

1 **Extração de lipídios de microalgas dos gêneros *Chlorella*, *Dunaliella* e**

2 ***Nannochloropsis* e suas possíveis aplicações**

3

4 Savienne M. F. E. Zorn¹, Jéssica S. M. Nogueira¹, Júlio G. Soares²

5

6 1 Departamento de Engenharia Química, Escola de Engenharia de Lorena (EEL- USP)

7 2 Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP)

8

9

10 **DESTAQUES**

11 • A extração de lipídios foi mais eficiente na biomassa úmida em relação a seca.

12 • O tempo de ultrassom teve pouca influência na extração no intervalo estudado.

13 • *D. salina* apresentou-se mais adequada para compostos funcionais.

14 • *N. gaditana* é mais indicada para a produção de biodiesel.

15 • *C. minutissima* é apropriada para a produção de biodiesel e compostos funcionais.

16

17 **RESUMO**

18 Microalgas são fonte de energia renovável e têm sido estudadas para a obtenção de diversos

19 bioprodutos, dentre os quais, destacam-se os lipídios, que podem ser aplicados tanto no setor

20 energético quanto no alimentício. Diante disso, este trabalho investigou formas de melhorar

21 o rendimento de extração de lipídios microalgais e explorou as possíveis aplicações desses

22 lipídios. Com o intuito de analisar a influência da umidade da biomassa e do tempo de

23 ultrassom na extração de lipídios, três diferentes espécies marinhas *Chlorella minutissima*,

24 *Dunaliella salina* e *Nannochloropsis gaditana* foram cultivadas em fotobiorreatores tipo

25 coluna de bolhas. A única fonte de carbono empregada nos cultivos foi o dióxido de carbono

26 do ar atmosférico. Neste estudo, foi utilizado o método de extração de lipídios via solventes,

27 com clorofórmio, metanol e água. Constatou-se que a extração foi mais efetiva com a

28 biomassa úmida (64%) em comparação a biomassa seca, ao passo que o tempo de ultrassom

1 pouco influenciou no rendimento. Para avaliar possíveis aplicações, os lipídios totais
2 extraídos da biomassa com 64% de umidade foram quantificados por cromatografia. Pela
3 análise do perfil em ácidos graxos, o gênero *Chlorella* mostrou-se propício tanto para a
4 produção de biodiesel como para compostos funcionais, enquanto o gênero *Dunaliella*
5 apresentou-se mais adequado para compostos funcionais e o gênero *Nannochloropsis* mais
6 indicado para a produção de biodiesel. De acordo com a predição de quatro parâmetros de
7 qualidade do biodiesel, verificou-se que dentre as três espécies, a *N. gaditana* é a mais
8 adequada para a obtenção deste produto.

9

10 PALAVRAS-CHAVE

11 Microalgas. Lipídios. Extração. Biodiesel. Compostos funcionais.

12

13 1. INTRODUÇÃO

14 Algas são os mais simples organismos autotróficos difundidos na Terra. Estima-se
15 que existam até 10 milhões de espécies, sendo que a maioria são provavelmente microalgas,
16 isto é, algas unicelulares [1]. Estes microrganismos formam um grupo polifético autotrófico,
17 que, por sintetizarem seu próprio alimento, são fonte de energia renovável e fornecem
18 produtos e metabólitos para utilização em biocombustíveis, suplementos alimentares,
19 fármacos e cosméticos [2].

20 Microalgas produzem uma ampla gama de bioprodutos, que incluem polissacarídeos,
21 pigmentos, proteínas, vitaminas, compostos bioativos, antioxidantes e lipídios [3]. Além
22 disso, as microalgas têm aplicação no tratamento de água e esgoto e na mitigação
23 significativa do dióxido de carbono atmosférico, visto que, para cada tonelada seca de
24 biomassa microalgal gerada, são consumidas 1,83 toneladas de dióxido de carbono
25 atmosférico [4,5]. Dentre as diversas substâncias relevantes produzidas por estes

1 microrganismos, destacam-se os lipídios. Lipídios algais são compostos por glicerol ou
2 outras bases esterificadas de ácidos graxos saturados ou insaturados [6]. Dentre os ácidos
3 graxos, os das famílias ômega 3 e ômega 6 são de particular interesse, devido à sua utilidade
4 como nutracêuticos [7]. Já no campo energético, os lipídios são matéria-prima para
5 biocombustíveis [8].

