nutrientes no meio de cultivo da levedura *Y. lipolytica*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Leveduras

As leveduras são fungos unicelulares que pertencem ao Reino *Fungi* e se reproduzem assexuadamente por brotamento ou fissão binária (CHARLILE et al., 2001). Algumas se reproduzem sexuadamente por meio de um processo denominado acasalamento, em que ocorre a fusão de duas células (MADIGAN et al., 2004).

Assim como os demais fungos, as leveduras são organismos eucariotos, que apresentam nutrição heterotrófica e ausência de motilidade, porém não formam corpos de frutificação (KURZMAN; FELL, 1998).

Sua estrutura é composta por um núcleo diferenciado, organelas subcelulares (retículo endoplasmático e mitocôndrias), membrana citoplasmática lipoprotéica, parede celular rígida, vacúolos de glóbulos de lipídios, retículo citoplasmático, ribossomos, e grânulos de materiais de reserva (LIMA; AQUARONE; BORZANI, 1975). O desenvolvimento das mitocôndrias, a ausência ou presença de vacúolos de glóbulos de lipídios, a formação de cápsulas de polissacarídeos e a morfologia celular, são determinadas pelas condições físico-químicas e pela idade do cultivo do microrganismo (BOURGEOIS; LARPENT, 1995).

São microrganismos capazes de sobreviver em diferentes condições de cultivo, optando entre o metabolismo aeróbio, ou anaeróbio, conforme a disponibilidade de oxigênio no meio (PASTERIS; STRASSER DE SAAD, 1998). Além disso, apresentam alta velocidade de crescimento, elevado teor protéico e a possibilidade de cultivo em diferentes substratos, podendo substituir suplementos proteicos convencionais utilizados na alimentação humana e animal (BELLUCO, 2008).

Compostos como água, fontes de carbono, de nitrogênio, oxigênio e minerais, são necessidades básicas para o crescimento e reprodução das leveduras (TORTORA; FUNKE; CASE, 2002).

Estas possuem capacidade de metabolizar diversas fontes de carbono, principalmente açúcar (sacarose, glicose, maltose), e também fontes não convencionais de carbono, como biopolímeros, pentoses, álcoois, polióis, hidrocarbonetos, ácidos graxos e ácidos orgânicos (BEKATOROU; PSARIANOS; KOUTINAS, 2006).

3.2 *Yarrowia lipolytica*

A levedura *Yarrowia lipolytica* é um microrganismo eucarioto, não patogênico, e estritamente aeróbio, pertencente ao Reino *Fungi*, à classe dos *Ascomycetos*, e subclasse dos *Hemiascomycetos* (BARTH; GAILLARDIN, 1997).

Inicialmente foi classificada como *Candida lipolytica* (WICKERHAM, 1951). Em seguida, foi incluída no gênero *Endomycopsis* todas as estirpes dessa levedura que apresentavam capacidade de esporulação (WICKERHAM et al., 1970). Por motivos morfológicos, em 1972, foi classificada como *Saccharomycopsis lipolytica*, e apenas em 1980 foi reclassificada como *Y. lipolytica*. O seu nome faz menção à sua preferência por crescer em substratos ricos em lipídios (VAN DER WALT et al., 1980).

No que diz respeito à fisiologia, à genética, e à biologia molecular, a levedura *Y. lipolytica* pertence ao grupo das leveduras “não convencionais”, diferente das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* que são consideradas leveduras “convencionais” (BARTH; GAILLARDIN, 1997).

Dentre as “não convencionas” é uma das mais estudadas devido a sua importância industrial e a flexibilidade do seu metabolismo para a produção de proteínas heterólogas, lipídios, ou ácido cítrico (OCHOA-ESTOPIER; GUILLOUET, 2014). Apresenta ainda, potencial para produção de ácidos orgânicos, lisina, proteases, lipases, entre outros metabólitos biotecnologicamente importantes (KAWASSE, 2003).

Por acumular grandes quantidades de lipídios, especialmente sob a forma de triacilglicerol (TAG), a levedura *Y. lipolytica* pertence aos designados fungos oleaginosos, sendo capaz de acumular até 43% da sua massa seca em glicerol, e mais de 50% dos lipídios totais em ácidos graxos (OCHOA-ESTOPIER; GUILLOUET, 2014).

O perfil de lipídios acumulados por essa levedura é de 11% de ácido palmítico (C16:0), 28% de ácido esteárico (C18:0) e 51% de ácido linoleico (C18:2). Sob certas condições de cultivo, esta levedura apresenta, ainda, a capacidade de produzir lipídios saturados, como por exemplo, estearina (AGEITOS et al., 2011).

Y. lipolytica apresenta dimorfismo devido a sua habilidade em crescer em distintas formas morfológicas, geralmente como células ovais individuais ou como hifas filamentosas (sendo reversíveis entre as duas formas). Acredita-se que o dimorfismo apresentado por essa levedura se deve às condições adversas como mudanças na temperatura e condições nutricionais (KAWASSE, 2003). Características genéticas da estirpe

e condições de crescimento (arejamento, fontes de carbono e nitrogênio, pH, concentração de oxigênio dissolvido no meio, etc) determinam a morfologia das colônias de leveduras (CRUZ; DOMINGUEZ; DOMINGUEZ, 2000).

3.3 Lipídios

Os lipídios são moléculas biológicas solúveis em solventes orgânicos, tais como: éter etílico, éter de petróleo, clorofórmio, n-hexano, etanol à quente e acetona (MUBARAK; SHAIJA; SUCHITHRA, 2015; GUTIERREZ, 1997). São insolúveis em água e menos densos que ela (GIOELLI, 1996).

Diferente de biomoléculas como carboidratos e proteínas, não existe uma única estrutura química para defini-los, tornando-os o grupo mais diverso que existe (OETTERER; D'ARCI; SPOTO, 2006).

Compreendem as gorduras, os óleos e as ceras, e por apresentar elevado valor energético, a presença de ácidos graxos essenciais e vitaminas (A, D, E, K) são importantes na dieta alimentar. Hormônios de natureza sexual como, testosterona, progesterona e estrogênios também são estudados na classe dos lipídios (GUTIERREZ, 1997).

São constituídos por carbono, hidrogênio e oxigênio, sendo o carbono em maior número. Fornecem o dobro de energia em relação aos carboidratos, e são degradados nas células durante a respiração celular (PINHEIRO; PORTO; MENEZES, 2005). Por apresentar alto conteúdo calórico (cal/g), o lipídio é um eficiente composto para estoque de energia. Entre os animais, este seja, talvez, o mais significativo uso dos lipídios (SHERIDAN, 1994).

Os lipídios são classificados em simples (gorduras, óleos ou ceras), compostos (fosfolipídios e glicolipídios), e derivados (álcoois, ácidos graxos livres, hidrocarbonetos, vitaminas) (GUTIERREZ, 1997).

A diferença entre óleos e gorduras é dada pelo ponto de fusão, em que os óleos são de origem vegetal e líquidos à temperatura ambiente (20°C), e as gorduras de origem animal e sólidas à temperatura ambiente (GIOELLI, 1996; PINHEIRO; PORTO; MENEZES, 2005).

Segundo Lima e Sato (2001), microrganismos podem sintetizar lipídios, sejam eles eucariotos ou procariotos. Esses lipídios exercem diversas funções biológicas, como por exemplo, reserva energética, constituição de membranas celulares, síntese de hormônios, isolante térmico e meio de transporte para algumas vitaminas (SOARES, 2001).

Lipídios produzidos por organismos vivos são classificados em três famílias principais: os fosfolipídios, os glicolipídios e os TAGs (lipídios de reserva de energia) (DONOT et al., 2014).

Assim, os TAGs são os principais constituintes de óleos vegetais, e por isso, considerados os lipídios de interesse (DONOT et al., 2014). São formados por três moléculas de ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol (MADIGAN et al., 2004), sendo não polares e insolúveis em água (DONOT et al., 2014).

3.4 Leveduras oleaginosas

O estudo do metabolismo lipídico de organismos eucariontes tem despertado interesses e avanços na engenharia genética e na análise de lipídios (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011). Em razão de representarem fontes de óleos e gorduras, os microrganismos denominados oleaginosos, são vistos como possíveis substitutos na procura por novas fontes de ácidos graxos essenciais (DYAL; NARINE, 2005).

Segundo Papanikolaou e Aggelis (2002), os lipídios microbianos apresentam composição similar aos óleos vegetais convencionais, e podem, dessa forma, contribuir para suprir a demanda por óleos e gorduras. Esses microrganismos são facilmente cultivados sob condições ambientais controladas e não competem eticamente ou economicamente com as culturas alimentares (PATEL et al., 2014). Além disso, podem ser utilizados meios de fermentação de baixo custo, como por exemplo, resíduos agrícolas e subprodutos industriais (MATSAKAS et al., 2014).

Conforme Ratledge (1988)³, citado por Beopoulos, Nicaud e Gaillardin (2011), a capacidade das leveduras em acumular grandes quantidades de lipídios intracelulares, sua elevada taxa de crescimento e a semelhança dos seus TAGs com as frações dos óleos vegetais, tornam-nas atraentes para o desenvolvimento de abordagens biotecnológicas.

Naegeli e Loew (1878)⁴, citado por Smedley-Maclean (1922), foram os pesquisadores que verificaram lipídios em leveduras. Eles pesquisaram a formação de TAGs a partir de carboidratos e verificaram, dentre os ácidos graxos formados nas leveduras, maior produção de ácido oleico. Também estudaram técnicas de extração dos lipídios com solventes como éter e álcool.

³ RATLEDGE, C. Biochemistry, stoichiometry, substrate and economics. In: MORETON, R. S. (Ed.). **Single cell oil**. London: Longman, 1988. p. 33-70.

⁴ NAEGELI, C.; LOEW, O. Über die chemische Zusammensetzung der Hefe. **Journal für Praktische Chemie**, Leipzig, v. 17, 403-428, 1878.

Para que um microrganismo seja considerado favorável aos interesses comerciais, deve apresentar, em sua biomassa, entre 20-25% de lipídios (RATLEDGE, 1996).

A eficiência na produção de óleo é determinada pelo meio de cultivo e seus constituintes, sendo os mais comuns glicose e glicerol. (VICTORELLI, 2008). Estudos indicam que microrganismos quando cultivados em meio contendo quantidades limitantes de nitrogênio e carbono em excesso são capazes de acumular grandes quantidades de lipídios (YI-HUANG et al., 2015).

Conforme Liang et al. (2010) e Kitcha e Cheirsilp (2013), o glicerol tem sido explorado como fonte de carbono para as leveduras oleaginosas, porém os rendimentos lipídicos geralmente permanecem menores do que aqueles utilizando a glicose como fonte de carbono.

Com isso, os autores Yang et al. (2014) desenvolveram um procedimento em que a utilização do glicerol bruto, como fonte de carbono, apresentou elevado rendimento de produção, comparável com a utilização da glicose. Eles desenvolveram o processo de produção de lipídios de duas fases. Na primeira, as células foram cultivadas num meio rico em nutrientes para a propagação da levedura, e na segunda fase, as células foram suspensas novamente em um meio contendo fontes de carbono, sem nutrientes auxiliares, para a produção de lipídios. Devido à ausência de nutrientes auxiliares como nitrogênio e fósforo, a biossíntese de proteínas e ácidos nucleicos foi cessada e a propagação das células foi inibida. Contudo, a conversão da fonte de carbono em lipídios foi mais eficiente, aumentando o rendimento lipídico e a produtividade.

Além da fonte de carbono, outros parâmetros determinam a quantidade de cada ácido graxo produzido e as características dos lipídios, tais como: agitação, temperatura, oxigenação, pH e outros nutrientes disponíveis no meio (VICTORELLI, 2008).

Segundo Gutierrez (1997), quanto maior o nível de oxigenação e menor a temperatura (abaixo do ótimo para crescimento), maior o grau de insaturação dos ácidos graxos. Contudo, Hunter e Rose (1972) não observaram alterações em *Saccharomyces cerevisiae* quando a temperatura caiu de 30 para 15°C.

Celligoi (1993) ao adicionar em seu experimento NaCl (0,17M) constatou maior assimilação de açúcares e elevação da produção de lipídios totais.

Papanikolaou e Aggelis (2002) cultivaram a levedura *Y. lipolytica* em meio contendo gorduras industriais, e perceberam acúmulo de lipídios, principalmente de ácido esteárico.

A literatura destaca os gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Rhizopus*, *Trichosporon* e *Yarrowia* como as leveduras oleaginosas mais conhecidas e capazes de

produzir 40% de sua biomassa em lipídios. Em condições de limitação de nutrientes a produção pode ser ainda maior, alcançando níveis acima de 70% em relação a sua biomassa (BEOPOULOS et al., 2009).

Dentre os lipídios acumulados, 90% correspondem aos TAGs, e desses TAGs, 44% contêm ácidos graxos insaturados (DONOT et al., 2014). Segundo Beopoulos et al. (2009), o conteúdo e o perfil dos lipídios produzidos diferem de acordo com cada espécie de levedura.

Dois vias metabólicas distintas estão envolvidas na acumulação de lipídios pelas leveduras: a síntese de lipídios *'de novo'*, e a síntese de lipídios *'ex novo'*. Quando as leveduras crescem em meio contendo substâncias hidrofóbicas chamamos de via de acúmulo de lipídios *'ex novo'* (DONOT, 2014), porém quando o cultivo da levedura é baseado em meios compostos por açúcares, denominamos de via de acúmulo *'de novo'*. A via de acúmulo *'de novo'* produz quantidades maiores de TAG na composição lipídica comparada a via *'ex novo'* (VALONI, 2014).

Na via de síntese *'de novo'*, precursores de ácidos graxos (acetil-CoA e malonil-CoA) são produzidos, em condições definidas, por meio de carboidratos não oleaginosos e integram-se na via biossintética de lipídios para formar TAGs e ésteres (EE), que são armazenados em corpos lipídicos e servindo como reservas de energia (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011; BEOPOULOS; CHARDOT; NICAUD, 2009; BEOPOULOS et al., 2009).

A acumulação de lipídios, durante a síntese *'de novo'*, ocorre pela exaustão ou limitação de um nutriente essencial no meio (geralmente o nitrogênio é utilizado para este fim). Com isso, a proliferação celular diminui, uma vez que o nitrogênio é essencial para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos. Na ausência de nitrogênio, o organismo continua a assimilar as fontes de carbono disponíveis no meio, e direciona essa fonte para a produção de lipídios (BEOPOULOS et al., 2009).

A via de síntese *'ex novo'* envolve a captação de ácidos graxos, óleos e TAGs presentes no meio de cultura e seu acúmulo em forma modificada ou não modificada no interior da célula. Nesta via ocorre a hidrólise do substrato hidrofóbico, transporte dos ácidos graxos liberados para dentro da célula e a remontagem desses lipídios em frações de TAG e EE. Os TAGs e os EE são acumulados dentro dos corpos lipídicos (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011; BEOPOULOS; CHARDOT; NICAUD, 2009; BEOPOULOS et al., 2009).

Dessa forma, a principal diferença entre as vias de síntese ‘*de novo*’ e ‘*ex novo*’ é que na síntese ‘*ex novo*’ a produção de lipídios ocorre simultaneamente com o crescimento celular, e independe do esgotamento de nitrogênio no meio de cultivo, diferentemente da via de síntese “*de novo*” (DONOT, 2014).

Geralmente, o acúmulo de lipídios não está vinculado à propriedades de crescimento, todavia, durante o início da fase de crescimento, podem ser produzidas quantidades significativas de lipídios (VALONI, 2014).

A produção de lipídios ocorre comumente durante a fase exponencial tardia (RASCHKE; KNORR, 2009), quando as células já consumiram todos os nutrientes disponíveis, mas ainda tem excesso de carbono no meio (TAI; STEPHANOPOULOS, 2013). Nessa fase os TAGs são produzidos e armazenados sob a forma de gotas de óleo no citoplasma da célula. A finalidade da biossíntese de TAG é constituir reservas de energia que são utilizadas para garantir a persistência das funções vitais em caso de deficiência ambiental ou stress (DONOT et al., 2014).

Os lipídios produzidos podem ser expressos com base na porcentagem de peso seco, contudo esta não é a única unidade utilizada para reportar a produtividade lipídica. Na literatura são descritas outras unidades, tais como: massa final de lipídio por litro de cultura; produção de lipídio por dia; proporção de entrada de carbono convertido em lipídio, dentre outros. Exemplos de medidas descritas na literatura estão listados na Tabela 1. (SITEPU et al., 2014).

Tabela 1 - Exemplos de unidades usadas em publicações para descrever a produção de lipídios por leveduras oleaginosas. Termos padronizados propostos estão mostrados em negrito.

