



AVALIAÇÃO DE SOLVENTES ALTERNATIVOS PARA EXTRAÇÃO DE ÓLEO DE *Yarrowia lipolytica* COM POTENCIAL DE APLICAÇÃO ALIMENTAR

B. R. Machado¹, H. S. P. Lopes¹, S. H. Duarte², L. O. Santos¹

1-Laboratório de Biotecnologia – Escola de Química e Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande – CEP: 96203-900 – Rio Grande – RS – Brasil, Telefone: 55 (53) 99152-9510– e-mail: (brunoroswag@gmail.com; hycarosague@hotmail.com; santoslucielen@gmail.com)

2- Laboratório de Microbiologia e Bioquímica - Escola de Química e Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande – CEP: 96203-900 – Rio Grande – RS – Brasil, e-mail: (susanduarte@gmail.com)

RESUMO – O rendimento de extração de lipídeos da biomassa de *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1095 foi avaliado com diferentes solventes. As misturas acetato de etila/etanol/água ($16,16 \pm 1,04\%$), clorofórmio/metanol/água ($16,70 \pm 0,07\%$) e hexano/etanol/água ($15,68 \pm 0,73\%$) apresentaram rendimentos iguais entre si, enquanto o hexano isolado foi menos eficiente ($5,61 \pm 0,33\%$). A composição de ácidos graxos do óleo extraído foi semelhante ao do azeite de oliva, destacando os ácidos palmítico (C16:0), oleico (C18:1) e linoleico (C18:2). Esses resultados indicam que substituir solventes altamente tóxicos, como clorofórmio e metanol, por alternativas menos nocivas, como acetato de etila e etanol, é uma abordagem viável. Essa substituição mantém a eficiência na extração de lipídeos e contribui para processos mais seguros e ambientalmente sustentáveis.

ABSTRACT – The lipid extraction yield from the biomass of *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1095 was evaluated using different solvents. The mixtures ethyl acetate/ethanol/water ($16.16 \pm 1.04\%$), chloroform/methanol/water ($16.70 \pm 0.07\%$), and hexane/ethanol/water ($15.68 \pm 0.73\%$) showed equal yields, while pure hexane was less efficient ($5.61 \pm 0.33\%$). The fatty acid composition of the extracted oil was like that of olive oil, highlighting palmitic (C16:0), oleic (C18:1), and linoleic (C18:2) acids. These results indicate that replacing highly toxic solvents, such as chloroform and methanol, with less harmful alternatives, such as ethyl acetate and ethanol, is a viable approach. This substitution maintains the efficiency of lipid extraction and contributes to safer and more environmentally sustainable processes.

PALAVRAS-CHAVE: acetato de etila, etanol, óleo comestível, perfil de ácidos graxos

KEYWORDS: ethyl acetate, ethanol, edible oil, fatty acid profile

1 INTRODUÇÃO

A levedura *Yarrowia lipolytica* destaca-se por ser não patogênica e possuir aprovação GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*), garantindo a segurança de seus produtos e biomassa para consumo humano e animal (Groenewald *et al.*, 2014). Além disso, apresenta grande potencial para a produção de lipídeos, pois são consideradas leveduras oleaginosas,



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

ou seja, possuem a capacidade de utilizar o substrato em excesso do meio de cultivo, para criar reservas energéticas na forma de lipídeos (Patel *et al.*, 2020).

Embora promissora, a extração de lipídeos enfrenta desafios em relação ao tipo de solvente utilizado convencionalmente. O método de Bligh e Dyer, reconhecido pela eficiência na extração de lipídeos neutros e polares, utiliza clorofórmio e metanol, solventes altamente tóxicos com riscos à saúde, com potencial carcinogenicidade e de danos ao fígado, rins e sistema nervoso (Abubakar *et al.*, 2023; Gautam; Arora, 2025). O hexano, amplamente utilizado na extração de óleos comestíveis, apresenta menor toxicidade e maior aceitação, mas, devido a possíveis impactos ambientais, seu uso vem sendo restringido (Jesus; Maciel Filho, 2019).

