



SOLVENTES VERDES COMO ALTERNATIVA SUSTENTÁVEL PARA EXTRAÇÃO LIPÍDICA DE *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688

T. C. Jesus¹, J. M. D. Almeida², B. G. P. Nascimento³, A. C. Lemos⁴, J. F. M. Burkert⁵

1-Thallita Cordeiro de Jesus – Escola de Química e Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande – CEP: 96203-900 – Rio Grande – RS – Brasil, Telefone: 55 (98) 8802-0156 – e-mail: (thallitacordeirodjes@furg.br)

2-Jade Moraes Freitas Almeida – Escola de Química e Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande – CEP: 96203-900 – Rio Grande – RS – Brasil, Telefone: 55 (53) 8428-6581– e-mail: (jadmfa@gmail.com)

3-Beatriz Gomes de Paiva do Nascimento – Escola de Química e Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande – CEP: 96203-900 – Rio Grande – RS – Brasil, Telefone: 55 (53) 8134-8407– e-mail: (beatrizdepaivanascimento@gmail.com)

4-Andressa Cunha Lemos – Escola de Química e Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande – CEP: 96203-900 – Rio Grande – RS – Brasil, Telefone: 55 (53) 9213-5083– e-mail: (andressa.cunhalemos@gmail.com)

5-Janaina Fernandes de Medeiros Burkert – Escola de Química e Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande – CEP: 96203-900 – Rio Grande – RS – Brasil, Telefone: 55 (53) 8118-4292– e-mail: (jfmb@furg.br)

RESUMO – O óleo da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* tem demonstrado potencial como bioproduto para substituir os óleos convencionais, possuindo adicionalmente bioativos como os carotenoides. Entretanto, métodos alternativos de extração com menor toxicidade são necessários visando a minimização de efeitos nocivos à saúde e ao meio ambiente. Com base no presente exposto, este trabalho objetivou utilizar solvente alternativo para extração de lipídios de *R. mucilaginosa* CCT 7688. Após o cultivo, a biomassa previamente seca, foi macerada e moída e dois protocolos de extrações foram avaliados. O protocolo com acetato de etila extraiu $27,3 \pm 0,75$ % (m/m) de conteúdo lipídico sendo superior a extração pelo método analítico tradicional Bligh & Dyer 18 ± 1 % (m/m). Portanto, o uso de coprodutos agroindustriais na produção da biomassa e a recuperação de lipídios com solventes de menor toxicidade tornam-se ferramentas viáveis, reduzindo custos de produção e possibilitando desenvolvimento de alimentos mais seguros e sustentáveis.

PALAVRAS-CHAVE: acetato de etila; extração sustentável; óleo microbiano.

ABSTRACT – The oil derived from the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* has demonstrated potential as a bioproduct to replace conventional oils, while also containing bioactive compounds such as carotenoids. However, alternative extraction methods with lower toxicity are necessary to minimize harmful effects on human health and the environment. Based on this premise, this study aimed to employ an alternative solvent for lipid extraction from *R. mucilaginosa* CCT 7688. After cultivation, the dried biomass was macerated and ground, and two extraction protocols were evaluated. The ethyl acetate protocol extracted 27.3 ± 0.75 % (w/w) of lipid content, surpassing the traditional analytical method of Bligh & Dyer, which yielded 18 ± 1 % (w/w). Therefore, the use of agro-industrial by-products in biomass production, combined with lipid recovery using lower-toxicity solvents, represents a viable strategy to reduce production costs while enabling the development of safer and more sustainable food products.

KEYWORDS: ethyl acetate; microbial oil; sustainable extraction.



1. INTRODUÇÃO

Os óleos microbianos são produzidos por microrganismos, principalmente leveduras (Campos-Valdez *et al.*, 2023), dentre as quais, *Rhodotorula* se destaca (Mussagy *et al.*, 2020). O óleo obtido da biomassa de *R. mucilaginosa* representa um possível substituto aos óleos convencionais, pois configura uma fonte alternativa de ácidos graxos, (Arrieira *et al.*, 2024) essenciais à saúde humana.

Soluções alternativas na produção de alimentos seguros e sustentáveis tem sido o foco de pesquisas, com ênfase na redução de custos de processamento pela utilização de coprodutos agroindustriais para obtenção desses óleos microbianos (Alfaro *et al.*, 2024; Campos-Valdez *et al.*, 2023; Rodrigues *et al.*, 2022).