Medidas da produção de lipídios e massa celular	Definição	Unidades
Produção de massa celular (produção de biomassa).	Quantidade de massa seca microbiana produzida, relativa ao volume de cultura.	g de massa seca celular por litro de cultura.
Rendimento de massa celular (também chamado de rendimento de biomassa).	Taxa de massa celular produzida, por açúcar consumido.	g de levedura por g de açúcar consumido.
Conversão de massa celular (também chamado de conversão de biomassa, coeficiente de rendimento, ou rendimento de biomassa).	Massa seca de célula de levedura produzida, relativa á massa de carboidrato consumido.	g de levedura por 100 g de açúcar usado, ou grama de levedura por g de açúcar em média.
Conteúdo lipídico	Peso de lipídio extraído, relativo ao peso de massa celular seca	% (g/g); g de lipídio por 100 g de levedura (peso seco)
Coefficiente Lipídico	Lipídio produzido relativo à absorção de carbono ou carbono consumido; expresso em porcentagem ou taxa	g de lipídio por g ou por 100 g de carboidrato consumido, ou g de lipídio por g ou por 100 g de glicose na média inicial
Produção de lipídios (também chamado de rendimento lipídico)	Rendimento lipídico por volume de cultura	g de lipídio por litro de cultura
Produtividade lipídica (Produtividade volumétrica lipídica, produtividade ou produção de lipídios)	Taxa de produção de óleo	Massa ou volume de lipídio, por volume de cultura por tempo. Exemplos incluem g de lipídio por litro por hora, grama de lipídio por litro por dia.
Taxa específica da formação de lipídios	Taxa de acumulação de lipídio relativo á massa celular	g de lipídio por hora por grama celular.

Fonte: Sitepu et al. (2014).

3.5 Componentes do meio de cultura

3.5.1 Nutrientes

Todos os organismos vivos necessitam de nutrientes para crescerem. Esses nutrientes são responsáveis pela síntese e pelas funções normais dos componentes das células (PEREIRA JÚNIOR; BON; FERRARA, 2008).

Alguns elementos químicos são essenciais para o crescimento das células, como, carbono, nitrogênio, hidrogênio e oxigênio; além dos macronutrientes (enxofre, fósforo, potássio, magnésio, cálcio e ferro) e dos micronutrientes (cobre, cobalto, zinco, manganês, sódio, boro, entre outros). Aminoácidos e vitaminas também devem ser acrescentados aos meios de cultivo, uma vez que muitos microrganismos são incapazes de sintetizá-los. (PEREIRA JÚNIOR; BON; FERRARA, 2008).

Para o crescimento e estímulo da síntese lipídica, as exigências em elementos minerais variam de acordo com o microrganismo escolhido. A fonte de carbono é de grande importância para a formação de gorduras. Os íons PO_4 , Mg e SO_4 também são importantes; a presença ou ausência desses elementos pode diminuir a multiplicação celular e o acúmulo de gordura (LIMA; SATO, 2001).

Para que um óleo microbiano seja considerado competitivo, o seu uso deve reduzir os custos de produção. Com isso, a substituição da glicose por outras fontes de carbono tem sido objeto de estudo nos últimos anos (POLI et al., 2014), dentre elas, os subprodutos agroindustriais (SILVA et al., 2009).

Atualmente, muitos subprodutos agroindustriais têm sido reaproveitados como substratos para a produção de lipídios (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2002), biossíntese protéica (ARAÚJO et al., 2009) e enzimas (FERREIRA, 2009). O reaproveitamento é vantajoso, pois os subprodutos representam fontes alternativas de baixo valor comercial, apresentam alta disponibilidade, são convertidos em produtos de alto valor agregado, além de contribuírem para redução nos custos operacionais (FERREIRA, 2009; SILVA et al., 2009). Melaço, vinhaça, farelo e palha de trigo, poupa de café, cana-de-açúcar e bagaço de cana-de-açúcar são exemplos desses subprodutos (ARAÚJO et al., 2009).

Cazzeta e Celligoi (2006), Poli et al. (2014), Papanikolau e Aggelis (2002) e Castanha (2012) fizeram uso de meios alternativos em seus trabalhos. Cazzeta e Celligoi (2006) utilizaram diferentes concentrações de melaço e vinhaça como substrato em meio de cultivo. Poli et al. (2014) e Papanikolau e Aggelis (2002), utilizaram glicerol industrial como fonte de

carbono. Castanha (2012) fez uso de soro de queijo como substrato para selecionar a linhagem de levedura mais adequada para a produção de lipídios.

3.5.2 Vinhaça

A vinhaça é obtida na destilação de etanol a uma temperatura de 85-90°C (MORAES et al., 2014), e constitui, no Brasil, o efluente industrial produzido em maior quantidade (SYDNEY et al., 2014), cerca de 9 a 14 litros de vinhaça por litro de etanol (LAPPA et al., 2015). Caracteriza-se por um líquido marrom escuro, de odor bastante desagradável e baixo pH (3,5-5,0) (CHRISTOFOLETTI et al., 2013; ROCHA, 2007).

Além da denominação vinhaça, é também conhecida como vinhoto, restilo, garapão, caldo de destilaria, entre outras denominações (FREIRE; CORTEZ, 2000).

A vinhaça é composta, em sua maioria, por 93% de água e 7% de sólidos. Dos sólidos, 75% correspondem à matéria orgânica, e 25% à frações minerais (LUDOVICE, 1997; LAIME et al., 2011).

As frações minerais são compostas por nutrientes como potássio (na grande maioria), nitrogênio, fósforo (FERRAZ JÚNIOR et al., 2014), cálcio e enxofre (SZYMANSKI; BALBINOT; SCHIRMER, 2010) e a matéria orgânica composta por elevada demanda química e bioquímica de oxigênio (DQO) e (DBO) (COCA et al., 2014).

A quantidade de nutrientes disponíveis na vinhaça varia por diversos fatores, como, origem, tipo de mosto utilizado na destilaria, variação de safra para safra e de usina para usina (ROSSETTO et al., 2008), moagem, e matéria-prima (variedade da cana, índice de maturação, cultivo em diferentes solos e com diferentes níveis de fertilidade) (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015). A Tabela 2 apresenta a composição química da vinhaça obtida a partir de diferentes tipos de mostos.

Tabela 2 – Composição química média da vinhaça obtida a partir da fermentação de diferentes mostos, modificada (PRADA et al., 1998).

Elementos	Vinhaça de mosto		
	Melaço	Caldo	Misto
pH	4,2-5,0	3,7-4,6	4,4-4,6
Temperatura	80-100	80-100	80-100
DBO (mg/L O ₂)	25.000	6.000 – 16.500	19.800
DQO (mg/L O ₂)	65.000	15.000 – 33.000	45.000
Sólidos Totais (mg/L)	81.500	23.700	52.700
N (mg/L)	450 - 1.610	150 – 700	480 - 710
P ₂ O ₅ (mg/L)	100 - 290	10 – 210	9 - 200
K ₂ O (mg/L)	3.740 – 7.830	1.200 – 2.100	3.340 – 4.600
CaO (mg/L)	450 - 5.180	130 – 1.540	1.330 – 4.570
MgO (mg/L)	420 - 1.520	200 - 490	580 - 700
SO ₄ (mg/L)	6.400	600 – 760	3.700 – 3.730
C (mg/L)	11.200 – 22.900	5.700 – 13.400	8.700 – 12.100
Matéria orgânica (mg/L)	63.400	19.500	3.800
Subst. Redutoras (mg/L)	9.500	7.900	8.300

Fonte: Prada et al. (1998)

Devido a sua composição, o destino mais comum desse resíduo líquido é o seu aproveitamento no solo como fertilizante para o cultivo de cana-de-açúcar, apresentando vantagens em relação à produtividade e crescimento da cana (SYDNEY et al., 2014; MORAES et al., 2014).

Contudo, por apresentar quantidades altíssimas de DQO e DBO e elevado teor de potássio (SYDNEY et al., 2014; COCA et al., 2014), a vinhaça é vista como uma preocupação ambiental grave e uma ameaça à qualidade dos cursos de água, uma vez que é aplicada diretamente sobre o solo, independente se as proporções de nutrientes são utilizadas em condições ideais (FERRAZ JÚNIOR et al., 2014). Esse método de aplicação da vinhaça pode causar alterações no solo como, desequilíbrio de nutrientes, diminuição da alcalinidade, fitotoxicidade, e odor desagradável (NITAYAVARDHANA et al., 2013).

Com isso, pesquisadores estão estudando usos e tratamentos alternativos para a vinhaça, dentre eles, propostas como, reciclagem da vinhaça em fermentação, fertirrigação, concentração por evaporação, produção de energia e matéria-prima para a produção de gado e aves de alimentação, e produção de levedura (CHRISTOFOLETTI, et al., 2013). A Tabela 3 apresenta as aplicações da vinhaça, suas vantagens e desvantagens.

Tabela 3 - Uso Potencial da Vinhaça – Vantagens e Desvantagens

Processo / Produto Final	Vantagens	Desvantagens
Fertirrigação	- Método mais barato - Fácil de ser adotado	- Torna-se caro para transporte - Efeito de longo prazo desconhecido
Ração Animal	- Barato - Fácil de ser adotado	- Não é pesquisado
Biodigestão / Biogás	- Produção de energia - Redução da DBO - Efluente utilizado como fertilizante	- Relativamente Caro - Alta tecnologia
Combustão em caldeiras	- Disposição completa - Produção de energia - Recuperação do potássio nas cinzas	- Não é pesquisado - Teste em pequena escala
Produção de Proteínas	- Alimento - Não deixa resíduo	- Caro - Não é pesquisado

Fonte: Christofolletti et al. (2013)

Devido à presença de muitos nutrientes em sua composição química, alguns autores fizeram uso da vinhaça como substrato para microrganismos, dentre eles Cazetta e Celligoi (2005) que avaliaram a capacidade de crescimento e a síntese de lipídios e proteínas de algumas espécies de leveduras e uma linhagem de bactéria, inoculadas em frascos contendo como substrato vinhaça bruta de cana-de-açúcar e/ou melaço.

3.5.3 Melado e Melaço de cana-de-açúcar

Diferentes subprodutos e matérias-primas da agroindústria vêm sendo utilizados como substrato para o crescimento de microrganismos (ERNANDES; BOSCOLO; CRUZ, 2010). Em geral, os resíduos agroindustriais são os substratos mais pesquisados, e apresentam a maioria dos nutrientes necessários ao crescimento microbiano (SANTOS, 2006).

O melaço de cana-de-açúcar é sugerido como substrato para essas culturas (HAULY et al., 2003), em virtude do seu alto teor de açúcares fermentescíveis e dos seus minerais, tais como, manganês, magnésio, fósforo, potássio, zinco, sódio e cálcio (FELTRIN et al., 2000).

Segundo Rambla et al. (1999) e Menezes (1980), o melaço de cana-de-açúcar é definido como um licor, obtido após a centrifugação das massas cozidas para a separação dos cristais de açúcar.

Conforme o tipo de processamento do açúcar, o melaço apresenta denominações diferentes, como melaço de primeira, mel pobre de primeira, melaço de segunda, mel rico de segunda e mel final (também denominado de mel residual ou esgotado). No Brasil, todos os méis enviados para a destilaria, denominam-se de mel final, independente da sua composição (RIBEIRO, 2009).

Para o crescimento e desenvolvimento dos microrganismos, os substratos adicionados ao meio de cultivo devem ser economicamente viáveis e satisfazer as necessidades nutricionais. O melaço de cana-de-açúcar satisfaz essas condições por apresentar fácil manipulação, baixo custo e várias aplicações a nível industrial (FELTRIN et al., 2000).

Assim como o melaço, o melado de cana-de-açúcar também pode ser utilizado como fonte de vários nutrientes (RIBEIRO et al., 2012) devido a quantidades importantes de minerais em sua composição, dentre eles: cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg), potássio (K), e zinco (Zn), além de ser uma das maiores fontes de ferro (Fe) (SILVA; CESAR; SILVA, 2003).

O melado, também denominado como xarope do caldo de cana-de-açúcar, é o caldo da cana evaporado e concentrado (entre 74 a 78°Brix), purificado e livre das impurezas grosseiras em suspensão, até que se obtenha a consistência de xarope em estado incristalizável (DELGADO; DELGADO, 1999; PINTO, 1982). Vale lembrar que o termo melado não deve ser confundido com o termo melaço (subproduto da indústria de açúcar cristal) (SILVA; CESAR; SILVA, 2003).

O melado é um produto de importância econômica em várias regiões do Brasil e de grande aceitação pelos consumidores (DELGADO; DELGADO, 1999). No que diz respeito às pequenas propriedades rurais, a produção do melado é uma forma lucrativa de beneficiar a cana, visto que, durante o processo, são utilizados equipamentos simples e em pequeno número, e a mão de obra pode ser empregada por membros da própria família, resultando em mão de obra relativamente barata (SILVA; CESAR; SILVA, 2003).

O uso do melado é muito variado, seguindo costumes e tradições de cada região. É um produto que apresenta cor clara, características organolépticas semelhantes as do mel de abelha, e sabor agradável ao paladar, próprios dos derivados de cana-de-açúcar (PINTO, 1982).

Do ponto de vista energético o melado fornece ao organismo cerca de 350 calorias para cada 100g do produto, e por fornecer grandes quantidades de minerais e vitaminas é recomendado medicinalmente para casos de anemia e prisão de ventre (OLIVEIRA, 2004). A Tabela 4. apresenta o valor nutritivo do melado de cana.

Tabela 4 – Valor nutritivo do melado (para cada 100 gramas)

Elementos	Valores
Calorias	348,2 Kcal
Água	13 g
Carboidratos	86,7 g
Proteínas	0,2 g
Gorduras	0,02 g
Sais minerais	0,05 g
Vitamina A	15 UI
Vitamina B1	8 mcg
Vitamina B2	156 mcg
Vitamina B5	0,2 mg
Cálcio	591 mg
Fósforo	123 mg
Ferro	22,3 mg

Fonte: Oliveira (2004).

3.6 Radiações ionizantes

Radiação ionizante é a designação dada a radiação eletromagnética cuja energia seja suficientemente alta para arrancar elétrons de átomos e moléculas e convertê-los em íons (DOWD E TILSON, 1999).

O processo de interação de radiações ionizantes com a matéria acontece em nível atômico. Radiações ionizantes, ao atravessarem a matéria, transferem energia para as partículas que forem encontradas em sua trajetória. Se a energia transferida for maior que a energia de ligação entre o elétron e o restante da estrutura atômica, este elétron é ejetado de sua órbita. Nesse processo são formados o par íon-positivo (átomo que perdeu um elétron) e íon-negativo (elétron ejetado) (OKUNO, 1988; OKUNO, 2013).

Dessa forma, são consideradas radiações ionizantes, partículas alfa, beta, radiação gama, raios X e feixe de elétrons produzidos em acelerador de partículas (OKUNO, 1988; OKUNO, 2013).

3.6.1 Raios Gama

Após a emissão de partículas alfa (α) ou beta (β), o núcleo resultante desse processo (com excesso de energia e em estado excitado), procura estabilizar-se, atingindo o estado fundamental, com a emissão da energia excedente sob a forma de onda eletromagnética, denominada radiação gama (γ) (IAEA, 2010).

3.6.2 Efeitos de radiações ionizantes em microrganismos

Os efeitos da radiação em organismos vivos não podem ser descritos de maneira geral, uma vez que eles variam conforme a complexidade e a natureza dos organismos irradiados. A sensibilidade desses organismos à radiação é inversamente proporcional ao seu tamanho (DOMARCO et al., 1996).

Quando os microrganismos absorvem radiações ionizantes, alterações químicas podem ocorrer em seus componentes celulares, causando algum dano para a atividade celular, como por exemplo, alterações no DNA. Essas alterações podem levar a morte das células, ou tornar os microrganismos incapazes de se reproduzirem (URBAIN, 1986).

A radiação gama penetra facilmente os organismos vivos e os efeitos prejudiciais dos seus raios vão depender do tipo de tecido, da dose de radiação, da energia e da distância da fonte radioativa (ZAGÓRSKI, 1975). O poder de penetração, o potencial de ionização e a habilidade de causar alterações nas moléculas, torna a radiação eficiente ou não eficiente (POTTER; HOTCHKISS, 1995).

A radiação pode afetar os microrganismos de duas maneiras diferentes, por meio de ação direta (em que ocorre interação com moléculas específicas no interior da célula), ou por ação indireta (por meio de efeitos inibidores de radicais livres produzidos pela radiólise da água) (ADAMS; MOSS, 1995).

Na ação direta, a energia transportada pela radiação é transferida (na ausência de intermediários) para o DNA, levando a formação de ligações cruzadas e outras mudanças que tornam os microrganismos impossibilitados de crescerem e se reproduzirem (TAUXE, 2001).