6 As espécies marinhas, tais como as dos gêneros *Chlorella*, *Dunaliella* e
7 *Nannochloropsis*, são promissoras para a obtenção de lipídios a partir de sua biomassa. Estas
8 espécies adaptam-se com facilidade em ambiente similar ao marinho e, sob condições
9 adequadas de cultivo, reproduzem-se com facilidade e rapidez, sintetizando conteúdos
10 significativos de lipídios [9].

11 Diversos são os fatores que influenciam no processo de extração de lipídios das
12 células microbianas, dentre estes, a umidade da biomassa é notoriamente importante. A etapa
13 de secagem da biomassa empregando um forno a gás natural envolve grande consumo de
14 energia, da ordem de 3.600 kJ /kg de água removida. Por outro lado, quando processos
15 naturais são empregados, como a secagem ao sol, são necessárias amplas áreas livres e
16 grande demanda de mão-de-obra e tempo, com risco de contaminação [10].

17 Há diversos métodos de extração que podem ser empregados para obtenção de
18 lipídios, dentre estes tem-se: fluído supercrítico, por pulso eletromagnético e via solventes
19 orgânicos. Cada um desses métodos apresenta vantagens e desvantagens. As extrações por
20 fluído supercrítico e por pulso eletromagnético são tecnologias limpas e não poluentes [11,
21 13]. Contudo, os valores para sua implantação e manutenção são altos em comparação com
22 a extração por solventes, devido a exigência em equipamentos, em segurança e ao elevado
23 consumo de energia [12-15]. A extração por solventes é vantajosa por ser aplicável, em
24 escala laboratorial, com baixo custo e resultados rápidos, porém, o uso de solventes
25 apresenta-se em desvantagem quanto à elevada exigência em segurança; no entanto, esses

1 solventes podem ser recuperados e reutilizados no processo [15,17]. Algumas técnicas de
2 pré-tratamento da biomassa atuam como coadjuvantes, potencializando o processo de
3 extração. Uma dessas técnicas é a utilização do ultrassom, que pode elevar em mais de 50%
4 o teor de lipídios extraídos da biomassa [18, 19].

5 Uma importante aplicação dos lipídios extraídos das microalgas marinhas é sua
6 conversão em biodiesel. Este combustível apresenta diversas vantagens sobre o diesel de
7 origem fóssil, tais como: elevado ponto de fulgor, alta lubrificidade e elevada
8 biodegradabilidade, podendo ser utilizado nos motores a diesel convencionais sem qualquer
9 modificação [18]. Uma segunda aplicação está na área nutracêutica, como óleos essenciais
10 e compostos funcionais [19, 20]. Para avaliar quais dessas aplicações são mais adequadas
11 para os lipídios microalgais, é necessário analisar o perfil em ácidos graxos [21]. A partir
12 deste perfil, pode-se prever os parâmetros de qualidade do biodiesel utilizando modelos
13 matemáticos adequados, com a finalidade de potencializar o seu desenvolvimento [22].

14 Neste sentido, o presente trabalho visou a extração de lipídios empregando-se
15 biomassa microbiana de três diferentes espécies de microalgas marinhas. Foram realizados
16 experimentos com biomassa úmida e isenta de umidade. Os resultados demonstraram que os
17 níveis lipídicos extraídos da biomassa úmida são superiores aos da biomassa seca, com uma
18 baixa influência do tempo de ultrassom empregado. Os lipídios extraídos de três diferentes
19 espécies marinhas de microalgas apresentaram-se promissores como matéria-prima para
20 obtenção de compostos funcionais e biocombustível.