Além disso, metodologias ambientalmente amigáveis são necessárias para recuperar o óleo microbiano de leveduras oleaginosas e torná-lo um alimento alternativo, viável e seguro. Métodos analíticos e tradicionais para extração de lipídios envolvem o uso de solventes, como metanol e clorofórmio, que apresentam riscos à saúde humana devido sua toxicidade (FDA, 2024; (Prat *et al.*, 2016). Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar protocolos alternativos para extração de lipídios de *R. mucilaginosa*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção e Preparo da Biomassa

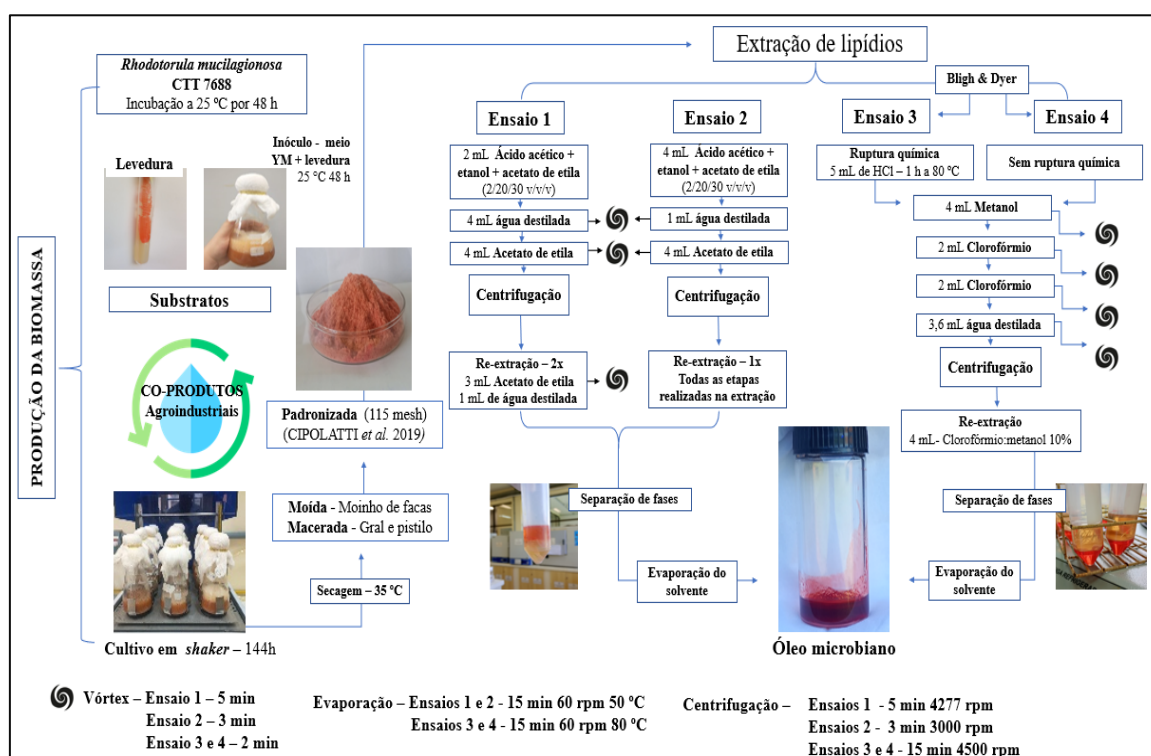
A biomassa usada para a extração dos lipídios, foi obtida da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688, mantida em tubos de ágar inclinado *Yeast Malt* (YM) a 25 °C por 48 h e cultivada sob condições previamente definidas por Rodrigues *et al.* (2022), tendo como composição do meio 70 g/L de melão de cana-de-açúcar (Melaços Brasileiros) e 3,4 g/L de água de maceração de milho (Corn Products). O cultivo foi realizado em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL do meio agroindustrial e 10% de inóculo (v/v), incubados em agitador orbital tipo *shaker* a 25 °C e 180 rpm por 144 h. Ao final do cultivo a biomassa foi recuperada, seca a 35 °C, moída em moinho de facas e sua granulometria padronizada a 115 mesh (Cipolatti *et al.*, 2019).