No efeito indireto, interações entre a radiação incidente e as diversas moléculas presentes no interior celular (principalmente água e oxigênio) ocorrem sucessivamente, resultando na formação de radicais livres, altamente reativos. Por ser a água o componente mais abundante da maioria dos organismos, ela constitui alvo principal da radiação, gerando o processo denominado radiólise da água. Neste processo são produzidas espécies reativas

primárias, como os radicais hidroxila (OH) e hidrogênio (H), e produtos moleculares (H₂, H₂O₂). Por serem altamente reativos, esses produtos interagem com moléculas orgânicas e inorgânicas presentes no meio, ou sofrem recombinações entre si, desencadeando uma série de reações tóxicas para as células, provocando alterações químicas e biológicas (DOWD; TILSON, 1999; POTTER; HOTCHKISS, 1995).

A radiação gama interage mais frequentemente com os organismos vivos pela ação indireta, devido a grande quantidade de água presente no meio celular (METTLER JUNIOR; UPTON, 1995). Esta ação desempenha um papel importante, visto que, na ausência de água, as doses de radiação devem ser de duas a três vezes mais intensas para que se consigam os mesmos resultados sobre os microrganismos (ADAMS; MOSS, 1995).

Estudos utilizando diferentes organismos demonstraram que a sensibilidade à radiação ionizante depende da fase do ciclo celular em que as células se encontram quando irradiadas. As células são consideradas mais sensíveis durante a fase de mitose, e mais resistentes no período tardio da fase de síntese (METTLER JUNIOR; UPTON, 1995).

As doses de radiação são expressas em gray (Gy), e a radiorresistência de um microrganismo é medida em valor D₁₀, representando a quantidade de radiação necessária para inativar 90% da população. Valores baixos de D₁₀ indicam grande sensibilidade dos organismos (WHITBY; GELDA, 1979; DIEHL, 1995).

Alguns fatores do meio extracelular interferem na radioresistência dos microrganismos, tais como: temperatura, dose de irradiação, pH, presença ou ausência de oxigênio, atividade da água, tipo e número de microrganismos e composição química do meio em que eles se encontram (RADOMYSKY et al., 1994).

A temperatura é um dos fatores que mais influenciam na sobrevivência das células durante o processo de irradiação. Segundo a World Health Organization (WHO) (1997) o sistema de reparo dos microrganismos normalmente opera em temperatura ambiente, portanto se expostos a temperaturas elevadas são danificados.

Ainda, segundo WHO (1997), a presença de oxigênio aumenta os efeitos letais da radiação ionizante em células de microrganismos, assim como meios muito hidratados (que favorecem os efeitos indiretos no DNA) causam maior sensibilidade microbiana.

A resposta dos microrganismos após a radiação ionizante depende dos seguintes fatores (WHO, 1997):

- da quantidade e da qualidade dos danos diretos produzidos nas células;
- do número, da qualidade e do tempo de vida dos grupos químicos gerados pela radiação ionizante e da habilidade inerente às células em tolerar o dano radioinduzido ou repará-lo precisamente;
- da influência dos ambientes extra e intracelulares sobre os fatores mencionados.

Geralmente quanto mais simples um organismo, mais resistente eles são aos efeitos das radiações ionizantes (MONK; BEUCHAT; DOYLE, 1995). Segundo Urbain (1986) leveduras e bolores são mais sensíveis à radiação quando comparados a algumas bactérias não formadoras de esporos. As leveduras apresentam doses letais na faixa de 4,65 a 20,0 kGy, aproximadamente, sendo que, para os seguintes gêneros, as doses letais são: *Candida* 5,50-10,30 kGy; *Rhodotorula*: 4,72 kGy; *Saccharomyces*: 5,40-5,80 kGy.

3.7 *Hormesis*

As primeiras observações sobre o efeito *Hormesis* ocorreram por volta de 1888, na Alemanha, onde o farmacologista Hugo Paul Friedrich Schulz, descreveu que substâncias tóxicas têm efeitos opostos quando administradas em baixas doses ou em altas doses. Em seu experimento, ele observou que baixas doses de toxinas estimulavam o crescimento de leveduras, enquanto altas doses inibiam o seu crescimento (WIENDL, 2010).

Após considerável avaliação de acompanhamento, na qual o estímulo de baixa dose foi consistentemente observado, Schulz estava convencido que os resultados originais eram possíveis de serem reproduzidos, apesar de bastante inesperados e inexplicáveis (CALABRESE, 2015).

Schulz juntamente com Rudolf Arndt criou a lei de Arndt-Schulz, indicando que produtos pouco irritantes estimulavam a atividade, enquanto produtos altamente irritantes inibiam qualquer atividade (WIENDL, 2010).

Contudo, Schulz cometeu um erro de proporções incalculáveis, quando ligou a sua descoberta à homeopatia, especialmente por conhecer as hostilidades existentes entre ela e a medicina tradicional (CALABRESE, 2015).

Embora as primeiras observações do efeito hormético tenham ocorrido em 1888, somente em 1943 o termo foi de fato utilizado, quando Chester Southam and John Ehrlich observaram que extratos de cedro vermelho aumentavam o metabolismo de fungos quando administrados em baixas doses (CALABRESE, 2005; CALABRESE, 2014).

Hormesis é um processo de conservação evolutiva, caracterizado pelo fenômeno de dose-resposta, em que doses baixas de uma atividade estressante estimulam respostas adaptativas que aumentam a função e a resistência do organismo celular, enquanto doses elevadas apresentam respostas inibidoras, diminuindo a resistência e a função desse organismo (CUTTLE; POLLYCOVE, 2009).

A resposta hormética é representada por meio de uma curva dose-resposta em forma de “U” ou “∩” (também conhecida como curva em forma de “J”, de “J invertido”, “bifásica” ou “ β -curva”) dependendo do ponto final medido (CALABRESE; BALDWIN, 2001; CALABRESE; COOK, 2006). A Figura 1. esquematiza as formas de resposta à dose hormética, sendo (A) a forma mais comum da curva de dose resposta hormética, mostrando resposta estimulante em baixa dose e inibitiva em alta dose (curva β ou em forma de \cap), e (B) curva de dose resposta hormética mostrando redução, em dose baixa, e aumento, em doses altas, dos efeitos adversos (curva J ou em forma de U) (CALABRESE; COOK, 2006).

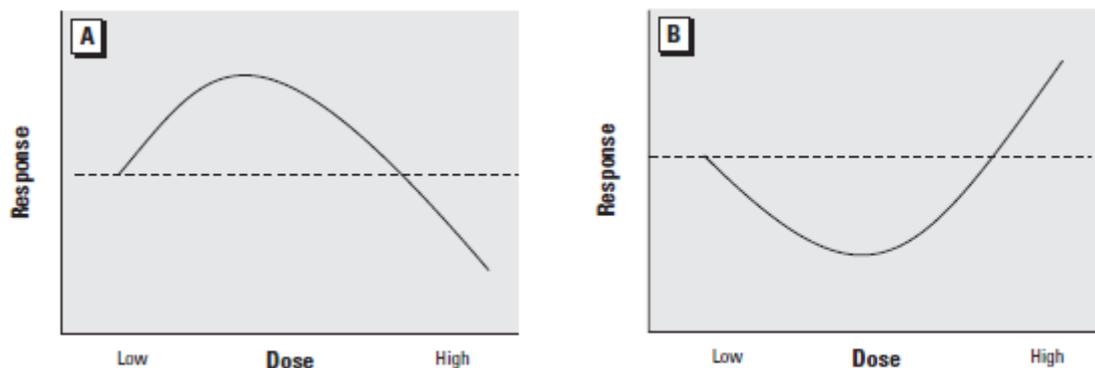


Figura 1 - Esquema das formas de dose resposta hormética. Fonte: Calabrese e Cook (2006)

Segundo Cuttler e Pollycove (2009), toxicologistas e médicos cientistas concordam com Paracelsus (médico suíço do século XVI) que escreveu: “... nada é sem veneno, apenas a dose torna algo não venenoso”. Assim sendo, este princípio não se aplica somente para o consumo de produtos químicos e microrganismos, mas também a exposição à agentes físicos estressores, incluindo a radiação ionizante.

Segundo Luckey (2006), *hormesis* é a estimulação de qualquer sistema, por doses baixas de qualquer agente. Ainda de acordo com Luckey (1999), dose baixa é definida como qualquer dose entre níveis ambientais de radiação e o limite que marca a fronteira entre os efeitos biopositivos e os bionegativos. Portanto, dose resposta que separa os efeitos negativos dos efeitos positivos é a dose limiar, o ponto zero equivalente (ZEP). Qualquer dose abaixo de ZEP é considerada baixa dose (LUCKEY, 2006).

Desde o final dos anos 1980, foi reconhecido que curvas de dose-resposta, em forma de U, pode ocorrer como resposta a uma ruptura na homeostase. Isto é, a níveis baixos de ruptura ou de toxicidade muitos sistemas biológicos exibem uma sobrecompensação (superação, rebote) de resposta (CALABRESE; BALDWIN; 2001). A natureza da resposta sobrecompensatória resulta de processos biológicos que alocam recursos ligeiramente superiores garantindo um retorno à homeostase (CALABRESE, 2005).

Mais de 3000 trabalhos científicos revelam que a irradiação em dose baixa é estimulante e/ou benéfica para uma grande variedade de micróbios, plantas, invertebrados e vertebrados (LUCKEY, 2006).

Conforme Luckey (1999) a maior parte das reações fisiológicas em células vivas são estimuladas por doses baixas de radiação ionizante. O efeito dessas baixas doses no metabolismo de microrganismos, induz o aumento da respiração, a indução enzimática, a fotossíntese, a reprodução, o crescimento, a maturação e o desenvolvimento, a resistência à doenças e às doses letais de radiação e a média do tempo de vida. A Tabela 5. apresenta alguns conceitos de estimulação por baixas doses.

Tabela 5 – Conceitos de estimulação por baixas doses

Ano	Disciplina	Autor	Conceito
1500 aC	Medicina	Hatshepsut	Estímulo de venenos
1000 aC	Imunização	Chou	Vacinação contra a varíola
400 aC	Terapia	Hippocrates	Não aplicar dose fatal
1540	Farmácia	Paracelsus	A dose é tudo
1780	Medicina	Withering	Potenciais tóxicos
1878	Botânica	Bernard	Estresse constrói a força
1897	Botânica	Townsend	Trauma aumenta o crescimento das plantas
1888	Fermentação	Schulz	A lei de Arndt-Schulz
1906	Bacteriologia	Richet	Efeito oligodinâmico de metais
1908	Psicologia	Yerkes	A curva-U invertida
1919	Radiação	Davey	Doses Homeostáticas
1922	Medicina	Hahnemann	Cura por micro doses
1930	Toxicologia	Maximov	Tóxicos aumentam o crescimento vegetal
1930	Terapia	Merck	Índice terapêutico
1936	Radiação	Gager	Radiação aumenta o crescimento das plantas
1936	Fisiologia	Selye	Síndrome de adaptação geral (GAS)
1943	Entomologia	Southam	<i>Hormesis</i>
1946	Nutrição	Moore	Antibióticos estimulam o crescimento
1950	Radiação	Lorenz	Efeito de pseudo crescimento
1951	Imunologia	Taliaferro	Radiação aumenta a imunidade
1959	Toxicologia	Luckey	<i>Hormoligosis</i>
1960	Farmacologia	Townsend	A curva beta
1961	Bacteriologia	Jacob	Indução enzimática adaptativa
1988	Metabolismo	Heiby	O efeito inverso
1990	Neurotoxicidade	Davis	As funções em forma de U
1996	Cultura de células	Salone	Respostas de sobrevivência adaptativa (ASR)

Fonte: Luckey (1999).

A “Teoria *Hormesis*” tem sido observada e confirmada em experimentos ao longo dos anos, contudo são poucos os pesquisadores que se dedicam ao estudo deste fenômeno, tornando-o pouco aceito pela comunidade científica. Segundo Calabrese e Baldwin (1999), *hormesis* tem sido marginalizada devido a fatores como: a sua ligação histórica com a homeopatia, a escassez de mecanismos para explicar o efeito hormético, e falta de esforço para combater as visões críticas contra *hormesis*.

Segundo Mossman (2001), pessoas que propunham *hormesis* falharam em definir claramente o fenômeno ou desenvolver um consenso de como a *hormesis* deveria ser quantificada. Contudo, de acordo com Hendee et al. (1998), *hormesis* não pode mais ser ignorada porque existe evidência científica considerável para apoiar a teoria.

3.8 Extração lipídica

Lipídios são um grupo diverso de substâncias biológicas compostas principalmente por compostos apolares/neutros (triglicerídios, diglicerídios, monoglicerídios e esteróis) e por lipídios polares (ácidos graxos livres, fosfolipídios, e esfingolipídios) (SMEDES; ASKLAND, 1999; MANIRAKIZA; COVACI; SCHEPENS, 2001).

A extração dos lipídios é realizada com a utilização de solventes orgânicos (IVERSON; LANG; COOPER, 2001) por meio de um processo de transferência, dos quais os constituintes solúveis (o óleo) de um material inerte (a matriz graxa) são transferidos para o solvente com o qual a matriz está em contato (BRUM; ARRUDA; REGITANO-D'ARCE, 2009).

Os solventes para a extração dos lipídios devem demonstrar uma elevada solubilidade para todos os compostos lipídicos (SMEDES; ASKLAND, 1999). Em princípio, o solvente ou mistura de solvente deve ser suficientemente polar para remover os lípidos da sua associação com membranas celulares e componentes dos tecidos, mas também não tão polar que não dissolva prontamente todos os triacilglicerídeos e outros lípidos não polares (IVERSON; LANG; COOPER, 2001).

Franz Von Soxhlet, em 1879, foi o primeiro a desenvolver um aparelho para a extração de lipídios em matrizes graxas. Sua invenção ressaltou a importância do grau de trituração da amostra no que diz respeito à duração e eficácia do processo. As vantagens que esse método apresenta são: o contínuo contato da amostra com o solvente, temperatura relativamente alta durante o procedimento de extração, metodologia relativamente simples e ausência de necessidade de filtração da miscela ao final da extração (BRUM; ARRUDA; REGITANO-D'ARCE, 2009).

No entanto, por ser a amostra submetida à extração em um aparelho de vidro, com refluxo de solvente por muitas horas, é aconselhável que este procedimento seja evitado, pois favorece as reações de peroxidação e de hidrólise, comprometendo, assim, resultados analíticos posteriores, como por exemplo, a quantificação de componentes lipídicos ou não lipídicos (BRUM, 2004).

Um método universalmente utilizado para a extração lipídica e que supera as dificuldades citadas acima, é a metodologia de Bligh & Dyer (1959), uma versão simplificada do procedimento clássico proposto por Folch et al. (1957), utilizando clorofórmio e metanol (BRUM, 2004).

Folch et al. (1957) foram um dos primeiros pesquisadores a reconhecer que a extração, a partir de tecidos de lipídios, deve ser realizada com a utilização de vários solventes orgânicos, visto que os lipídios neutros são extraídos por solventes apolares e lipídios polares por solventes polares. Assim sendo, Folch et al. (1957) desenvolveram o chamado método “Folch”, um sistema de fases utilizando clorofórmio/metanol, seguido pela adição de solução de cloreto de potássio, para uma melhor separação das fases (BRUM; ARRUDA; REGITANO-D’ARCE, 2009). Este método continua a ser considerado o mais clássico e mais confiável para extrações quantitativas de lipídios (IVERSON; LANG; COOPER, 2001).

Contudo, em busca de um método mais rápido para a extração e purificação dos lipídios totais, Bligh & Dyer (1959) modificaram o método de Folch et al. (1957) (BRUM; ARRUDA; REGITANO-D’ARCE, 2009).

A metodologia de Bligh & Dyer tornou-se um dos métodos mais recomendados para a determinação de lipídios totais nos tecidos biológicos (SMEDES; ASKLAND, 1999), tornando-se ainda metodologia padrão para determinação de lipídios em estudo com peixes marinhos, assim como para outros tipos de amostras como, por exemplo, o leite (IVERSON; LANG; COOPER, 2001).

Esta técnica de extração apresenta algumas vantagens em relação ao procedimento por Soxhlet, e em relação às demais extrações com solventes. A metodologia de Bligh & Dyer permite a extração de todas as classes de lipídios, sendo eles neutros ou polares; apresenta melhor rendimento e qualidade do produto, e a técnica é mais rápida e não demanda grandes volumes de solventes (FELTES, 2006).

Além disso, no procedimento de Bligh & Dyer a integridade dos lipídios extraídos é preservada, uma vez que o procedimento é realizado a frio, permitindo que os lipídios sejam utilizados posteriormente para outras finalidades (VIÊGAS, 2010).

Tanto o procedimento de Folch et al. quanto o procedimento de Bligh & Dyer são aceitos como procedimentos padrões para a recuperação de lipídios totais. Ambos os métodos baseiam-se na utilização de clorofórmio e metanol para formação de um sistema monofásico para extrair e dissolver os lipídios. Um sistema bifásico é em seguida produzido, na fase de purificação, por meio da adição de água, levando-se à separação de compostos polares e não polares em uma fase superior e inferior, respectivamente (AXELSSON; GENTILI, 2014).