21

22 2. MATERIAIS E MÉTODOS

23

24 2.1. Espécies de microalgas marinhas

25 Os experimentos foram realizados com três diferentes microalgas marinhas:
26 *Chlorella minutissima* (Clone 26), *Dunaliella salina* (Clone 116) e *Nannochloropsis*

1 *gaditana* (Clone 130), cujas cepas foram doadas pelo Banco de Microrganismos Aidar &
2 Kutner (BMA&K) do Instituto Oceanográfico – USP – São Paulo. O cultivo, a colheita, a
3 preparação e a hidratação controlada da biomassa foram executados de acordo com Zorn *et*
4 *al.* [23].

6 **2.2. Método de extração de lipídios da biomassa**

7 A extração de lipídios da biomassa empregou, em todos os experimentos, os
8 solventes clorofórmio, metanol e água, na proporção de 5,7:3,0:1,0 em um volume total de
9 33 mL/g de biomassa seca. A influência dos parâmetros umidade da biomassa e tempo de
10 ultrassom sobre o rendimento de extração de lipídios da biomassa microalgal foi avaliada
11 separadamente. Para analisar a influência da umidade, foram realizados experimentos com
12 a biomassa seca e com a biomassa hidratada em três níveis: 64%, 72% e 80%, mantendo-se
13 o tempo de ultrassom fixo em 50 minutos. Para avaliar a influência do tempo de ultrassom,
14 foram feitos experimentos com 50, 70 e 90 minutos, mantendo-se o valor da umidade fixo
15 em 64%. O procedimento de extração foi executado de acordo com Zorn *et al.* [23].

16 O equipamento de ultrassom utilizado foi o modelo USC-1400, fabricante Unique,
17 Brasil, frequência de 40 kHz, potência de 135 W, temperatura da água entre $25 \pm 1^\circ\text{C}$, cuba
18 de 240 x 137 x 100 mm e capacidade de 2,8 L. No banho de ultrassom foram utilizados
19 erlenmeyers de vidro de 125 mL, suspensos por garras, a uma distância fixa de 25 mm do
20 fundo da cuba.

21

22 **2.3. Composição em ácidos graxos**

23 A composição em ácidos graxos foi determinada por cromatografia a gás com
24 detector de ionização por chama (CG-FID). O equipamento utilizado nas análises foi o
25 cromatógrafo CGC AGILENT 68650 SERIES GC SYSTEM, com coluna DB-23 AGILENT

1 (50% cianopropil - metilpolisiloxano, dimensões 60 m, diâmetro interno 0,25 mm, 0,25 µm
2 filme), nas seguintes condições de operação: fluxo de coluna = 1,00 mL/min; velocidade
3 linear de 24 cm/s; temperatura do detector: 280°C; temperatura do injetor: 250°C;
4 temperatura do forno: 110°C (5 min); 110 - 215°C (5°C/min), 215°C - 24 min.; gás de
5 arraste: Hélio; volume injetado: 1,0 µL, detector FID.

6 O padrão utilizado para a análise cromatográfica foi o Supelco F.A.M.E. Mix, C4-C24 do
7 fornecedor Sigma-Aldrich. O método de análise seguiu a norma AOCS Om Ae4-52 [24]. As
8 análises foram realizadas em duplicata, utilizando-se aproximadamente 120 mg de óleo por
9 análise.

10

11 **2.4. Predição dos parâmetros de qualidade do biodiesel**

12 Com base na composição em ácidos graxos das três espécies de microalgas
13 estudadas, utilizou-se o software Biodiesel Analyser (versão 2.2) para predizer propriedades
14 dos respectivos biocombustíveis [21]. Essas propriedades são: número de cetano, índice de
15 iodo, ponto de entupimento de filtro a frio e estabilidade à oxidação.

