ANÁLISE DA FRAÇÃO SAPONIFICÁVEL OBTIDA POR ESTERIFICAÇÃO ALCALINA DO ÓLEO MICROBIANO de *Rhodotorula toruloides*

Autores: Yusen Estrada Tortosa, Marco Antônio Silva Carvalho, José Geraldo da Cruz Pradella

[1]Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, yusen.estrada@gmail.com, marcoas.carvalho07@gmail.com, jpradella51@gmail.com

Resumo
Rhodotorula toruloides é uma levedura oleaginosa capaz de produzir lipídios e carotenoides de interesse biotecnológico. O óleo microbiano produzido por essa levedura apresenta uma matriz rica em compostos lipídicos, podendo ser submetido a processos de fracionamento e caracterização. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo obter e caracterizar a fração saponificável resultante da saponificação alcalina do óleo microbiano de *R. toruloides*, com ênfase em seu aspecto visual e perfil espectrofotométrico na região do visível. Para a obtenção da fração saponificada, foram utilizados 5 g de óleo microbiano e uma solução de hidróxido de potássio (KOH) em álcool etílico a 95%. A fração obtida apresentou aspecto saponáceo e coloração alaranjada intensa. O material foi submetido à secagem em estufa. Posteriormente, 5 g da fração saponificada seca foram adicionados a 50 mL de hexano para a solubilização e obtenção de uma solução para análise espectrofotométrica na região do visível. O perfil obtido, associado à coloração alaranjada da amostra, indica a presença de compostos pigmentados. O máximo de absorção observado encontra-se em região compatível com a absorção descrita para carotenoides produzidos por *R. toruloides*, embora a identificação específica desses compostos exija análises complementares.
Palavras-chave: *Rhodotorula toruloides*; óleo microbiano; saponificação; fração saponificável; FTIR.

Área do Conhecimento: Bioquímica

Introdução

A busca por fontes alternativas de compostos de origem microbiana tem ampliado o interesse pelo uso de leveduras oleaginosas em processos biotecnológicos. Entre essas leveduras, destaca-se *Rhodotorula toruloides*, espécie capaz de acumular lipídios e produzir compostos de interesse biotecnológico. A levedura apresenta elevada capacidade de acúmulo de lipídios intracelulares, além de produzir carotenoides de interesse para diferentes aplicações biotecnológicas (Zhao et al., 2021).

Os lipídios produzidos por *R. toruloides* apresentam predominância de ácidos graxos de cadeia longa, principalmente C16 e C18, incluindo ácido palmítico, esteárico, oleico e linoleico, embora a composição possa variar de acordo com a cepa e as condições de cultivo (Li et al., 2020; Santos et al., 2021). Essa característica torna o óleo microbiano uma matéria-prima de interesse para diferentes estratégias de processamento e aproveitamento de sua fração lipídica.

Entre as estratégias aplicadas ao processamento de matrizes lipídicas, a saponificação constitui uma reação de hidrólise alcalina dos triacilgliceróis, promovendo a formação de glicerol e sais alcalinos de ácidos graxos. Dessa forma, o processo pode ser utilizado para o fracionamento de componentes saponificáveis e insaponificáveis. Em estudos com *R. toruloides*, a saponificação foi empregada como etapa de processamento para a recuperação de ácidos graxos e carotenoides, demonstrando a possibilidade de aproveitamento de diferentes componentes da biomassa e da fração lipídica da levedura (Passarinho et al., 2020). A composição da fração lipídica de *R. toruloides* também apresenta importância para a obtenção de pigmentos. A levedura produz carotenoides como β-caroteno, toruleno e torularrodina, que apresentam propriedades espectrais distintas na região do visível (Pham et al., 2020; Pinheiro et al., 2020). Assim, a análise espectrofotométrica pode fornecer informações preliminares sobre a presença de compostos pigmentados na fração obtida. Diante disso, o presente

trabalho teve como objetivo obter e caracterizar a fração saponificável do óleo microbiano produzido pela levedura *Rhodotorula toruloides*, utilizando saponificação alcalina e análise espectrofotométrica na região do visível.

Metodologia

Para obtenção da fração saponificável, foram utilizados 5 g de óleo microbiano de *Rhodotorula toruloides* e uma solução de hidróxido de potássio (KOH) em álcool etílico a 95%. A mistura foi submetida à agitação constante em chapa de aquecimento, à temperatura de 35 °C, durante 35 minutos. Após o resfriamento da mistura à temperatura ambiente, adicionou-se hexano para auxiliar na separação das fases e na partição dos componentes lipossolúveis presentes no sistema. Em seguida, a mistura foi transferida para um funil de separação e mantida em repouso até a separação das fases.