2.2 Extração de Lipídios

A extração e quantificação de lipídios da biomassa de *R. mucilaginosa* CCT 7688 foi realizada em quatro ensaios (E1, E2, E3 e E4) sendo detalhada na Figura 1. Os ensaios E1 e E2 foram realizados segundo Wittenhofer *et al.* (2024) com adaptações e utilizaram acetato de etila, etanol e ácido acético como solventes. O etanol é um biossolvente de classe 3 com baixo risco toxicológico (FDA, 2024), classificado como recomendável pelo guia de solventes da (IMI)-CHEM21 (Prat *et al.*, 2016) podendo ser usado como substituto ao metanol devido à suas propriedades físicas similares. O acetato de etila por cobrir a mesma gama de lipídios que o clorofórmio (Mussagy *et al.*, 2020), é amplamente usado em processos de extração verde, possui classe 3 segundo FDA (2024) bem como o ácido acético, e é considerado como recomendável pelo guia (IMI)-CHEM21 (Prat *et al.*, 2016).

Os ensaios E4 e E5 seguiram a metodologia de Bligh & Dyer (1959) considerado o método analítico padrão com metanol e clorofórmio no processo de extração, ambos pertencentes a classe 2, considerado tóxico (FDA, 2024) e altamente perigoso (Prat *et al.*, 2016), respectivamente. O ensaio E3 incluiu um pré-tratamento para a biomassa com ruptura química usando ácido clorídrico (HCl 2,4 M). Em relação à quantidade de biomassa utilizada, os ensaios E1, E3 e E4 usaram 0,5 g de biomassa seca de acordo com a metodologia padrão, enquanto o ensaio E2 buscou avaliar a eficiência da extração utilizando menos biomassa (0,15 g).

Figura 1 – Fluxograma de extração de lipídios de *R. mucilaginosa* CCT 7688





2.3 Análise Estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata ($n=3$) e as diferenças significativas a um nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$) foram verificadas a partir de análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Tukey. Os dados foram tratados utilizando o software Statistica 7.0 (StartSoft Inc., Tulsa. OK, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os diferentes resultados variando de 18 a cerca de 27 % para a recuperação de lipídios em função dos diferentes protocolos de extração. O ensaio E2 destacou-se dos demais apresentando a maior recuperação de lipídios alcançando 27,3 %. Os ensaios E1 e E3 não indicaram diferenças significativas ($p > 0,05$) com $24,2 \pm 0,3^b$ e $23,0 \pm 0,5^b$ % de lipídios, respectivamente. Portanto, evidenciando que o acetato de etila aplicado no ensaio E1 e E2 demonstrou ser tão eficiente quanto os solventes tradicionais (metanol e clorofórmio) usados nos ensaios E3 e E4. Essa abordagem além de eficiente torna-se uma alternativa mais segura, pois solventes verdes minimizam a exposição a solventes tóxicos, tornando o processo de extração e recuperação mais limpo e sustentável e permitem futuras aplicações em matrizes alimentares.

Tabela 1 - Rendimento da extração de lipídios por *R. mucilaginosa* CCT 7688 utilizando diferentes solventes

Ensaio	Conteúdo lipídico % (m/m) *
E1	$24,2 \pm 0,3^b$
E2	$27,3 \pm 0,7^a$
E3	$23 \pm 0,5^b$
E4	$18 \pm 1,0^c$

Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).

A importância da ruptura celular está visualizada ao comparar a extração pelo método de Bligh & Dyer sem a aplicação de ruptura celular (E4) com $18,0 \pm 1$ % ao ensaio com ruptura química (E3) que foi $23,0 \pm 0,5$ %, cerca de 28% superior. Os ensaios que utilizaram o acetato de etila (E1 e E2) realizaram a ruptura celular através apenas da moagem em moinho de facas, processo mecânico usado em processos industriais (Chaves de Carvalho *et al.*, 2024) para



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

redução de partículas de matérias primas, bem como permitir o aumento da superfície de contato com solventes extratores, por exemplo.