Contudo, segundo Brum, Arruda e Regitano-D’Arce (2009), quando houver interesse em uso posterior das frações lipídicas extraídas, recomenda-se o uso da metodologia de Bligh & Dyer, tanto para amostras de origem animal, quanto para as de origem vegetal.

4 METODOLOGIA

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Radiobiologia e Ambiente do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), e na Faculdade de Tecnologia de Piracicaba “Deputado Roque Trevisan”, Piracicaba – São Paulo.

4.1 Microrganismos e condições de crescimento

Foi utilizada linhagem de levedura *Yarrowia lipolytica* doada pelo laboratório de Ecologia Aplicada (CENA/USP). A levedura foi mantida em meio sólido YEPD (*yeast extract peptone dextrose*) composto em g L⁻¹ por: extrato de levedura 10; peptona 20; glicose 20; ágar 20 (BARNETT; PAYNE; YARROW, 1983). As placas foram armazenadas a 4°C e renovadas sempre que necessário para preparo do inóculo e manutenção dos cultivos, de acordo com metodologia descrita por Castanha (2012).

4.1.2 Criopreservação de células em freezer a -85°C

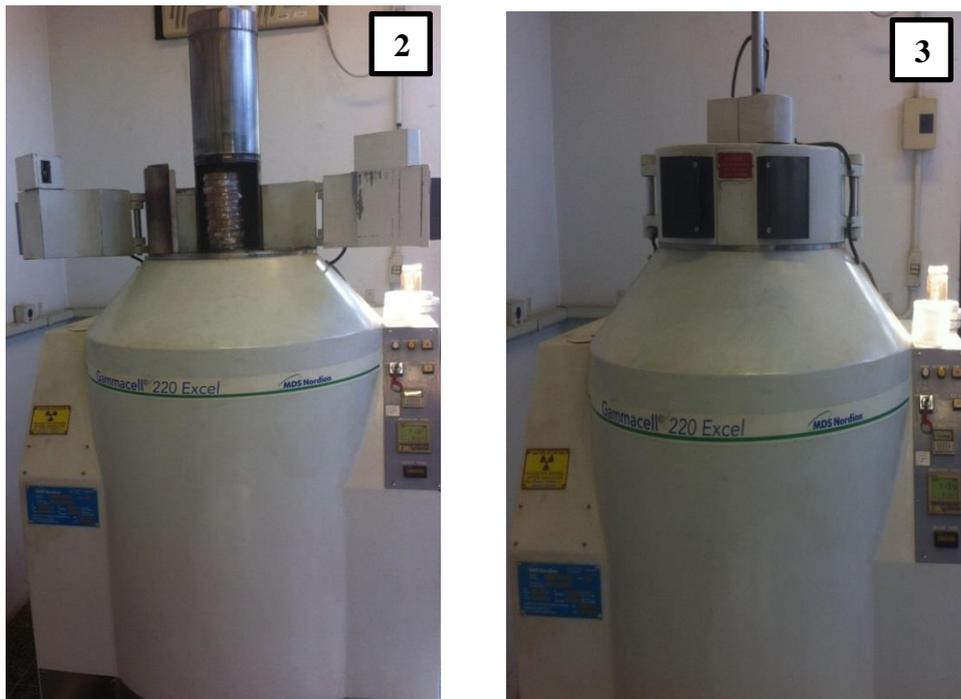
A criopreservação das células (processo em que células ou tecidos biológicos são preservados à temperaturas muito baixas, por meio de congelamento) em estoques de glicerol, foi preparada com a adição de glicerol puro estéril ao caldo de cultura (pellet de levedura), atingindo concentração final de glicerol de 30% (v/v). A suspensão de células foi em seguida armazenada em freezer -85°C (Sanyo MDF-U33V, *Ultra-low Temperature Freezer*) e reativada sempre que necessário (OCHOA-ESTOPIER; GUILLOUET, 2014).

4.1.3 Meio de crescimento do inóculo

O meio de crescimento da cultura para o preparo do inóculo foi o meio sólido YEPD, que foi autoclavado a 121°C e 1 atm por 15 minutos. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar (DMD Solutions), o meio foi vertido em placas de Petri. Em seguida, a levedura *Y. lipolytica* foi inoculada e incubada em BOD (*Biochemical oxygen demand* – Incubadora) a temperatura de 28°C (± 2°C), durante 2 dias (VICTORELLI, 2008).

4.2 Irradiação da levedura

Após 2 dias de incubação as leveduras foram irradiadas em uma fonte de Cobalto-60, tipo Gammacell-220 Excel, marca MDS Nordion, sob taxa de dose ao redor de 0,23 kGy/hora, nas doses de: 0 (controle); 0,3; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; e 2,5kGy, conforme mostra as Figuras 2 e 3.



Figuras 2 e 3 - Irradiador fonte de Cobalto-60 Gammacell-220 Excel usado na irradiação da levedura *Y. lipolytica*.

Ao final da irradiação, duas alçadas de leveduras, que estavam na placa, foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio líquido YEPD (10 gL^{-1} extrato de levedura; 20 gL^{-1} peptona; 20 gL^{-1} glicose). As leveduras foram crescidas por 24 horas, e então contadas em câmara de Neubauer para a determinação da viabilidade celular e escolha das doses de irradiação que não comprometeram a viabilidade da levedura e, por consequência, foram utilizadas para o cultivo em meio produtor de lipídios. A Figura 4 apresenta a observação microscópica da levedura *Y. lipolytica*, em câmara de Neubauer (sem o tratamento de irradiação).

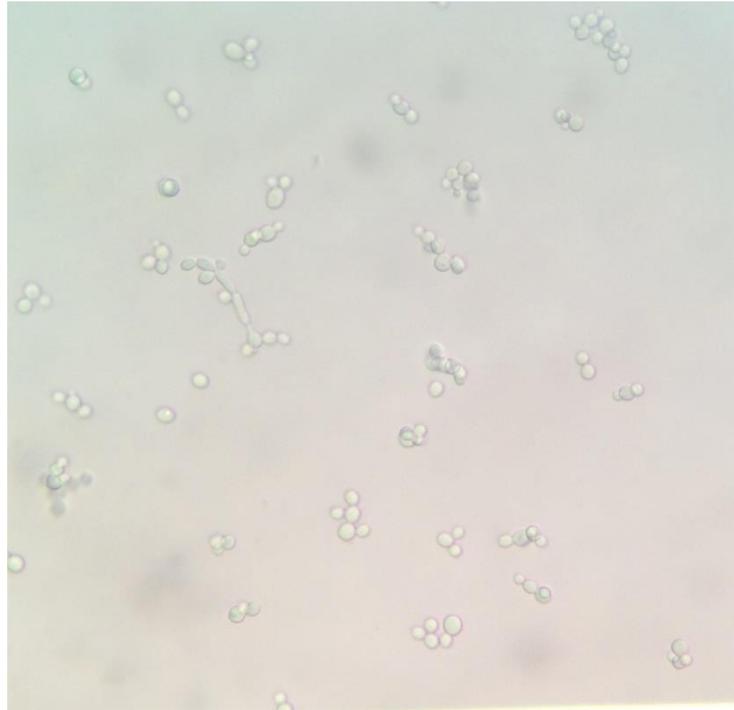


Figura 4 - Microscopia da levedura *Y. lipolytica* (aumento de 400 X)

4.2.1 Viabilidade Celular

A determinação da viabilidade celular foi realizada conforme metodologia de Pierce (1970) e Antonini (2004). A porcentagem de células vivas foi determinada por meio de exame á fresco da suspensão de leveduras, coradas com azul de metileno, em câmara de Neubauer espelhada (Figura 5).

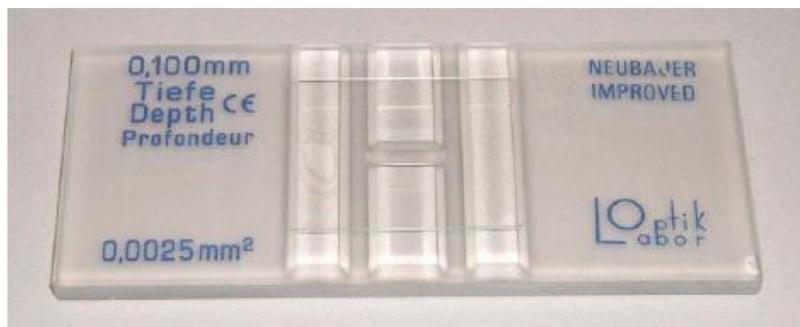


Figura 5 - Câmara de Neubauer

Fonte: Roepcke 2007.

Após diluições convenientes das amostras em tubos de ensaio, foram transferidos 100 µL da suspensão para tubo Eppendorf e adicionado 100 µL da solução de azul de metileno. A mistura foi homogeneizada em agitador de tubos, e um pequeno volume transferido para a câmara de Neubauer. A contagem foi procedida em microscópio óptico em objetiva de 40 vezes (aumento de 400 X).

Por este método, as células de leveduras viáveis permaneceram descoradas, enquanto as células mortas foram coradas de azul.

Os resultados para a viabilidade celular (expressos em porcentagem) e para o número total de células por/mL foram expressos pelas equações (1) e (2):

$$\text{Viabilidade Celular} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células vivas}}{\text{n}^\circ \text{ total de células}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{N}^\circ \text{ de células/mL} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de células}}{\text{n}^\circ \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000 \quad (2)$$

4.3 Preparo do meio de cultivo para a produção de lipídios

Para o preparo do meio produtor de lipídios foram utilizados vinhaça concentrada (40°Brix) e xarope de cana concentrado (70°Brix) doados pela Fazenda Areão – ESALQ.

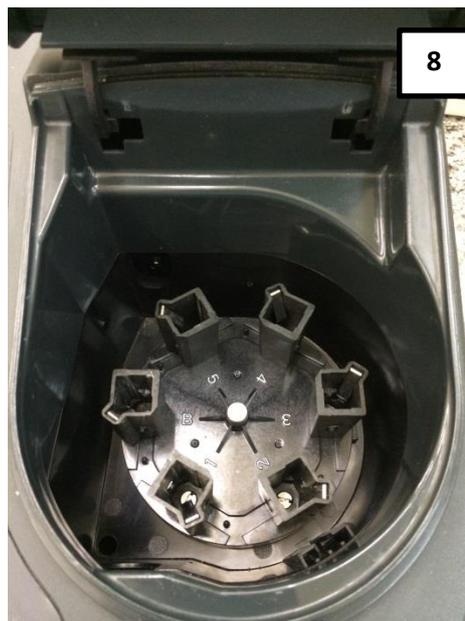
A vinhaça foi diluída a 1,77°Brix, (para que os valores ficassem próximos aos da vinhaça bruta), e o xarope de cana-de-açúcar diluído a 10°Brix e misturados na proporção de 30:30 (v/v) (CAZETTA; CELLIGOI, 2005). O pH foi ajustado para 6,5. Em frascos Erlenmeyers com capacidade de 125 mL, foram colocados 60 mL de meio, que foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C, em 1atm. Posteriormente, o meio foi inoculado com as leveduras irradiadas selecionadas e incubado em mesa agitadora (*Cientec*, CT-712), durante um período de 7, 14 e 21 dias, sob a temperatura 28°C (± 2°C), conforme a Figura 6. Os ensaios foram realizados em triplicata.



Figura 6 - Cultivo de *Y. lipolytica* em frascos agitados

4.4 Determinação da curva de crescimento e da curva de sobrevivência por Densidade Óptica (DO)

O crescimento da levedura *Y. lipolytica* (controle e irradiada) foi monitorado por meio da medição da densidade óptica 605nm (DO₆₀₅) em espectrofotômetro (*Thermo, Genesys 10 UV*, conforme Figuras 7 e 8), utilizando cubetas de 1 mL.



Figuras 7 e 8 - Espectrofotômetro *Thermo Genesys 10 UV* utilizado nas análises de curva de crescimento e curva de sobrevivência

As medições aconteceram durante 497 horas (aproximadamente 21 dias) sendo que, durante as primeiras 15 horas, as leituras aconteceram de 3 em 3 horas (para a determinação da curva de crescimento). Após 15 horas, as leituras foram realizadas de 24 em 24 horas, até completar os aproximados 21 dias (para obtenção da curva de sobrevivência).

Para a medição da densidade óptica, os meios de cultivo, contendo a levedura, foram diluídos em condições adequadas, resultando em valores iniciais de OD₆₀₅ em torno de 0,3 (RASCHKE; KNORR, 2009).

4.5 Determinação do peso seco

Após os períodos de incubação de 7, 14 e 21 dias, o conteúdo do frasco, composto pelo meio produtor de lipídios, foi centrifugado (centrifuga *Spencer*, modelo 80-2B) para a precipitação da biomassa. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (pellet da levedura) foi separado para a adição de *Skim Milk* 10% conforme metodologia de Day e Stacey (2007). As células separadas e já na presença de *Skim Milk* foram colocadas em frascos de vidro (previamente pesados) e levadas ao congelador -85°C (marca *Sanyo*, MDF-U33V) por no mínimo quatro horas e então avaliadas por gravimetria após liofilização (VICTORELLI, 2008).

4.5.1 Liofilização

A liofilização ocorreu em liofilizador (*Christ*, Alpha 2-4 LD plus) conforme Day e Stacey (2007). A amostra congelada foi levada sem tampa para o liofilizador, cuja técnica consiste em sublimar o gelo, passando do estado sólido para o gasoso.

Após a liofilização, o peso seco foi determinado em g de peso seco/L de fermentado segundo a metodologia descrita por Roepcke (2007), expressa na equação (3):

$$\text{Peso Seco (g/L)} = \frac{(\text{Peso tubo com a biomassa (g)} - \text{Peso tubo vazio (g)}) \times 1.000}{\text{Volume de fermentado utilizado (mL)}}$$

(3)

4.6 Extração de lipídios totais pelo método de Bligh & Dyer

A extração dos lipídios foi submetida pelo método de Bligh e Dyer (1959) adaptado por Smedes e Thomasen (1996).

A biomassa - média de 0,6 a 0,9 gramas – (Figura 9) foi misturada com 5 mL de clorofórmio e 10 mL de metanol e homogeneizada por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados mais 5 mL de clorofórmio e a amostra homogeneizada por mais 1 minuto. Após, adicionou-se mais 5 mL de clorofórmio e agitou-se por mais 1 minuto.



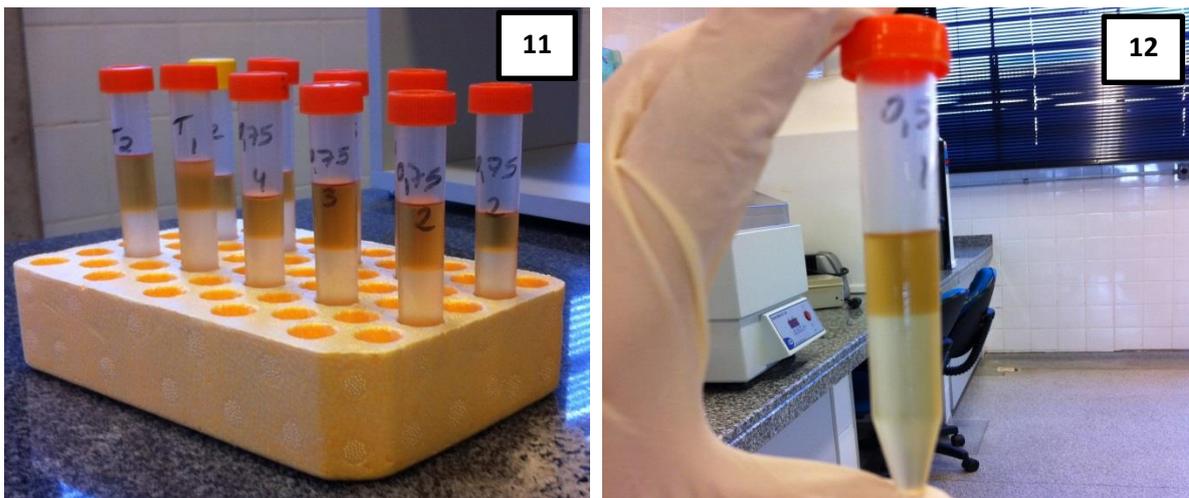
Figura 9 - Biomassa seca da levedura utilizada para a extração dos lipídios

Posteriormente, a amostra foi filtrada em funil pequeno com papel de filtro (Figura 10) para a separação dos sólidos presentes na amostra, o resíduo lavado com mais 5 mL de clorofórmio, e em seguida, foi adicionado 5 mL de KCl 1%.