Assim, é fundamental investigar solventes alternativos, especialmente para aplicações alimentares. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estudar diferentes solventes para a extração de lipídeos da biomassa de *Yarrowia lipolytica* NRRL Y- 1095, assim como caracterizar o óleo obtido.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo, condições de cultivo e recuperação da biomassa

O inóculo foi preparado utilizando 200 mL de meio composto por (g/L): 60 de glicose, 0,5 de extrato de levedura, 0,5 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 7 de KH_2PO_4 , 2,5 de Na_2HPO_4 , 1,5 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,15 de CaCl_2 , 0,15 de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,02 de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,06 de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. O cultivo do inóculo foi realizado a 28 °C e 180 rpm, com pH ajustado para 6, visando concentração de 1×10^8 células/mL.

Os cultivos foram feitos nas mesmas condições por 168 h, inoculado com 10% em volume e no mesmo meio de cultivo, com exceção da concentração de extrato de levedura ajustada para 1,27 g/L para obter-se relação C/N de 74,3. Após as 168 h de cultivo, a biomassa foi recuperada por centrifugação a 2034 x g durante 10 min e lavada duas vezes. A biomassa foi seca a 60 °C por 24 h. Posteriormente, foi macerada com gral e pistilo por 5 min e armazenada a -18 °C para extração dos lipídeos.

2.2 Estudo de solventes alternativos na extração de lipídeos

Solventes alternativos, como acetato de etila (AcOEt), hexano (Hex) e etanol (EtOH), foram utilizados e comparados ao método de extração com clorofórmio (CHCl_3), metanol (MeOH) e água (H_2O) proposto por Bligh; Dyer, (1959). Para todos os ensaios, a biomassa da levedura foi previamente hidrolisada com 5 mL de HCl 5 M, em banho-maria a 80 °C por 1 h e, após, foi centrifugada a 2034 x g durante 10 min para a remoção do ácido.



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

Para a extração de lipídeos, AcOEt, EtOH e H₂O (1:1:0,05, v/v/v) ou com Hex, EtOH e H₂O foram adicionados a 0,25 g de biomassa hidrolisada, em tubos Falcon de 50 mL, e agitados em vórtex a 3800 rpm por 10 min para extrair os lipídeos. Em seguida, AcOEt e H₂O ou Hex e H₂O contendo 0,85 % de KCl foram adicionados para obter proporção final de 4:1:1 (v/v/v) e homogeneizados por 10 min em vórtex, seguido de centrifugação a 2034 x g por 5 min para separar as fases (Breil *et al.*, 2017).

A extração de lipídeos foi realizada utilizando apenas hexano como solvente, de acordo com Briel *et al.* (2016). Para esses experimentos, 0,25 g de biomassa hidrolisada permaneceu em agitação magnética com 12 mL de hexano, por 1 h. A amostra foi centrifugada a 2034 x g por 10 min.

Para todas as extrações, a fase contendo os lipídeos foi evaporada e o rendimento lipídico (% m m⁻¹) medido por massa seca, de acordo com a Equação 1.

$$\text{Rendimento de lipídeos (\%)} = \frac{m_{\text{balão + lipídeos (g)}} - m_{\text{balão (g)}}}{m_{\text{biomassa (g)}}} \times 100 \quad (1)$$

2.3 Perfil de ácidos graxos

Primeiramente, o óleo extraído foi esterificado para obter ésteres metílicos de ácidos graxos. Posteriormente, a identificação e quantificação dos ácidos graxos foi realizada de acordo com Lemões *et al.* (2016) utilizando cromatógrafo de fase gasosa (Shimadzu GC-2010) equipado com um Combipal AOC 6000, amostrador automático e um detetor de espectrometria de massa com analisador de triplo quadrupolo modelo TQ 8050, todos da Shimadzu.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