O sistema usando acetato de etila e etanol também é estudado por Mussagy *et al.* (2020) para recuperação de lipídios de *R. glutinis*. A polaridade dos solventes foi considerada importante no processo, pois a formação do sistema ternário (metanol e água, clorofórmio e fase sólida) do método por Bligh & Dyer, embora eficiente, pode dificultar a recuperação, uma vez que o clorofórmio por ser mais denso é depositado ao fundo e ao ser recuperado pode vir acompanhado de resíduos sólidos, podendo acarretar falhas na análise. No estudo de Mussagy *et al.* (2020) as melhores recuperações usaram um sistema ternário de acetato de etila, etanol e água como substitutos ao metanol e clorofórmio e alcançaram um percentual de recuperação de 51% (m/m). Os autores acreditam que o fato do acetato de etila se concentrar na fase de topo, tornar mais fácil a recuperação, o que pode ter influenciado no melhor rendimento, assim como observado neste estudo (E1 e E2).

Diante disso, os resultados deste estudo corroboram com a eficiência do método e evidenciam o potencial de aplicação dessa técnica para a obtenção do óleo microbiano da levedura *R. mucilaginosa* CTT 7688.

4. CONCLUSÕES

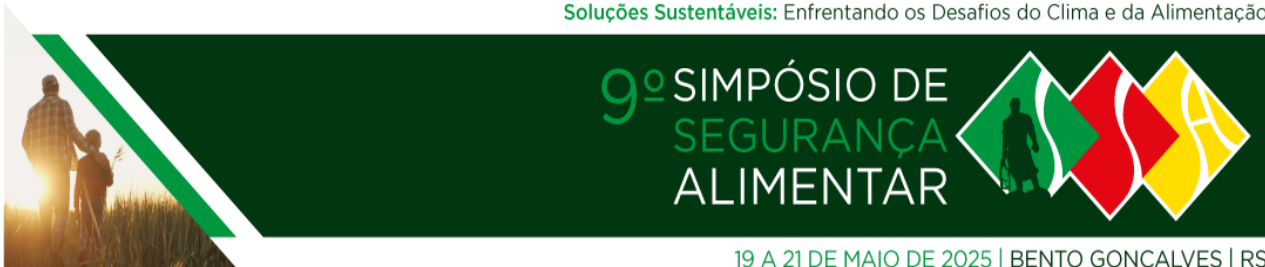
A utilização do acetato de etila como solvente verde na extração do óleo microbiano, demonstrou ser uma opção viável e eficiente para recuperação de lipídios de *R. mucilaginosa* CTT 7688. Os resultados evidenciaram que o acetato de etila é um potencial substituto aos solventes tradicionalmente usados, podendo ser utilizados em métodos ambientalmente amigáveis contribuindo com a diminuição dos impactos ambientais.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, CNPq e a FAPERGS pelas bolsas de fomento. À FURG e ao Laboratório de Análise Sensorial e Controle de Qualidade (LASCQ), pelo espaço e recursos necessários para o desenvolvimento desta pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARRIEIRA, N. M.; DE ÁVILA, M. T.; FLORES, W. H.; MICHELON, M.; DUARTE, S. H.; BURKERT, J. F. DE M. Oleogels based on carotenoid-rich microbial oil produced by *R. mucilaginosa* in agro-industrial by-products. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. 2024



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

CHAVES DE CARVALHO, L. DA S.; BRENES, R. GONZALO. R.; GRIECO, M. A.; BOJORGE, N.; PEREIRA, N. Production of cellulose nano/microfibers through simultaneous milling and enzymatic hydrolysis with an optimized cocktail of cellulase/xylanase/LPMO. **Industrial Crops and Products**, 220, 119137, 2024

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

FDA (Food and Drug Administration). Q3C — Tables and List Guidance for Industry: Residual Solvents in Pharmaceuticals. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH), 2023. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/71737/download>

MUSSAGY, C. U.; SANTOS-EBINUMA, V. C.; KURNIA, K. A.; DIAS, A. C. R. V.; CARVALHO, P.; COUTINHO, J. A. P.; PEREIRA, J. F. B. Integrative platform for the selective recovery of intracellular carotenoids and lipids from *Rhodotorula glutinis* CCT-2186 yeast using mixtures of bio-based solvents. **Green Chemistry**, 22(23), 8478–8494. 2020

PRAT, D.; WELLS, A.; HAYLER, J.; SNEDDON, H.; MCELROY, C. R.; ABOU-SHEHADA, S.; DUNN, P. J. CHEM21 selection guide of classical- and less classical-solvents. **Green Chemistry**, 18(1), 288–296, 2016

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