Figura 10 - Extração lipídica: amostra filtrada para a separação dos sólidos presentes

Após a adição de KCl, o filtrado foi centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos para a separação das fases (Figuras 11 e 12). A camada aquosa superior contendo metanol, água e compostos não lipídicos foi separada e descartada. A camada clorofórmica inferior, contendo os lipídios, foi filtrada em papel filtro contendo 1g de sulfato de sódio anidro e recolhida em frascos âmbar previamente pesados, e levada à capela “overnight” para a evaporação do clorofórmio.



Figuras 11 e 12 - Amostras após centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos para separação das fases

Após a evaporação do clorofórmio, os lipídios foram pesados e calculados os rendimentos.

4.6.1 Determinação do conteúdo lipídico

O rendimento da extração lipídica foi calculado em termos de lipídios totais (%), eq. (4), segundo Castanha (2012) e em termos de rendimento lipídico (g L^{-1}), eq. (5), segundo Sitepu et al. (2014):

$$\text{Porcentagem de lipídios totais} = \frac{\text{peso dos lipídios (g)}}{\text{peso da amostra (g)}} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{Rendimento lipídico (g/L)} = \frac{(\text{Peso tubo com o lipídio (g)} - \text{Peso tubo vazio (g)}) \times 1.000}{\text{Volume de fermentado utilizado (mL)}} \quad (5)$$

4.7 Delineamento experimental e análise estatística

Para as análises de viabilidade celular e número de células mL^{-1} o delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado com 7 tratamentos e 3 repetições por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos a análises de variância com aplicação do teste F, e quando o valor de F foi significativo ao nível de 5%, a análise estatística teve continuidade através do teste Tukey para comparação de médias utilizando-se o sistema estatístico ASSISTAT versão 7.7 beta (SILVA, 2015).

Para as análises de determinação de curva de crescimento e curva de sobrevivência foi utilizado o delineamento estatístico inteiramente casualizado, com comparações múltiplas. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA One way) e ao teste de Brown-Forsythe ($p < 0,05$) para comparação de médias, utilizando-se o programa estatístico *GraphPad Prism* versão 6 (MOTULSKY, 1998).

Para as análises de produção de lipídios e biomassa o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, no fatorial 3 x 4, com 3 períodos de incubação, 4 doses de radiação gama e 3 repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparação de médias utilizando-se o sistema estatístico ASSISTAT versão 7.7 beta (SILVA, 2015).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Viabilidade Celular e Número de células mL⁻¹

Segundo Vieira e Fernandes (2012), a viabilidade celular é um método utilizado para estimar a proporção de células viáveis em uma cultura ou em um processo fermentativo. É um método de contagem direta simples e rápido, e que permite a observação morfológica das células. De acordo com Pierce (1970), as células com alta atividade fisiológica não se colorem de azul, enquanto que as células mortas (consideradas inativas) se colorem de azul.

A seguir, são apresentados na Tabela 6, os valores referentes à viabilidade celular e ao número de células mL⁻¹ para a amostra controle e para as amostras submetidas à radiação gama, e em seguida, as Figuras 13 e 14 ilustram os dados disponíveis na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores médios de viabilidade celular (%) e número de células mL⁻¹ para a levedura *Y. lipolytica* durante os tratamentos

Amostras	Viabilidade (%)	Nº de células mL ⁻¹
Testemunha	98,66 ^{a*} ± 0,133 ^{**}	10,5x10 ^{6a} ± 3,28 x10 ⁶
0,3 kGy	96,95 ^{ab} ± 0,930	9,6 x10 ^{6ab} ± 1,58 x10 ⁶
0,5 kGy	96,80 ^{ab} ± 0,346	6,6 x10 ^{6abc} ± 2,15 x10 ⁶
0,75 kGy	95,89 ^{ab} ± 0,790	5,4 x10 ^{6abc} ± 1,55 x10 ⁶
1,0 kGy	95,09 ^b ± 0,130	4,9 x10 ^{6bc} ± 2,14 x10 ⁶
1,25 kGy	86,03 ^c ± 2,627	4,7x10 ^{6bc} ± 0,41 x10 ⁶
2,5 kGy	66,91 ^d ± 0,67	3,5 x10 ^{6c} ± 1,63 x10 ⁶

*A médias seguidas por mesma letra, em colunas, não diferem significativamente segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Valores de média ± desvio padrão de triplicadas.

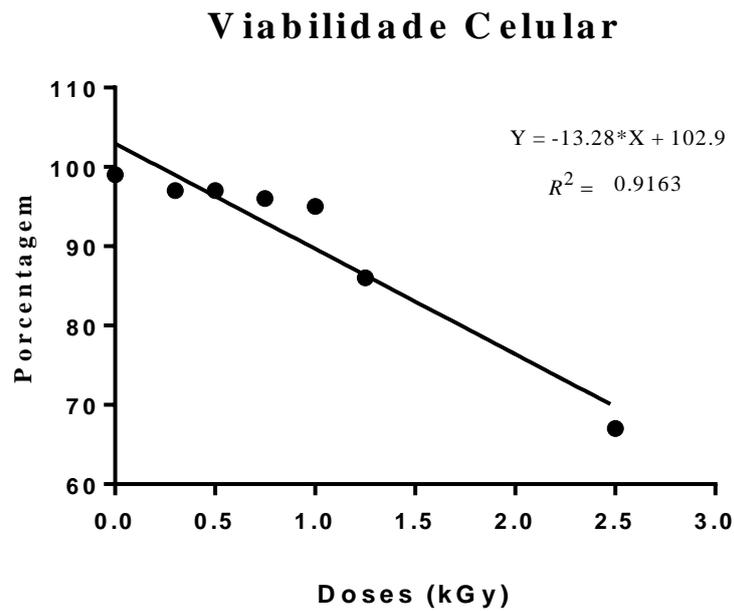


Figura 13 - Relação viabilidade celular (%) versus doses de radiação gama (kGy) para a levedura *Y. lipolytica*

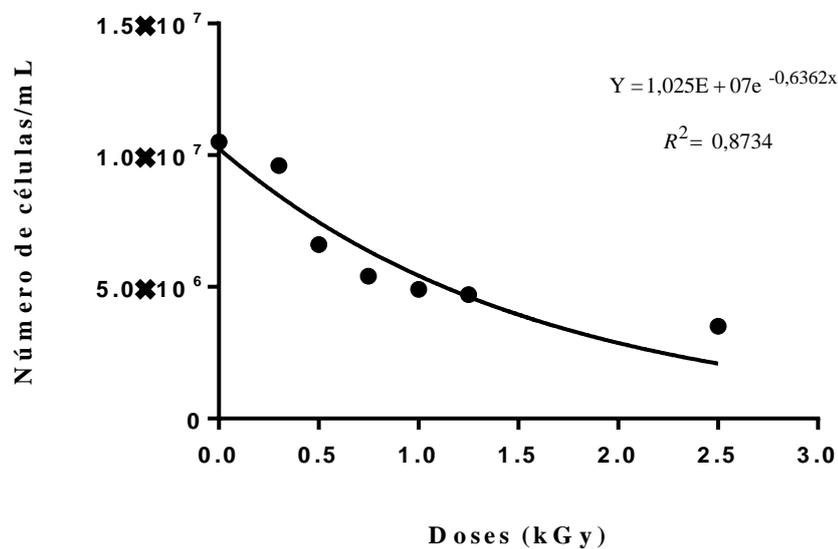


Figura 14 - Relação do número de células mL^{-1} versus doses de radiação gama (kGy) para a levedura *Y. lipolytica*

De acordo com os resultados observados na Tabela 6, as amostras tratadas com as doses de 0,3; 0,5 e 0,75 kGy não diferiram estatisticamente da amostra controle no que diz respeito a viabilidade celular e ao número de células mL⁻¹. A porcentagem de células vivas, entre essas amostras, variou entre 98,6% a 95,8%, e o número de células/mL entre 10,5x10⁶ a 5,4x10⁶, respectivamente.

Segundo Urbain (1986), a radiação apresenta dose letal para as leveduras entre 4,65 a 20 kGy. Ainda, segundo o mesmo autor, doses letais para leveduras do gênero *Candida*, variam entre 5,50 a 10,30 kGy.

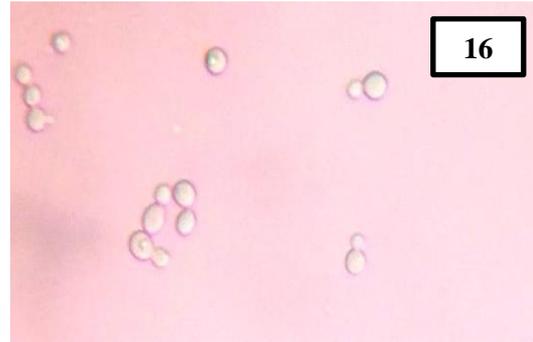
Levando-se em conta que por muito tempo a levedura *Y. lipolytica* foi classificada como *Candida*, e estimando que a dose letal para essa estirpe seja em torno de 5,50 kGy, conseguimos explicar o aumento da mortalidade da levedura *Y. lipolytica* e a diminuição do número de células/mL quando submetidas à doses mais elevadas de radiação gama, como por exemplo nas doses de 1,0; 1,25 e 2,5 kGy.

Segundo Aquino (2003), quando uma população de microrganismos é submetida a baixas doses de radiação, apenas algumas células morrem ou são danificadas. Conforme as doses são aumentadas a diminuição dos microrganismos ocorre exponencialmente. Assim sendo, se uma dada dose eliminar 1 log de microrganismos, 2 log serão eliminados se dobrarmos a dose de radiação (ABREU, 2006).

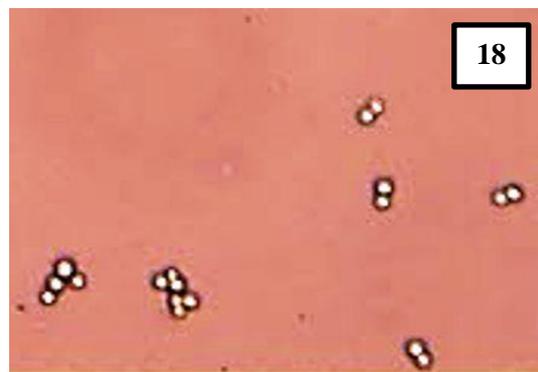
Observando as Figuras 13 e 14 podemos perceber a diminuição exponencial da viabilidade celular e do número de células/mL, conforme o aumento da radiação gama nas leveduras. Enquanto a amostra controle apresentou, aproximadamente, 100% de viabilidade e 10,5x10⁶ células por mL, as amostras subsequentes foram diminuindo gradativamente até 66,91% de viabilidade celular e 3,5 x10⁶ células por mL, quando submetidas a dose de 2,5 kGy.

Deste modo, levando-se em conta que as doses 0,3; 0,5; e 0,75 kGy não comprometeram a viabilidade das células das leveduras, foram avaliadas na segunda parte do trabalho, em meio produtor de biomassa e lipídios.

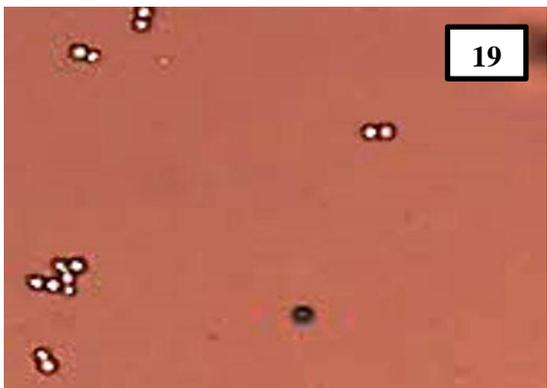
A seguir, as Figuras 15 a 28, representam a visualização da viabilidade celular da levedura *Y. lipolytica*, em microscópio óptico em objetiva de 40 vezes (aumento de 400 X).



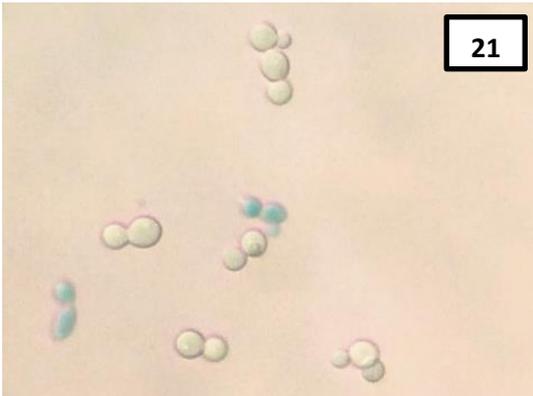
Figuras 15 e 16 - Microscopia da levedura *Y. lipolytica* (controle) visualizada em microscópio biológico trinocular (NOVA 180 iPL)



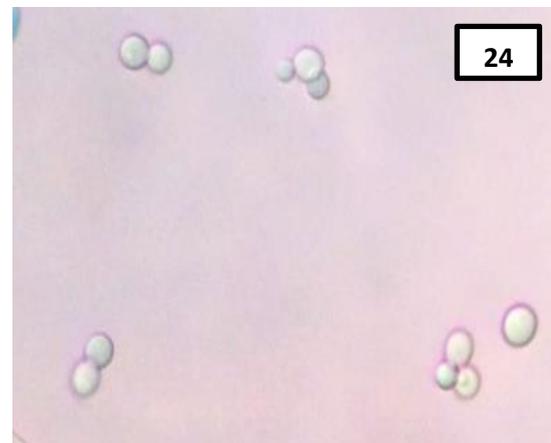
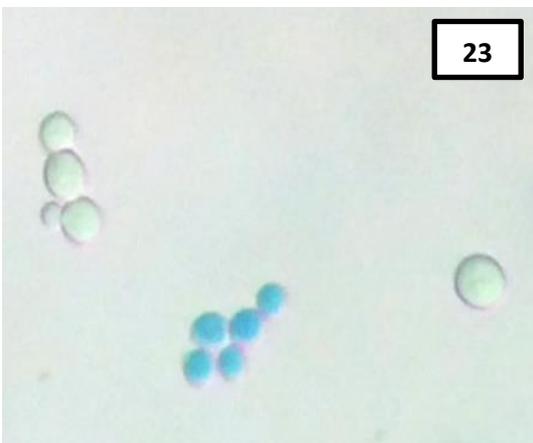
Figuras 17 e 18 - Microscopia da levedura *Y. lipolytica* (0,3 kGy) visualizada em microscópio Olympus BX41TF



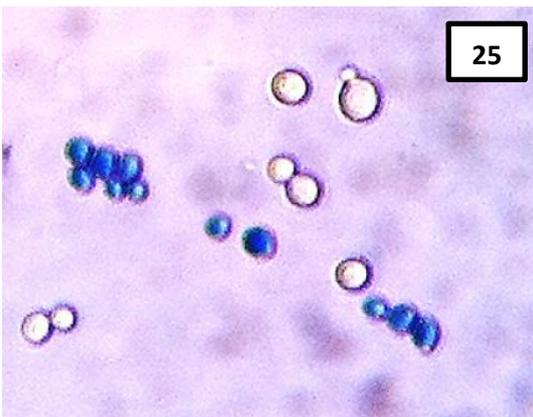
Figuras 19 e 20 - Microscopia da levedura *Y. lipolytica* (0,5 kGy) visualizada em microscópio Olympus BX41TF



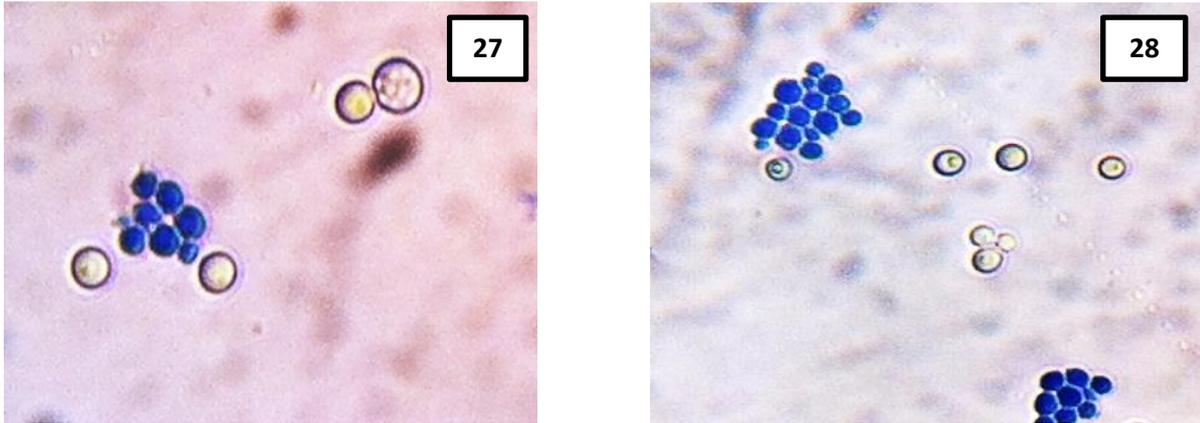
Figuras 21 e 22 - Microscopia da levedura *Y. lipolytica* (0,75 kGy) visualizada em microscópio biológico trinocular (NOVA 180 iPL)



Figuras 23 e 24 - Microscopia da levedura *Y. lipolytica* (1,0 kGy) visualizada em microscópio biológico trinocular (NOVA 180 iPL)



Figuras 25 e 26 - Microscopia da levedura *Y. lipolytica* (1,25 kGy) visualizada em microscópio biológico trinocular (NOVA 180 iPL)



Figuras 27 e 28 - Microscopia da levedura *Y. lipolytica* (2,5 kGy) visualizada em microscópio biológico trinocular (NOVA 180 iPL)

5.2 Determinação da curva de crescimento exponencial e da curva de sobrevivência por Densidade Óptica

Quando um microrganismo é inoculado em um meio com as necessidades nutricionais apropriadas, o seu crescimento segue uma curva definida e característica, tais como (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012):

- A- Fase lag: Durante essa fase ocorre pouca divisão celular. Os microrganismos ainda estão se adaptando ao meio;
- B- Fase exponencial (log): Fase de sucessivas divisões celulares, grande atividade metabólica;
- C- Fase estacionária: A divisão celular começa a diminuir, e a velocidade de crescimento é igual a velocidade de morte;
- D- Fase de morte: Meio pobre em nutrientes. Células mortas excedem o número de células vivas.