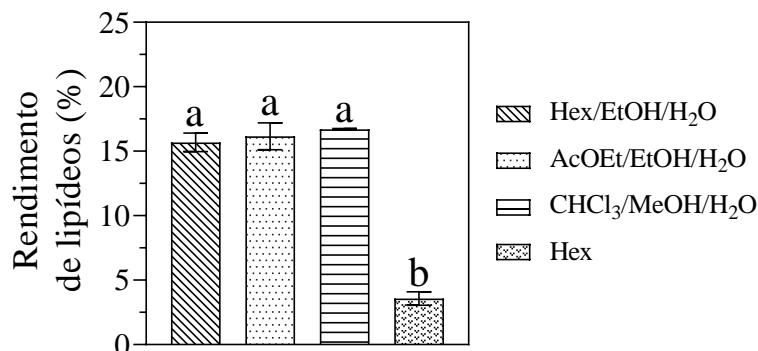
A Figura 1 apresenta o rendimento de extração de lipídeos da biomassa da levedura. As misturas AcOEt/EtOH/H₂O (16,16 ± 1,04%), CHCl₃/MeOH/H₂O (16,70 ± 0,07%) e Hex/EtOH/H₂O (15,68 ± 0,73%) não apresentaram diferença significativa entre si, com exceção do hexano, que teve o menor rendimento (5,61 ± 0,33%). De acordo com Khot *et al.* (2020), solventes polares (etanol e metanol) rompem as interações entre lipídeos e a matriz celular, facilitando sua liberação da biomassa microbiana e, conseqüentemente, aumentando a eficiência da extração. Na levedura *Y. lipolytica*, os lipídeos são armazenados em corpos lipídicos, compostos principalmente por triacilgliceróis e esteróis, circundados por uma camada de fosfolipídeos (Murphy; Vance, 1999). A ausência de



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

solventes polares, como etanol ou metanol, pode ter dificultado a ruptura dessa camada, reduzindo o rendimento da extração, como observado no uso isolado de hexano.

Figure 1 - Rendimento de lipídeos (%) para diferentes combinações de solventes aplicados à biomassa da levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1095. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey.



Além disso, conforme a RDC N° 466 (Brasil, 2021), a ANVISA permite acetato de etila e etanol em alimentos sem limite de resíduos, mas proíbe clorofórmio e restringe metanol (10 ppm) e hexano (1 a 30 ppm). A FDA (2017) classifica acetato de etila e etanol como solventes de baixa toxicidade (Classe 3), enquanto clorofórmio, hexano e metanol são Classe 2, de maior toxicidade. Dessa forma, é viável substituir clorofórmio e metanol por solventes menos tóxicos, mantendo o rendimento da extração e reduzindo riscos à saúde e ao meio ambiente.

A Tabela 1 apresenta o perfil de ácidos graxos do óleo extraído da biomassa da *Y. lipolytica* quando utilizado diferentes solventes. É possível verificar que, independentemente da mistura de solventes utilizada, a composição foi semelhante, sendo o ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido oleico (C18:1) e ácido linoleico (C18:2) os ácidos graxos majoritários no óleo microbiano.

Os principais óleos comestíveis utilizados na indústria de alimentos são o óleo de palma, o óleo de soja, o óleo de canola, o óleo de girassol e o azeite de oliva, sendo o (C16:0), o (C18:1) e o (C18:2) os principais ácidos graxos na sua composição (Akok, 2017). No presente estudo, a composição destes ácidos graxos (por exemplo, extraídos com AcOEt/EtOH/H₂O) foi 14,49, 52,44 e 8,0%, respectivamente. Portanto, com base na composição de ácidos graxos da *Y. lipolytica* e o azeite de oliva, de acordo com o Codex Alimentarius, (1999), observa-se uma semelhança, particularmente para C16:0, C18:1 e C18:2. Isso sugere o potencial da *Y. lipolytica* como uma fonte alternativa de óleo para a formulação de alimentos.



Tabela 1 - Perfil de ácidos graxos majoritários obtido em 168 h de cultivo da levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1095, extraído com diferentes solventes, e do azeite de oliva de acordo com o Codex Alimentarius.

Ácidos graxos (%)*	CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O	AcOEt/EtOH/H ₂ O	Hex/EtOH/H ₂ O	Hex	Azeite de oliva***
C16:0	14,99	14,49	14,87	13,79	7,5 a 20
C16:1	10,38	11,89	11,77	10,43	0,3 a 3,5
C18:0	11,50	8,86	9,43	8,63	0,5 a 5
C18:1	48,01	52,44	50,45	54,53	55 a 83
C18:2	7,35	8,00	8,46	7,43	3,5 a 21
Outros**	6,66	4,31	5,03	4,07	-

* C16:0 - ácido palmítico, C16:1 - ácido palmitoleico, C18:0 - ácido esteárico, C18: 1 - ácido oleico e C18:2 - ácido linoleico. ** C14:0 - ácido tetradecanóico, C15:0 - ácido pentadecílico, , C17:1 - ácido heptadecenoico, , C20:0 - ácido araquídico, C20:1 - ácido eicosenoico, C22:0 - ácido docosanoico, C24:0 - ácido lignocérico e C26:0 - ácido cerótico. ***Codex Alimentarius, (1999), disponível em: <https://www.fao.org/4/y2774e/y2774e04.htm#bm4.1> acessado em: 09 de janeiro de 2025.