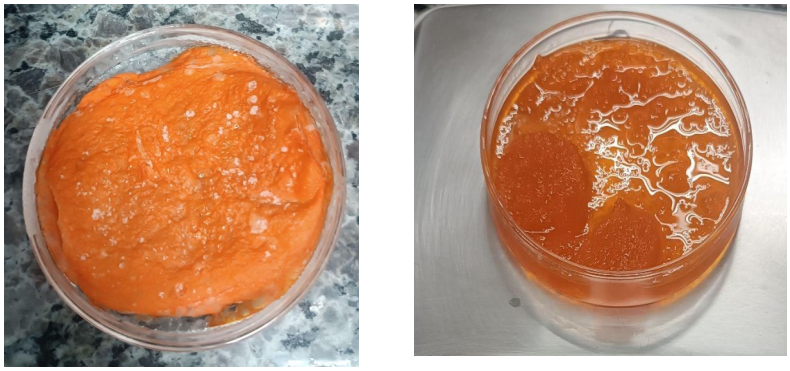
A fração de aspecto saponáceo e coloração alaranjada intensa foi coletada e transferida para uma placa de Petri previamente pesada. A balança digital modelo MP10002C foi tarada com a placa de Petri vazia e, posteriormente, a fração saponificada foi adicionada, registrando-se massa de 51,99 g para a fração antes da secagem. A placa contendo a fração saponificada foi submetida à secagem em estufa a 40 °C durante seis dias. Após esse período, a placa contendo a fração saponificada seca foi novamente pesada, obtendo-se massa de 6,48 g.

Após o processo de saponificação e secagem, 5 g da fração saponificada foram transferidos para um balão volumétrico de 50 mL e solubilizados em hexano, completando-se o volume até a marca de aferição. A solução obtida foi submetida à análise espectrofotométrica na região do visível, utilizando hexano como branco. Foi realizada uma única análise, com leituras nos comprimentos de onda de 440, 450, 480, 485 e 500 nm, obtendo-se valores de absorbância de 0,367; 0,385; 0,407; 0,398 e 0,291, respectivamente.

Resultados

Após o processo de saponificação alcalina do óleo microbiano de *Rhodotorula toruloides*, foi obtida uma fração de aspecto saponáceo e coloração alaranjada intensa. A Figura 1 apresenta o aspecto da fração antes e após o processo de secagem.

Figura 1 – Aspecto visual da fração saponificada obtida a partir do óleo microbiano de *Rhodotorula toruloides*: (A) fração antes da secagem e (B) fração após seis dias de secagem em estufa a 40 °C.



Fonte: Autores (2026).

A fração obtida foi submetida à secagem em estufa a 40 °C durante seis dias. Considerando a tara da placa de Petri, a massa registrada para a fração antes da secagem foi de 51,99 g. Após o período de secagem, a massa registrada foi de 6,48 g, correspondendo a uma redução de 45,51 g, equivalente a aproximadamente 87,5% da massa inicial registrada. Os valores de massa obtidos antes e após a secagem são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Massa da fração saponificada antes e após o processo de secagem.

Condição da fração	**Massa (g)**
Antes da secagem	51,99
Após a secagem	6,48
Redução de massa	45,51

Fonte: Autores (2026)

Após a secagem, uma amostra de 5 g da fração saponificada foi solubilizada em hexano em balão volumétrico de 50 mL e submetida à análise espectrofotométrica. Foram avaliados os comprimentos de onda de 440, 450, 480, 485 e 500 nm. Os valores de absorbância obtidos são apresentados na Tabela 2.

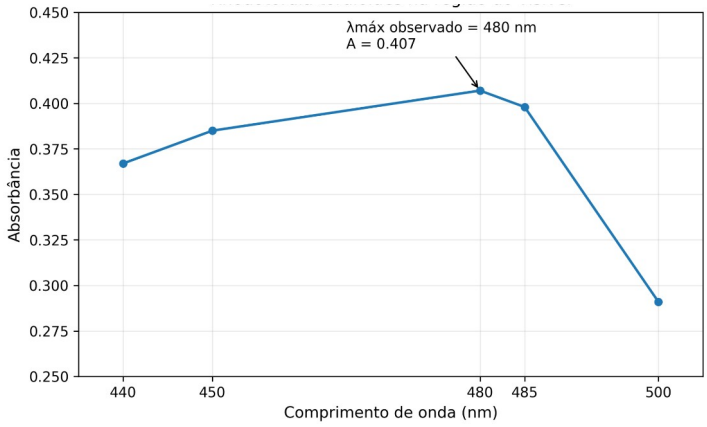
Tabela 2 – Absorbância da fração saponificada em diferentes comprimentos de onda