A Figura 29 exemplifica uma curva de crescimento microbiano composta pelas 4 fases.

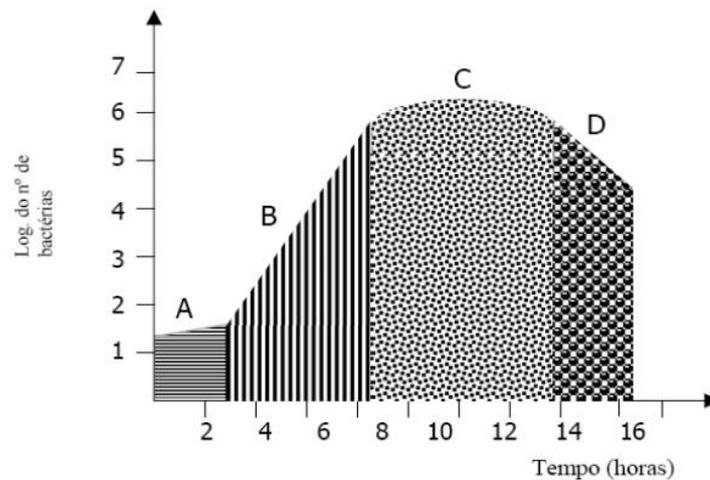


Figura 29 - Curva de crescimento microbiano
Fonte: Tortora, Funke e Case (2012)

Os resultados para a curva de crescimento e a curva de sobrevivência da levedura *Y. lipolytica* são exibidos nas Figuras 30 e 31, em forma de curva.

Observa-se que o crescimento da levedura *Y. lipolytica* (Figura 30) não foi afetado pela exposição à radiação, e os grupos tratados não diferiram entre si e em relação ao controle ($p > 0,05$).

A amostra controle manteve-se com maior crescimento durante as 15 horas de incubação, seguida pelas amostras 0,3; 0,5 e 0,75 kGy. Esses resultados, expressos em absorbância, estão expostos na Figura 30.

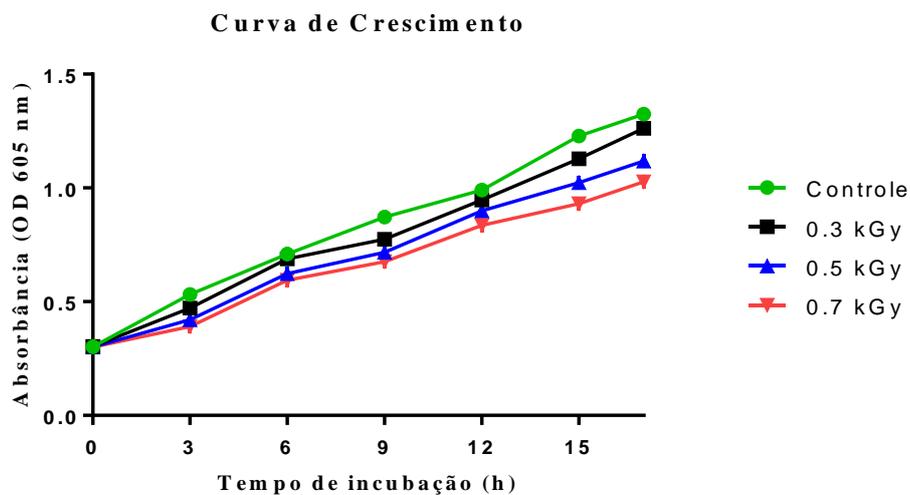


Figura 30 - Curva de crescimento da levedura *Y. lipolytica* de acordo com os tratamentos medidos em termos de densidade óptica

Assim como os resultados para curva de crescimento, também não houve diferença estatística significativa para as curvas de sobrevivência, quando estas foram submetidas à análise de variância (Anova “one way”) e teste Brown-Forsythe, no programa *GraphPad Prism*.

Observa-se, com base na Figura 31, que após 15 horas de leitura a amostra controle passa a crescer menos em relação à amostra 0,3 kGy. A amostra 0,75 kGy manteve-se durante maior tempo na fase estacionária, e por consequência, permaneceu com valores maiores de absorvância durante a fase de declínio (fase de morte). A amostra controle foi a amostra que obteve os menores valores de absorvância durante a fase de declínio, e conseqüentemente, uma maior diminuição das células vivas. O maior crescimento ocorreu para as amostras irradiadas a 0,3 kGy, durante toda a fase estacionária.

O resultado para curva de sobrevivência está exposto na Figura 31.

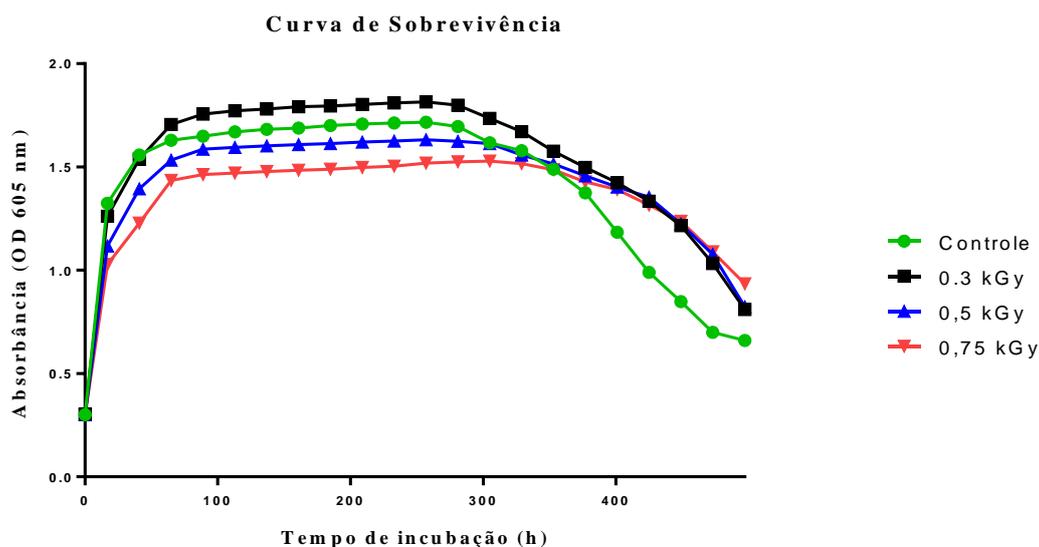


Figura 31 - Curva de sobrevivência da levedura *Y. lipolytica* de acordo com os tratamentos (n =3)

Segundo Luckey (1982) *radio-hormesis* é o estímulo positivo de um organismo quando submetido á baixas doses de radiação ionizante.

Com base nos resultados expostos, podemos observar que não foram detectados possíveis efeitos horméticos durante os estágios de crescimento da levedura *Y. lipolytica*. Alguns autores, no entanto, conseguiram comprovar esse efeito, ao submeter leveduras à um agente estressante.

Conforme descrito por Menegassi (1986), Atkinson (1898)⁵, foi o primeiro pesquisador a observar os efeitos positivos de baixas doses de radiação, em algas. As algas que receberam doses de radiação tiveram o crescimento acelerado, comparadas às testemunhas que não foram irradiadas.

Schulz (1888)⁶ observou o efeito hormético ao estimular o crescimento de levedura com aplicação de baixas doses de toxinas (CALABRESE, 2015).

Southam e Erlich (1943)⁷, também observaram o crescimento de leveduras, quando submetidas a baixas doses de um composto de casca de carvalho (CALABRESE, 2014).

Com base nos trabalhos dos autores acima citados, estudos posteriores devem ser realizados, a fim de se determinar doses de radiação gama capazes de causar estímulos ao crescimento de leveduras, quando administradas em baixas doses.

5.3 Produção de biomassa seca e lipídios:

A produção de biomassa e lipídios por leveduras é objeto de estudo e interesse de muitos pesquisadores nos últimos anos. Contudo, em 1878, Naegeli e Loew⁸ já relatavam a capacidade das leveduras em acumular lipídios, conforme descrito por Smedley-Maclean (1922).

No presente estudo, a Tabela 7. apresenta os valores médios obtidos para a produção de biomassa seca e para a produção de lipídios, ambos em função dos dias de incubação e das doses de radiação.

⁵ ATKINSON, G. F. Report upon some preliminary experiments with the Roentgen rays on plants. **Science**, Washington, DC, v. 7, n. 158, p. 7-13, 1898.

⁶ SCHULZ, H. Über Hefegifte. **Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere**, Heidelberg, v. 42, n. 1, p. 517-541, 1888.

⁷ SOUTHAM, C. M.; ERLICH, J. Effects of extracts of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. **Phytopathology**, Lancaster, v. 33, p. 517-524, 1943.

⁸ NAEGELI, C.; LOEW, O. Über die chemische Zusammensetzung der Hefe. **Journal für Praktische Chemie**, Leipzig, v. 17, 403-428, 1878.

Tabela 7 - Valores médios da produção de biomassa seca e lipídios em função dos dias de incubação e das doses de radiação

Fatores			
Dias de incubação (DI)	Biomassa seca (g/L)	Lipídios (g/L)	Lipídios (%)
7	11,84 ^{b*}	0,62 ^c	5,27 ^c
14	13,46 ^a	1,11 ^b	8,34 ^b
21	11,98 ^b	2,50 ^a	20,62 ^a
DMS (5%)	1,08680	0,30297	1,67136
Doses (D)			
Testemunha	12,03 ^{a*}	1,07 ^b	8,74 ^b
0,3 kGy	12,82 ^a	1,31 ^b	10,34 ^b
0,5 kGy	12,39 ^a	1,96 ^a	16,18 ^a
0,75 kGy	12,45 ^a	1,30 ^b	10,38 ^b
DMS (5%)	1,38646	0,38651	2,13221
Estatística (Teste F)			
Dias de incubação (DI)	8,4874 ^{**}	128,6400 ^{**}	294,3637 ^{**}
Doses (D)	0,8166 ^{ns}	14,8492 ^{**}	35,6979 ^{**}
Interação (DI) x (D)	0,9902 ^{ns}	24,6886 ^{**}	52,7045 ^{**}
CV%	8,58	21,08	14,37

^{ns} – Não significativo. ^{**} - Significativo ao nível de 1% de probabilidade. * Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV- coeficiente de variação. DMS – diferença mínima significativa.

5.3.1 Biomassa Seca

Não ocorreu diferença estatística significativa entre a interação dos dias de incubação (DI) versus as doses de radiação (D), como exemplificado na Tabela 8, por isso os fatores foram analisados separadamente.

Tabela 8 - Valores médios da interação entre dias de incubação (DI) versus doses de radiação (D) para a produção de biomassa seca (g/L)

Dias de incubação X Dose (DI X D)				
Dias	Doses			
	Controle	0,3 kGy	0,5 kGy	0,75 kGy
7	11,63±1,88*	11,44±0,42	12,27±1,54	11,99±1,014
14	13,40±1,42	14,44±0,09	13,05±1,11	12,94±0,59
21	11,08±0,57	12,56±0,41	11,86±1,08	12,43±1,15

*Média ± desvio padrão

Para a interação entre dias de incubação versus doses de radiação para a produção de biomassa seca, o F de interação não foi significativo.

De acordo com a Tabela 7, observou-se que não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre o fator “doses de radiação”, ou seja, as doses de radiação avaliadas não interferiram na produção de biomassa seca.

Entretanto, observou-se que o fator “dias de incubação” diferiu estatisticamente na produção da biomassa seca, a 95% de confiança, sendo a maior produção durante o 14° dia de incubação (13,46 g/L). O 7° e o 21° dia não diferiram entre si (11,84 e 11,98 g/L, respectivamente).

Os resultados de biomassa seca encontrados nesse trabalho foram superiores aos encontrados por alguns autores. Papanikolaou e Aggelis (2002) alcançaram a produção de 8,1 g/L de biomassa de uma linhagem de levedura *Y. lipolytica*, quando cultivada em meio contendo glicerol bruto, durante 160 horas (aproximadamente 7 dias).

Castanha (2012) avaliou a produção de biomassa por *Y. lipolytica*, crescida em soro de queijo por 10 dias, e obteve produção de 3,76 g/L de biomassa seca.

Valores maiores de biomassa seca foram encontrados por Machado Júnior (2010), 17,7 g/L, quando inoculou a levedura *Y. lipolytica* em temperatura de 25°C.

5.3.2 Lipídios (g/L)

Em relação aos desdobramentos da interação entre os dias de incubação versus as doses de radiação, a significância se fez presente para as amostras de lipídios totais (em g/L) e para as amostras de lipídios totais (em %).

Na Tabela 9 encontra-se o desdobramento da interação (DI) x (D) para a os valores de produção de lipídios totais (em g/L).

Tabela 9 - Valores médios da interação entre dias de incubação (DI) versus doses de radiação (D) para a produção de lipídios totais em (g/L)

Dias de incubação X Dose (DI X D)				
Dias	Doses			
	Controle	0,3 kGy	0,5 kGy	0,75 kGy
7	0,5650 ± 0,065 ^{*bA**}	0,6413 ± 0,101 ^{bA}	0,6543 ± 0,049 ^{bA}	0,6200 ± 0,082 ^{bA}
14	1,6907 ± 0,235 ^{aA}	0,7523 ± 0,165 ^{bb}	1,0547 ± 0,109 ^{bAB}	0,9543 ± 0,085 ^{bb}
21	0,9639 ± 0,119 ^{bc}	2,5433 ± 0,180 ^{ab}	4,1687 ± 0,778 ^{aA}	2,3150 ± 0,533 ^{ab}

*Média ± desvio padrão.

**Letras minúsculas iguais na coluna e maiúsculas iguais na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

De acordo com a Tabela 9, observou-se que as doses de radiação e a amostra controle, não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$) durante o período de 7 dias de incubação.

Durante 14 dias de incubação as amostras, controle e 0,5 kGy, não apresentaram diferença estatística significativa e foram as maiores produtoras de lipídios (1,69 e 1,054 g/L, respectivamente). As demais amostras não diferiram estatisticamente entre si e entre a amostra 0,5 kGy, mas diferiram em relação à amostra controle.

No 21º dia as amostras controle e 0,5 kGy diferiram estatisticamente entre si e entre as demais amostras, apresentando a primeira, o menor valor de lipídio produzido (0,96 g/L), e a última, a maior produção lipídica (4,17 g/L).

O maior período de produção de lipídios pela amostra controle ocorreu durante 14 dias de incubação, com produção de 1,69 g/L, apresentando diferença estatística significativa entre as demais amostras, a 95% de confiança.

Para as amostras, 0,3; 0,5; e 0,75 kGy, a maior produção lipídica ocorreu durante 21 dias de incubação, com produções de 2,5; 4,17 e 2,3 g/L, respectivamente, sendo este período de incubação diferente estatisticamente dos demais períodos (7 e 14 dias), a 95% de confiança.

Os resultados de lipídios obtidos nesse trabalho mostraram que os fatores dose de radiação (melhor dose: 0,5 kGy) e período de incubação (melhor período: 21 dias), trabalhados de maneira conjunta, podem influenciar no rendimento lipídico (4,17 g/L). Esse resultado se mostrou superior ao encontrado por Castanha (2012), que obteve 0,09 g/L de lipídios totais quando inoculou a levedura *Y. lipolytica* em soro de queijo.

Xue et al. (2006), também alcançaram resultados inferiores aos encontrados na presente análise, ao avaliar a produção de lipídio por *Rhodotorula glutinis* utilizando Glutamato de Sódio como fonte de carbono, no meio de cultivo. O rendimento obtido foi de 0,2 g/L.