4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, foi possível verificar que a substituição de solventes de alta toxicidade, como clorofórmio e metanol, por alternativas menos nocivas, como acetato de etila e etanol, não compromete o rendimento da extração de lipídeos. Além disso, observou-se que o perfil de ácidos graxos do óleo microbiano, independentemente da combinação de solventes utilizada, é semelhante ao do azeite de oliva, sugerindo seu potencial para aplicações na indústria alimentícia.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao apoio financeiro da FAPERGS, CNPq e CAPES.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUBAKAR, M.; ARIF, M. M.; KAUSAR, H.; KHAN, S. H.; NISAR, W.; SHAHZAD, K. Methanol Formation, Toxicity and its Impact on the Human Nervous System and Liver: Methanol Formation, Toxicity and its Impact. **Pakistan Journal of Health Sciences**, p. 12-20, 2023.

AKOH, C. C. **Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology**. 4. Ed., CRC Press: Boca Raton, 2017. ISBN: 9781315151854.



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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada N° 466, de 10 de fevereiro de 2021. Estabelece os coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso na produção de alimentos e ingredientes na função de solventes de extração e processamento. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2021.

BREIL, C.; ABERT VIAN, M.; ZEMB, T.; KUNZ, W.; CHEMAT, F. “Bligh and Dyer” and Folch methods for solid–liquid–liquid extraction of lipids from microorganisms. Comprehension of solvation mechanisms and towards substitution with alternative solvents. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 4, p. 708, 2017.

BREIL, C.; MEULLEMIESTRE, A.; VIAN, M.; CHEMAT, F. Bio-based solvents for green extraction of lipids from oleaginous yeast biomass for sustainable aviation biofuel. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 196, 2016.

CARSANBA, E.; PAPANIKOLAOU, S.; FICKERS, P.; ERTEN, H. Lipids by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on glucose in batch cultures. **Microorganisms**, v. 8, n. 7, p. 1054, 2020.

Food and Drugs Administration, Q3C—Tables and list guidance for industry. **ICH (Revision 3)**, 2017. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/71737/download>

GAUTAM, S.; ARORA, S. Chloroform: Risk assessment, environmental, and health hazard. In: **Hazardous Chemicals**. Academic Press, 2025. p. 439-451.

GROENEWALD, M.; BOEKHOUT, T.; NEUVÉGLISE, C.; GAILLARDIN, C.; VAN DIJCK, P. W. M.; WYSS, M. *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 187–206, 2014.

JESUS, S. S.; FILHO, R. M. Recent advances in lipid extraction using green solvents. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 133, p. 110289, 2019.

KHOT, M.; RAUT, G.; GHOSH, D.; ALARCÓN-VIVERO, M.; CONTRERAS, D.; RAVIKUMAR, A. Lipid recovery from oleaginous yeasts: Perspectives and challenges for industrial applications. **Fuel**, v. 259, p. 116292, 2020.

LEMÕES, J. S.; SOBRINHO, R. C. A.; FARIAS, S. P.; MOURA, R. R.; PRIMEL, E. G.; ABREU, P. C.; D’OCA, M. G. M. Sustainable production of biodiesel from microalgae by direct transesterification. **Sustainable chemistry and pharmacy**, v. 3, p. 33-38, 2016.

MURPHY, D. J.; VANCE, J. Mechanisms of lipid-body formation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 24, n. 3, p. 109–115, 1999.

PATEL, A.; KARAGEORGOU, D.; ROVA, E.; KATAPODIS, P.; ROVA, U.; CHRISTAKOPOULOS, P.; MATSAKAS, L. An overview of potential oleaginous microorganisms and their role in biodiesel and omega-3 fatty acid-based industries. **Microorganisms**, v. 8, n. 3, p. 434, 2020.