Comprimento de onda(nm)	Absorbância
440	0,367
450	0,385
480	0,407
485	0,398
500	0,291

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Observou-se aumento da absorbância entre 440 e 480 nm como apresentados na Figura 2, atingindo o maior valor registrado em 480 nm, com absorbância de 0,407. Após esse comprimento de onda, verificou-se redução da absorbância, com valores de 0,398 em 485 nm e 0,291 em 500 nm. Considerando exclusivamente os comprimentos de onda avaliados, 480 nm foi definido como o máximo de absorção observado (λmáx observado).

Figura 2 – Perfil de absorção espectrofotométrica da fração saponificada de *Rhodotorula toruloides* na região do visível.



Fonte: Autores (2026).

Considerando os comprimentos de onda avaliados, o maior valor de absorbância foi observado em 480 nm, caracterizando este comprimento de onda como o máximo de absorção observado (λmáx) nas condições avaliadas. A presença de absorção na região do visível, associada à coloração alaranjada intensa observada na fração saponificada, indica a presença de compostos pigmentados no material analisado. Entretanto, a identificação específica dos compostos responsáveis pelo perfil de absorção requer análises complementares.

Discussão

A obtenção de uma fração de aspecto saponáceo após o tratamento do óleo microbiano com KOH em meio etanólico está de acordo com o princípio da saponificação alcalina de triacilgliceróis, na qual ocorre a hidrólise das ligações éster e a formação de glicerol e sais alcalinos de ácidos graxos. A composição lipídica de *R. toruloides* é predominantemente constituída por ácidos graxos de cadeia C16-C18, incluindo palmítico, esteárico, oleico e linoleico, fornecendo uma matriz adequada para esse tipo de processamento (Li et al., 2020; Santos et al., 2021).

A coloração alaranjada intensa observada na fração obtida constitui um resultado relevante, pois *R. toruloides* é conhecida pela produção de carotenoides, incluindo β-caroteno, toruleno e torularrodina. Esses pigmentos são responsáveis pela coloração característica de espécies do gênero e podem apresentar diferentes máximos de absorção na região do visível (Pham et al., 2020; Pinheiro et al., 2020). Entretanto, a observação visual da coloração não é suficiente para afirmar a identidade ou a concentração dos pigmentos presentes na fração analisada.

A redução de massa observada após a secagem foi de 45,51 g, correspondente a aproximadamente 87,5% da massa registrada antes da secagem. Essa redução pode estar relacionada principalmente à remoção de água e de componentes voláteis ou residuais provenientes das etapas de separação e lavagem. É importante ressaltar que a massa de 51,99 g registrada antes da secagem não corresponde exclusivamente à massa de material formado a partir dos 5 g de óleo inicial, uma vez que o procedimento envolve a adição de solução de KOH, etanol, hexano e outras fases líquidas. Da mesma forma, a massa seca de 6,48 g não deve ser interpretada como rendimento de saponificação, pois o material seco pode conter sais de ácidos graxos e outros componentes provenientes dos reagentes utilizados no processo.

A análise espectrofotométrica apresentou aumento da absorbância entre 440 e 480 nm, com máximo observado em 480 nm. Esse resultado merece destaque porque os carotenoides produzidos por *R. toruloides* apresentam diferentes características espectrais. β-caroteno apresenta absorção máxima próxima de 450 nm, enquanto o toruleno apresenta máximos próximos de 478–485 nm. A torularrodina apresenta absorção em região mais deslocada, próxima de 492–502 nm, dependendo do solvente e das condições de análise (Pham et al., 2020; Zoz et al., 2015). Assim, o máximo observado em 480 nm apresenta proximidade com valores descritos para o toruleno.

Além disso, análises de carotenoides de *R. toruloides* demonstram que extratos contendo diferentes pigmentos podem apresentar um máximo global próximo de 488 nm, evidenciando que o perfil espectral de uma matriz não fracionada pode representar a contribuição conjunta de diferentes carotenoides (Pham et al., 2020). Dessa forma, o valor observado de 480 nm pode estar relacionado à presença ou contribuição de compostos carotenoides na fração analisada, mas não permite atribuir o sinal exclusivamente ao toruleno.