Papanikolaou e Aggelis (2002) em meio utilizando glicerol industrial como fonte para o crescimento de *Y. lipolytica*, obtiveram rendimentos de até 3,5 g/L, mostrando-se próximo ao obtido no presente estudo.

Papanikolaou et al. (2002) avaliaram o crescimento da levedura *Y. lipolytica* em meio contendo estearina e glicerol, obtendo resultado de 2,8 g/L de lipídios, abaixo do obtido na presente análise.

Poli et al. (2014) avaliaram a produção de lipídios por *Y. lipolytica* QU21 em dois meios diferentes, o primeiro utilizando glicose como única fonte de carbono, e o segundo utilizando glicerol. Para o meio utilizando glicose a produção de lipídios foi 0,75 g/L, e para o meio de glicerol foi de 0,77 g/L, valores também abaixo dos obtidos no presente trabalho.

Observando os resultados de síntese lipídica e relacionando a sua produção, também com o meio de cultivo utilizado, percebemos que o reaproveitamento dos resíduos agroindustriais (xarope de cana e vinhaça) obtiveram valores superiores aos encontrados pelos autores a cima citados, e portanto se mostraram mais eficientes como fonte de nutrientes.

Segundo Tai e Stephanopoulos (2013), a produção de lipídio atinge os níveis mais altos durante a fase estacionária tardia, visto que as células já consumiram todos os nutrientes disponíveis, mas ainda existe excesso de carbono no meio. Quando ocorre a privação desses nutrientes, os esqueletos de carbono presentes no meio são desviados para outros metabolismos, no caso o metabolismo fermentativo, gerando produtos intermediários, como por exemplo, a síntese de ácidos graxos. Isso justifica a maior produção de lipídios totais (g/L), no presente estudo, ter ocorrido durante 21 dias de incubação.

Segundo Andrette (2007) os nutrientes disponíveis exercem ampla influência no ciclo de vida das leveduras. Dependendo das condições ambientais, as células podem ativar funções biológicas específicas que permitem as leveduras sobreviverem em situações desfavoráveis; ou retomarem o crescimento quando houver nutrientes disponíveis.

Na Tabela 10, é apresentado o desdobramento da interação (DI) x (D) para os valores de produção de lipídios totais (em %).

Tabela 10 - Valores médios da interação entre dias de incubação (DI) versus doses (D) de radiação para a produção de lipídios totais em (%)

Dias de incubação X Dose (DI X D)				
Dias	Doses			
	Controle	0,3 kGy	0,5 kGy	0,75 kGy
7	4,88 ± 0,27 ^{*cA**}	5,59 ± 0,71 ^{bA}	5,43 ± 1,16 ^{bA}	5,19 ± 0,74 ^{bA}
14	12,61 ± 0,71 ^{aA}	5,21 ± 1,18 ^{bb}	8,15 ± 1,4 ^{bb}	7,38 ± 0,71 ^{bb}
21	8,75 ± 1,5 ^{bC}	20,22 ± 0,78 ^{aB}	34,94 ± 3,42 ^{aA}	18,57 ± 3,28 ^{aB}

*Média ± desvio padrão.

**Letras minúsculas iguais na coluna e maiúsculas iguais na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

De acordo com a Tabela 10, observou-se que durante 7 dias de incubação, as amostras não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$) na porcentagem de lipídios totais, apresentando valores entre 4,88% a 5,59%.

Durante 14 dias de incubação o maior percentual de lipídios produzido foi 12,61% na amostra controle, diferindo estatisticamente das demais amostras.

No 21º dia o maior percentual de lipídio produzido foi 34,94% pela amostra irradiada a 0,5 kGy. Essa amostra diferiu estatisticamente das demais a 95% de significância pelo teste de Tukey.

O maior percentual lipídico produzido pela amostra controle ocorreu durante 14 dias de incubação, 12,61%, diferindo estatisticamente do 7º e do 21º dia.

Para as demais amostras, 0,3; 0,5; e 0,75 kGy, o maior percentual de lipídio produzido ocorreu durante 21 dias de incubação, 20,22%; 34,94% e 18,57%, respectivamente, sendo este período diferente estatisticamente dos demais períodos (7 e 14 dias), a 95% de confiança.

Segundo Ratledge (1996), as leveduras e os fungos são os principais microrganismos utilizados na síntese lipídica, e são considerados favoráveis aos interesses comerciais quando produzem de 20-25% de lipídios em relação à sua biomassa seca. Contudo, segundo o mesmo autor, algumas linhagens podem produzir até 40% de sua biomassa em lipídios.

Assim sendo, podemos considerar a levedura *Y. lipolytica*, utilizada nesse trabalho, como uma levedura oleaginosa, sendo que, o 21º dia se apresentou como o melhor período de incubação, e a amostra irradiada a 0,5 kGy melhor dose para a síntese lipídica. A junção desses dois fatores resultou em 34,94% de lipídios produzidos.

A levedura *Y. lipolytica* é objeto de estudo de diversos autores, entre eles Beopoulos (2009), e é conhecida por eles como uma levedura oleaginosa. Segundo Poli et al. (2013), *Rhodotorula glutinis*, *Rhodospiridium*, *Lipomyces starkeyi* e *Cryptococcus curvatus* são outros exemplos de leveduras oleaginosas.

Alguns autores testaram 600 espécies de leveduras oleaginosas, e apenas 30 delas foram capazes de acumular mais de 25% de lipídios em relação ao seu peso seco. Dentre essas 30, o gênero *Yarrowia* estava presente (TAPIA, 2012).

Blazek et al. (2014), desenvolveram uma plataforma capaz de reprogramar células de levedura para permitir que até 90% de sua biomassa seja convertida em lipídios. O trabalho foi iniciado utilizando-se uma cepa da levedura *Y. lipolytica*, que foi modificada geneticamente (tanto para remoção quanto para superexpressão de genes específicos); além disso, foram estudadas as condições ótimas de cultivo para a levedura. Diferente do método tradicional, que a levedura acumula óleo quando ocorre a privação de nitrogênio, na pesquisa desenvolvida as leveduras não precisam privar-se do nitrogênio para acumular óleo, e nem requerem ficar um período sem alimento. Isso é extremamente vantajoso, visto que em processos industriais, a produção não para. A equipe aumentou a produção de lipídio em quase 60 vezes em relação ao ponto de partida.

Segundo o mesmo autor, a utilização de células de leveduras para a produção de biodiesel é vantajosa, visto que as leveduras podem ser facilmente cultivadas, não competem por recursos naturais como a terra (que são utilizadas para o cultivo de alimentos) e são fáceis de serem manipuladas e alteradas geneticamente.

De acordo com Castanha (2012), as leveduras acumulam quantidades significativas de lipídios durante a fase estacionária de crescimento. Em seu trabalho, os maiores rendimentos obtidos foram após longo tempo de fermentação, por mais de 300 horas, o que justifica o maior percentual lipídico, do presente trabalho, ter ocorrido após 336 horas (14 dias).

Como citado anteriormente na revisão de literatura, *hormesis* é um fenômeno de dose-resposta, em que doses baixas de uma atividade estressante estimulam respostas adaptativas que aumentam a função e a resistência do organismo celular (CUTTNER; POLLYCOVE, 2009).

A radiação é um exemplo de agente estressante que vem sendo objeto de estudo de alguns autores nos últimos anos. Ao submeter um organismo vivo à doses de radiação ionizante, efeitos benéficos são estimulados, causando algum benefício aos mesmos.

Segundo Calabrese (2005) uma resposta sobrecompensatória pode ocorrer com a ruptura da homeostase (superação, efeito rebote), resultando em estímulos ao metabolismo dos microrganismos (LUCKEY, 1999).

Assim sendo, podemos concluir que o aumento na produção de lipídios, ocorrido durante 21 dias pela amostra irradiada a 0,5 kGy é resultado de um processo adaptativo, causado por uma atividade estressante (radiação), resultando em uma maior síntese lipídica.

6 CONCLUSÕES

- Não foi identificado efeito hormético durante as análises de crescimento e sobrevivência da levedura, para as doses avaliadas;

- As doses não interferiram na produção de biomassa seca pela levedura;

- O período de incubação interferiu na produção de biomassa, sendo o 14º dia, o melhor período;

- A síntese lipídica foi afetada tanto pelo período de incubação, quanto pelo uso da radiação. O período ideal para incubação foi durante 21 dias e com amostras irradiadas a 0,5 kGy. Estimulações ocorreram ao submeter a levedura a esse tratamento. Assim, conclui-se, que apenas durante a produção de lipídios foi possível avaliar o efeito hormético.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pesquisas futuras, que objetivem avaliar as proporções ideais de cada subproduto no meio de cultura, e a utilização de outras doses de radiação, podem obter melhores resultados no crescimento, na síntese lipídica e na produção de biomassa.

REFERÊNCIAS

- ABREU, V. K. G. **Efeito da radiação gama sobre a redução de microrganismos patogênicos, a estabilidade dos lipídios e as características sensoriais em caudas de camarões congelados**. 2006. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- ADAMS, M. R.; MOSS, M. R. **Microbiología de la Conservación de los Alimentos**. Zaragoza: Acribia, p. 88-98, 1995.
- AGEITOS, J. M.; VALLEJO, J. A; VEIGA-CRESPO, P.; VILLA, T. G. Oily yeasts as oleaginous cell factories. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 90, n. 4, p. 1219-1227, 2011.
- ANDRETTE, R. O. **Estudo de dinâmica populacional em uma cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae* sob a ação de radiações ionizantes**. 2007. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas/ Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- ANTONINI, S. R. C. **Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria**. Araras: Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, 2004. 33 p.
- AQUINO, S. **Efeitos da radiação gama no crescimento de *Aspergillus flavus* produtor de aflatoxinas e no emprego da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de grãos de milho inoculadas artificialmente**. 2003. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2003.
- ARAÚJO, L. F.; DIAS, M. V. C.; BRITO, E. A.; JUNIOR, S. O. Enriquecimento protéico de alimentos por levedura em fermentação semissólida: alternativa na alimentação animal. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 3, n. 3, p. 47-53, 2009.
- AXELSSON, M.; GENTILI, F. A Single-Step method for rapid extraction of total lipids from green microalgae. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 2, p. 1-6, 2014.
- BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. Cambridge: University Press, 1983. 811 p.
- BARTH, G.; GAILLARDIN, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 19, p. 219-237, 1997.
- BEKATOROU, A.; PSARIANOS, C.; KOUTINAS, A. A. Production of food grade yeasts. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 44, n. 3, p. 407-415, 2006.
- BELLUCO, A. E. S. **Obtenção de leveduras vivas enriquecidas para suplementação nutricional e probiótico**. 2008. 96 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- BEOPOULOS, A.; CHARDOT, T.; NICAUD, J-M. *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. **Biochimie**, Paris, v. 91, p. 692-696, 2009.

BEOPOULOS, A.; NICAUD, J. M.; GAILLARDIN, C. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 90, p. 1193-1206, 2011.

BEOPOULOS, A.; CESCUT, J.; HADDOUCHE, R.; URIBELARREA, J. H.; JOUVE, C. M.; NICAUD, J. M. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 48, p. 375-387, 2009.

BLAZECK, J.; HILL, A.; LIU, L.; KNIGHT, R.; MILLER, J.; PAN, A.; OTOUPAL, P.; ALPER, H. S. *Yarrowia lipolytica* lipogenesis to create a platform for lipid and biofuel production. **Nat Commun**, London, v. 5, p. 3131, 2014.

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

BOURGEOIS, C. M.; LARPENT, J. P. **Microbiologia alimentar**. v. 2: Fermentaciones alimentarias. Zaragoza: Acribia, 1995. p. 19-29.

BRUM, A. A. S. **Métodos de extração e qualidade da fração lipídica**. 2004. 79 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; REGITANO-D’ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 849-854, 2009.

CALABRESE, E. J. Paradigm lost, paradigm found: The re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences. **Environmental Pollution**, London, v. 138, p. 378-411, 2005.

CALABRESE, E. J. Hormesis: a fundamental concept in biology. **Microbial Cell**, Graz, v. 1, n. 5, p. 145-149, 2014.

CALABRESE, E. J. Historical foundations of hormesis. **Homeopathy**, Edinburgh, v. 104, p. 83-89, 2015.

CALABRESE, E. J.; BALDWIN, L. A. Hormesis: U-shaped dose responses and their centrality in toxicology. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v. 22, n. 6, p. 285-291, 2001.

CALABRESE, E. J.; COOK, R. The importance of hormesis to public health. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 114, n. 11, p. 1631-1635, 2006.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **The fungi**. San Diego: Academic Press, 2001. 588 p.

CASTANHA, R. F. **Utilização de soro de queijo para a produção de lipídeos por leveduras oleaginosas**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C. Aproveitamento do melão e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para a produção de biomassa protéica e lipídica por leveduras e bactéria. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 105-112, 2005.

CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C. Estudo de diferentes combinações de melão/vinhaça como substrato para produção de proteínas e lipídios por microrganismos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 3-10, 2006.

CELLIGOI, M. A. P. C. **Produção de triglicérides, fosfolipídios e esteróis por leveduras isoladas de diferentes nichos ecológicos**. 1993. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1993.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; ESCHER, J. P.; CORREIA, J. E.; MARINHO, J. F. U.; FONTANETTI, C. S. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management**, Amsterdam, v. 33, p. 2752-2761, 2013.

CRUZ, J. M.; DOMINGUEZ, J. M.; DOMINGUEZ, H. Dimorphic behavior of *Debaryomyces hansenii* grown on barley bran acid hydrolyzates. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 22, n. 7, p. 605-610, 2000.

COCA, M.; BARROCAL, V. M.; LUCAS, S.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; GARCÍA-CUBERO, M. T. Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media. **Food and Bioproducts Processing**, Amsterdam, v. 94, p. 306-312, 2015.

CUTTLE, J. M.; POLLYCOVE, M. Nuclear energy and health. And the benefits of low-dose radiation hormesis. **Dose-Response: An International Journal**, Amherst, v. 7, p. 52-89, 2009.

DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Ed.). **Cryopreservation and freeze-drying protocols**. Methods in molecular biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2007. 347 p.

DELGADO, A. A.; DELGADO, A. P. **Produção do açúcar mascavo, rapadura e melado**. Piracicaba, SP: A.A. Delgado, 1999. 154 p.

DIEHL, J. F. **Safety of irradiated foods**. 2.ed. revised and expanded. New York, N. Y.: Marcel Dekker Inc., p. 91-115, 1995.

DOMARCO, R. E.; SPOTO, M. H. F.; WALDER, J. M. M.; BLUMER, L.; MATRAIA, C. Efeitos do tratamento combinado de irradiação gama e refrigeração no crescimento de levedura (*Saccharomyces cerevisiae* Hansen) em suco de laranja. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 53, n. 1, p. 14-19, 1996.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J. Ç.; STRUB, C.; SCHORR-GALINDO, S. Single cell oils (SCOs) from oleaginous yeasts and moulds: Production and genetics. **Biomass and Bioenergy**, Amsterdam, v. 68, p. 135-150, 2014.

DOWD, S. B.; TILSON, E. R. **Practical radiation protection and applied radiobiology**. 2.ed. Philadelphia, P. A.: Saunders Company, 1999.

DYAL, S. D.; NARINE, S. S. Implications in the use of *Mortirella* fungi in the industrial production of essential fatty acids. **Food Research International**, Barking, v. 38, p. 445-467, 2005.

ERNANDES, F. M. P. G.; BOSCOLO, M.; CRUZ, C. H. G. Influência da composição do meio para a produção de Influência da composição do meio para a produção de etanol, por etanol, por *Zymomonas mobilis*. **Acta Scientiarum. Technology**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 21-26, 2010.

FELTES, M. M. C. **Estudo da síntese química e enzimática de triglicerídios estruturados a partir de óleo de peixe**. 2006. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

FELTRIN, V. P.; SANT'ANNA, E. S.; PORTO, A. C. S.; TORRES, R. C. O. Produção de *Lactobacillus plantarum* em melaço de cana-de-açúcar. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 43, n. 1, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89131999000200015>>. Acesso em: 07 jul. 2014.

FERRAZ JÚNIOR, A. D. N.; WENZEL, J.; ETCHEBEHERE, C.; ZAIAT, M. Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 39, p. 16852-16862, 2014.

FERREIRA, O. E. **Aproveitamento de subprodutos agroindustriais para a produção de amilases fúngicas**: Estudo de parâmetros fermentativos e caracterização das enzimas. 2009. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation on the purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

FREIRE, W. J.; CORTEZ, L. B. **Vinhaça de cana de açúcar**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2000. 203 p. (Série Engenharia Agrícola, v. 1).

GIOELLI, L. A. Óleos e gorduras vegetais: composição e tecnologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 5, n. 2, p. 211-232, 1996.

GUTIERREZ, L. E. **Bioquímica de leveduras**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/USP, 1997. 270 p.

HAULY, M. C. de O.; OLIVEIRA, A. R. de; OLIVEIRA, A. S. Produção de ácido lático por *Lactobacillus Curvatus* em melaço de cana-de-açúcar. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, p. 133-142, 2003.

HENDEE, W. R.; CAMERON, J. R.; MOULDER, J. E. Proposition: radiation hormesis should be elevated to a position of scientific respectability. **Medical Physics**, Lancaster, v. 25, n. 8, p. 1407–1410, 1998.

HUNTER, K.; ROSE, A. H. Lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae* as influenced by growth temperature. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 260, p. 639-653, 1972.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA), **Radiation Biology: A Handbook for Teachers and Students**, Vienna, 2010.

IVERSON, S. J.; LANG, S. L.; COOPER, M. H. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. **Lipids**, Chicago, v. 36, n. 11, p. 1283-1287, 2001.

KAPPKE, J. **Estudo dos danos provocados pela radiação gama em células de *E. coli***. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

KAWASSE, F. M.; AMARAL P. F.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; AMARAL, A. L.; FERREIRA, E. C.; COELHO, M. A. Z. Morphological analysis of *Yarrowia lipolytica* under stress conditions through image processing. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 25, p. 371-375, 2003.

KITCHA, S.; CHEIRSILP, B. Enhancing Lipid production from crude glycerol by newly isolated oleaginous yeasts: strain selection, process optimization, and fed-batch strategy, **BioEnergy Research**, Heidelberg, v. 6, p. 300-310, 2013.

KURZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts**. A Taxonomic Study. 4. ed. Amsterdam: Elsevier Science, 1998. 1055 p.

LAIME, E. M. O.; FERNANDES, P. D.; OLIVEIRA, D. C. S.; FREIRE, E. A. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 5, n. 3, p. 16-29, 2011.

LAPPA, K.; KANDYLIS, P.; BEKATOROU, A.; BASTAS, N.; KLAUDATOS, S.; ATHANASOPOULOS, N.; KANELLAKI, M.; KOUTINAS, A. A. Continuous acidogenesis of sucrose, raffinose and vinasse using mineral kissiris as promoter. **Bioresource Technology**, Essex, v. 188, p. 43-48, 2015.

LIANG, Y.; CUI, Y.; TRUSHENSKI, J.; BLACKBURN, J.W. Converting crude glycerol derived from yellow grease to lipids through yeast fermentation. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101 p. 7581-7586, 2010.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia: tecnologia das fermentações**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1975.

LIMA, U. A.; SATO, S. Produção de lipídios por microrganismos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Org.). **Biotecnologia industrial**. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2001. cap. 16, p. 447-463, 2001.

LUDOVICE, M. T. F. **Estudo do efeito poluente da vinhaça infiltrada em canal condutor de terra sobre lençol freático**. 1997. 143 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

LUCKEY, T. D. Hormesis with ionization radiation. **Nuclear Science and Engineering**, New York, v. 82, n. 3, p. 365-366, 1982.

LUCKEY, T. D. Radiation hormesis overview. **RSO Magazine**, Silver Spring, v. 8, n. 4, p. 22-41, 1999.

LUCKEY, T. D. Radiation hormesis: The good, the bad, and the ugly. **Dose-Response: An International Journal**, Amherst, v. 4, n. 3, p. 169-190, 2006.

MACHADO JÚNIOR, F. R. S. **Conversão por via biotecnológica de glicerina residual em biomassa de leveduras como fonte de proteínas e lipídios**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2010.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004. 608 p.

MARTINS, F. F. **Fisiologia e quantificação de lipídios por citometria de fluxo em *Yarrowia lipolytica***. 2013. Dissertação (Mestrado) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

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

MATSAKAS, L.; STERIOTI, A.-A.; ROVAA, U.; CHRISTAKOPOULOS, P. Use of dried sweet sorghum for the efficient production of lipids by the yeast *Lipomyces starkeyi* CBS 1807. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 62, p. 367-372, 2014.

MENEGASSI, J. **A radioatividade e o homem**. Vienna: IAEA, 1986. (INIS-BR, 944). Disponível em: http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/19/031/19031926.pdf. Acesso em: 09 out. 2015.

MENEZES, T. J. B. **Etanol: o combustível do Brasil**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980.

METTLER JUNIOR, F. A.; UPTON, A. C. **Medical effects of ionizing radiation**. 2ed. Philadelphia, P. A. Saunders Company, 1995.

MONK, J. D.; BEUCHAT, L. R.; DOYLE, M. P. Irradiation Inactivation of Food-borne Microorganisms. **Journal of Food Protection**., Ames, v. 58, n. 2, p. 197-208, 1995.

MORAES, B. S.; JUNQUEIRA, T. L.; PAVANELLO, L. G.; CAVALETT, O.; MANTELATTO, P. E.; BONOMI, A.; ZAIAT, M. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense? **Applied Energy**, London, v. 113, p. 825-835, 2014.

MORAES, B. S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 44, p. 888-903, 2015.

MOSSMAN, K. L. Deconstructing radiation hormesis. **Health Physics**, New York, v. 80, n. 3, p. 263-269, 2001.

MOTULSKY, H. **GraphPad Software**. The GraphPad guide to comparing dose-response or kinetic curves. San Diego. CA: GraphPad Software Inc., 1998.

MUBARAK, M.; SHAIJA, A.; SUCHITHRA, T. V. A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. **Algal Research**, Amsterdam, v. 7, p. 117-123, 2015.

NITAYAVARDHANA, S.; ISSARAPAYUP, K.; PAVASANT, P.; KHANAL, S. K. Production of protein-rich fungal biomass in an airlift bioreactor using vinasse as substrate. **Bioresource Technology**, Essex, v. 133, p. 301-306, 2013.

OCHOA- ESTOPIER, A.; GUILLOUET, S. E. D-stat culture for studying the metabolic shifts from oxidative metabolism to lipid accumulation and citric acid production in *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 170, p. 35-41, 2014.

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. São Paulo: Manole, 2006.

OKUNO, E. Radiação Ionizante. **Ciência Hoje**, Brasil, v. 7, n. 40, p. 20-21, 1988.

OKUNO, E. Efeitos biológicos das radiações ionizantes: acidente radiológico de Goiânia. **Estudos Avançados** (USP. Impresso), v. 27, p. 185-200, 2013.

OLIVEIRA, F. C. C.; SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS, W. L. P. Biodiesel: possibilidades e desafios. **Química Nova na Escola**, São Paulo, n. 28, p. 3-8, 2008.

OLIVEIRA, L. C. D. **Sistema agroindustrial de cachaça de alambique** – Estudo técnico das alternativas de aproveitamento da cana-de-açúcar. Belo Horizonte: SEBRAE, 2004.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. **Bioresource Technology**, Essex, v. 82, p. 43-49, 2002.

PAPANIKOLAOU, S.; CHEVALOT, I.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivate of animal fat in batch cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 58, p. 308-312, 2002.

PASTERIS, S. E.; STRASSER DE SAAD, A. M. Characterization of glycerol kinase and NAD-independent glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Pediococcus pentosaceus* N5p. **Letters in Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 27, p. 93-97, 1998.

PATEL, A.; PRAVEZ, M.; DEEBA, F.; PRUTHI, V.; SINGH, R. P.; PRUTHI, P. A. Boosting accumulation of neutral lipids in *Rhodospiridium kratochvilovae* HIMPA1 grown

on hemp (*Cannabis sativa* Linn) seed aqueous extract as feedstock for biodiesel production. **Bioresource Technology**, Essex, v. 165, p. 214-222, 2014.

PEREIRA JUNIOR, N.; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. **Tecnologia de bioprocessos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Escola de Química, UFRJ, 2008. 62 p. (Séries em Biotecnologia, v. 1).

PINHEIRO, D. M.; PORTO, K. R. A.; MENEZES, M. E. S. **A química dos alimentos: carboidratos, lipídeos, proteínas, vitaminas e minerais**. Maceió: Edufal, 2005. 52 p. (Conversando sobre Ciências em Alagoas).

PIERCE, J. S. Institute of Brewing: Analysis committee measurement of yeast viability. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 76, n. 5, p. 442-443, 1970.

PINTO, G. L. **Produção de melado a partir de caldo de cana**. 1982. 38 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1982.

POLI, J. S.; DALLÉ, P.; SENTER, L.; MENDES, S.; RAMIREZ, M.; VAINSTEIN, M. H.; VALENTE, P. Fatty acid methyl esters produced by oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* QU21: an alternative for vegetable oils. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 11, n. 2, p. 203-208, 2013.

POLI, J. S. **Otimização da produção e caracterização do óleo microbiano produzido pela levedura *Yarrowia lipolytica* QU21**. 2014. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

POTTER, N. N.; HOTCHKISS, J. H. **Food science**. 5.ed. New York: An Aspen Publication, 1995, 608p.

PRADA, S. M.; GUEKEZIAN, M.; SUÁREZ-IHA, M. E. V. Metodologia analítica para a determinação de sulfato em vinhoto. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 249-252, 1998.

RADOMYSKY, T.; MURANO, E. A.; OLSON, D. G.; MURANO, P. S. Elimination of pathogens of significance in food by low-dose irradiation. **Journal of Food Protection**., Des Moines, v. 57, n. 1, p. 73-86, 1994.

RAMBLA, M. A. O.; PRADA, A R.; COOPAT, T. S.; CARRACEDO, G. B. Méis. In: INSTITUTO CUBANO DE PESQUISAS DOS DERIVADOS DA CANA-DE-AÇÚCAR. **Manual dos derivados da cana-de-açúcar**. Brasília, DF: ABIPTI, 1999. cap. 2.4, p. 49-55.

RASCHKE, D.; KNORR, D. Rapid monitoring of cell size, vitality and lipid droplet development in the oleaginous yeast *Waltomyces lipofer*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 79, p. 178-183, 2009.

RATLEDGE, C. Microorganisms for lipids. In: MEESTERS, P. A.; HUIJBERTS, G. N. High-cell density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 45, n. 5, p. 575-579, 1996.

RIBEIRO, L. D. M. **Avaliação da aplicação e do desenvolvimento do Programa 5 “s” no setor de manutenção industrial de uma usina de processamento de cana-de-açúcar.** 2009. 123 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Botucatu. Botucatu, 2009.

RIBEIRO, J. M.; MELO, N. F.; COELHO, A. K. N. S.; PINTO, M. S. T. Desenvolvimento *in vitro* de bananeira (*musa spp.*) cv. maçã em meio nutritivo a base de melado de cana-de-açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 22., 2012, Bento Gonçalves, RS. **Anais...** Bento Gonçalves: SBF, 2012.

ROCHA, M. H. Avaliação da eco-eficiência ambiental da vinhaça para diferentes formas de disposição aplicando ACV. In: WORKSHOP DE GESTÃO DE ENERGIA E RESÍDUOS NA AGROINDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA, 2., 2007, Pirassununga. Pirassununga: FZEA/USP, 2007.

ROEPCKE, C. B. S. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de biomassa de levedura rica em zinco orgânico.** 2007. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

ROSSETTO, R.; DIAS, F. L. F.; VITTI, A. C.; PRADO JÚNIOR, J. P. Q. Fósforo. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. **Cana-de-açúcar.** Campinas: Instituto Agrônomo, 2008. p. 271-287.

SANTOS, G. **Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de amiloglucosidade por *Aspergillus awamori*.** 2006. 81 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.

SILVA, F. A. S. **Sistema de Assistência Estatística - ASSISTAT versão 7.7 beta.** Paraíba: Departamento de Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Campina Grande, s.d. Disponível em: <http://www.assistat.com>. Acesso em: 20 ago. 2015.

SILVA, F. C.; CESAR, M. A. A.; SILVA, C. A. B. **Pequenas indústrias rurais de cana-de-açúcar:** melado, rapadura e açúcar mascavo. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 155 p.

SILVA, G. A. B.; ALMEIDA, W. E. S.; CORTES, M. S.; MARTINS, E. S. Produção e caracterização de protease obtida por *Gliocladium verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v. 3, n. 1, p. 28-41, 2009.

SITEPU, I. R.; GARAY, L. A.; SESTRIC, R.; LEVIN, D.; BLOCK, D. E.; GERMAN, J. B.; BOUNDY-MILLS, K. L. Oleaginous yeasts for biodiesel: Current and future trends in biology and production, **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 32, p. 1336-1360, 2014.

SHERIDAN, M. A. Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Amsterdam, v. 107, n. 4, p. 495-508, 1994.

SMEDES, F.; THOMASEN, T. K. Evaluation of the Bligh and Dyer lipid determination method. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 32, n. 8/9, p. 681-688, 1996.

SMEDES, F.; ASKLAND, T. K. Revisiting the development of the Bligh and Dyer total lipid determination method. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 38, n. 3, p. 193-201, 1999.

SOARES, E. A. Manejo nutricional no exercício físico. **Nutrição em Pauta**, São Paulo, v. 9, n. 48, p. 46-48, 2001.

SOXHLET, F. Die Gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. **Polytechnisches Journals**, Berlin, v. 232, p. 461-465, 1879.

SYDNEY, E. B.; LARROCHE, C.; NOVAK, A. C.; NOUAILLE, R.; SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; LETTI, L. A.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. Economic process to produce biohydrogen and volatile fatty acids by a mixed culture using vinasse from sugarcane ethanol industry as nutrient source. **Bioresource Technology**, Essex, v. 159, p. 380-386, 2014.

SZYMANSKI, M. S. E.; BALBINOT, R.; SCHIRMER, W. N. Biodigestão anaeróbia da vinhaça: aproveitamento energético do biogás e obtenção de créditos de carbono – estudo de caso. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 4, p. 901-912, 2010.

TAI, M.; STEPHANOPOULOS, G. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. **Metabolic Engineering**, Amsterdam, v. 15, p. 1-9, 2013.

TAPIA, E. V. **Melhoramento genético da levedura oleaginosa *Lipomyces starkeyi* por mutagênese aleatória, visando a produção de biocombustíveis de segunda geração**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

TAUXE, R. V. Food safety and irradiation: protecting the public from foodborne infections. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 7, n. 3, 2001.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

URBAIN, W.M. **Food irradiation**. Orlando: Academic Press, 1986. 432 p.

VALONI, E. A. **Envolvimento das proteínas fosfatases no acúmulo de lipídios em *Saccharomyces cerevisiae* e síntese em biorreator utilizando glicerina loira como fonte de carbono**. 2014. 75 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

VAN DER WALT, J. P.; VON ARX, J. A. The yeast genus *Yarrowia* gen.nov. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 46, p. 517-521, 1980.

VICTORELLI, R. **Seleção de leveduras produtoras de lipídios**. 2008. 64 p. Trabalho (Conclusão de Curso de Bacharel em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2008.

VIÊGAS, C. V. **Extração e caracterização dos lipídeos da microalga *Chlorella pyrenoidosa* visando à produção de ésteres graxos.** 2010. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2010.

VIEIRA, D. A. P.; FERNANDES, N. C. A. Q. **Microbiologia agrícola.** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2012 90 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Joint FAQ/IAEA/WHO Study Group. **High-dose irradiation:** wholesomeness of food irradiated with doses above 10kGy. Geneva, 1997.

WHITBY, J. L.; GELDA, A. K. Use of incremental doses of cobalt 60 radiation as a means to determining radiation sterilization dose. *Journal of Parenteral Drug Association*, v. 33, n. 3, p. 144-155, 1979.

WICKERHAM, L. J. **Taxonomy of the yeast.** Washington, DC: USDA, 1951. 74 p. (Technical Bulletin, 1029).

WICKERHAM, L. J.; KURTZMAN, C. P.; HERMAN, A. I. Sexual reproduction in *Candida lipolytica*. *Science*, Washington, DC, v. 167, n. 3921, p. 1141-1144, 1970.

WIENDL, T. A. **Efeito de baixas doses de radiação gama do Co-60 (Radio-hormesis) em semente de tomate.** 2010. 79 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2010.

XUE, F. Y.; ZHANG, X.; LUO, H.; TAN, T. W. A new method for preparing raw material for biodiesel production. *Process Biochemistry*, Oxford, v. 41, p. 1699-1702, 2006.

YANG, X.; JIN, G.; GONG, Z.; SHEN, H.; BAI, F.; ZHAO, Z. K. Recycling biodiesel-derived Glycerol by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 through the two-stage lipid production process. *Biochemical Engineering Journal*, Amsterdam, v. 91, p. 86-91, 2014.

YI-HUANG, C.; KU-SHANG, C.; CHING-FU, L.; CHUAN-LIANG, H.; CHENG-WEI, H.; HUNG-DER, J. Microbial lipid production by oleaginous yeast *Cryptococcus sp.* in the batch cultures using corn cob hydrolysate as carbon source. *Biomass and Bioenergy*, Amsterdam, v. 72, p. 95-103, 2015.

ZAGÓRSKI, Z. P. Radiation sterilization of disposable medical equipment. *Polimery w Medycynie*, v. 5, n. 4, p. 301-305, 1975.