A utilização de hexano na etapa de separação também é relevante para a interpretação do resultado. Em processos de saponificação de *R. toruloides*, a diferença de polaridade entre ácidos graxos saponificados e carotenoides pode ser explorada para promover a separação das frações, com os carotenoides apresentando maior afinidade pela fase orgânica (Passarinho et al., 2020). No presente trabalho, entretanto, foi observada coloração alaranjada na fração de aspecto saponáceo coletada, sugerindo que parte do material pigmentado permaneceu associada a essa fração ou que ocorreu

alguma retenção/partição incompleta durante o processo. Essa hipótese deve ser investigada por técnicas analíticas complementares.

A análise realizada apresentou como limitação o fato de ter sido realizada uma única medição e em apenas cinco comprimentos de onda selecionados. Portanto, os resultados obtidos devem ser considerados como uma avaliação preliminar do perfil espectrofotométrico. Para confirmar a identidade dos pigmentos e determinar sua concentração, recomenda-se a realização de análises complementares, especialmente cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD), além de novas leituras espectrofotométricas em uma faixa mais ampla de comprimentos de onda e com replicatas experimentais.

Conclusão

A saponificação alcalina do óleo microbiano de *Rhodotorula toruloides* possibilitou a obtenção de uma fração de aspecto saponáceo e coloração alaranjada intensa. Após seis dias de secagem a 40 °C, observou-se redução de 87,5% da massa registrada antes da secagem, indicando a remoção de componentes voláteis e/ou umidade presentes no material obtido.

A análise espectrofotométrica revelou maior absorbância em 480 nm, com valor de 0,407, comprimento de onda próximo ao relatado na literatura para a absorção do toruleno. Entretanto, os dados obtidos não permitem a identificação específica dos carotenoides presentes, indicando apenas a presença de compostos pigmentados com absorção na região do visível. Estudos complementares, especialmente por HPLC-DAD e FTIR da própria fração saponificada, poderão contribuir para a identificação e caracterização mais detalhada dos constituintes do material obtido.

Referências

LI, Q.; KAMAL, R.; WANG, Q.; YU, X.; ZHAO, Z. K. Lipid production from amino acid wastes by the oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides*. **Energies**, v. 13, n. 7, p. 1576, 2020. DOI: 10.3390/en13071576.

PASSARINHO, P. C.; OLIVEIRA, B.; DIAS, C.; TELES, M.; REIS, A.; SILVA, T. L. da. Sequential carotenoids extraction and biodiesel production from *Rhodosporidium toruloides* NCYC 921 biomass. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, p. 2075-2086, 2020. DOI: 10.1007/s12649-018-0489-1.

PHAM, K. D.; SHIDA, Y.; MIYATA, A.; TAKAMIZAWA, T.; SUZUKI, Y.; ARA, S.; et al. Effect of light on carotenoid and lipid production in the oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 84, n. 7, p. 1501-1512, 2020. DOI: 10.1080/09168451.2020.1740581.

PINHEIRO, M. J.; BONTURI, N.; BELOUAH, I.; MIRANDA, E. A.; LAHTVEE, P.-J. Xylose metabolism and the effect of oxidative stress on lipid and carotenoid production in *Rhodotorula toruloides*: insights for future biorefinery. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, art. 1008, 2020. DOI: 10.3389/fbioe.2020.01008.

SANTOS, A. S.; SALGADO, H. L. C.; BONTURI, N.; DE MELLO, R. F. A.; DA CONCEIÇÃO, L. de K. M.; MIRANDA, E. A. Lipidomic profile of *Rhodotorula toruloides* by GC/MS and antioxidant capacity of the oil by DPPH and TLC-plate methods. **South African Journal of Chemistry**, v. 75, p. 162-167, 2021. DOI: 10.17159/0379-4350/2021/v75a20.

ZHAO, Y.; SONG, B.; LI, J.; ZHANG, J. *Rhodotorula toruloides*: an ideal microbial cell factory to produce oleochemicals, carotenoids, and other products. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 1, art. 13, 2021. DOI: 10.1007/s11274-021-03201-4.

ZOZ, L.; et al. Torularhodin and torulene: bioproduction, properties and prospective applications in food and cosmetics - a review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 2, p. 278-288, 2015. DOI: 10.1590/S1516-8913201400152.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico-CNPq (chamada/processo nº 407946/2022-5). Os autores expressam sua gratidão pelo fomento à pesquisa.