16

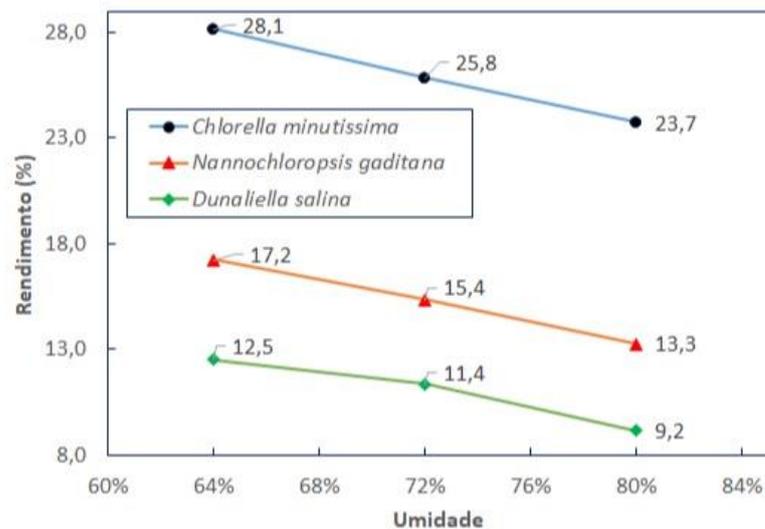
17 **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

18

19 **3.1. Influência da umidade da biomassa no processo de extração**

20 Para as três espécies de microalgas estudadas o maior valor de rendimento de
21 extração de lipídios ocorreu ao nível de umidade de 64%, conforme ilustra a Figura 1. A
22 extração de lipídios da biomassa úmida mostrou-se mais efetiva em comparação à biomassa
23 seca, cujos rendimentos foram de 11,9% para *C. minutissima*, 8,7% para *D. salina* e 11,1%
24 para *N. gaditana*. De acordo com vários autores, a água tem uma função relevante no
25 processo de extração. A parede celular apresenta maior rigidez quando desidratada, o que

1 **dificulta** a penetração dos solventes e a conseqüente saída do complexo lipídio-solvente das
2 células. A água **facilita a ruptura celular e dissolve determinadas estruturas de**
3 **polissacarídeos das células que compõem a biomassa**, o que aumenta a permeabilidade dos
4 solventes através da parede celular, melhorando a efetividade da extração lipídica [25,26].



5
6
7 Figura 1- Rendimento da extração de lipídios com teores de umidade da biomassa de 64%,
8 72% e 80%, para as espécies *Chlorella minutissima*, *Dunaliella salina* e *Nannochloropsis*
9 *gaditana* (desvio padrão de 0,06%).
10

11 Com as biomassas contendo 72% e 80% de umidade, foram observadas menores
12 **eficiências de extração**. Esta queda de rendimento provavelmente está relacionada ao
13 deslocamento do equilíbrio químico entre as fases. Analisando o método utilizado neste
14 trabalho e o método original de Bligh e Dyer [27], o excesso de água passa a ser um fator
15 inibitório, impedindo a captura e conseqüente migração dos lipídios para a fase orgânica
16 [26]. Além disso, os lipídios de maior polaridade, como fosfolipídios, por apresentar um
17 maior coeficiente de partição, deslocam-se para a fase polar na condição de umidade mais
18 elevada da biomassa, conseqüentemente diminuindo o rendimento de extração [26, 27].

19 Diferentes autores extraíram lipídios de biomassas úmidas. Rós *et al.* [28] obtiveram
20 o teor mais elevado de lipídios da cianobactéria *Trichormus sp* com 45% de umidade na
21 biomassa. Chatsungnoen e Chisti [29] obtiveram o teor lipídico mais elevado da microalga

1 *Nannochloropsis salina* em uma biomassa contendo 48% de umidade, enquanto Silve e
2 colaboradores [30] extraíram lipídios da microalga *Auxenochlorella protothecoides* em uma
3 biomassa contendo 70% de umidade. Em todos estes trabalhos os teores de lipídios
4 diferenciaram-se, uma vez que sua produção por microrganismos depende diretamente do
5 metabolismo celular de cada espécie, bem como, das condições de cultivo empregadas [31,
6 32]. Ressalta-se que os métodos de extração variaram quanto à utilização ou não de
7 solventes, quanto ao tempo de processamento e às técnicas de pré-tratamento, os quais
8 também influenciam no rendimento da extração de lipídios [3, 10, 12-15]. Em todos os casos,
9 o teor lipídico obtido a partir da biomassa úmida foi sempre superior em comparação ao da
10 biomassa seca, o que foi confirmado neste trabalho.

11

12 **3.2. Influência do tempo de ultrassom**

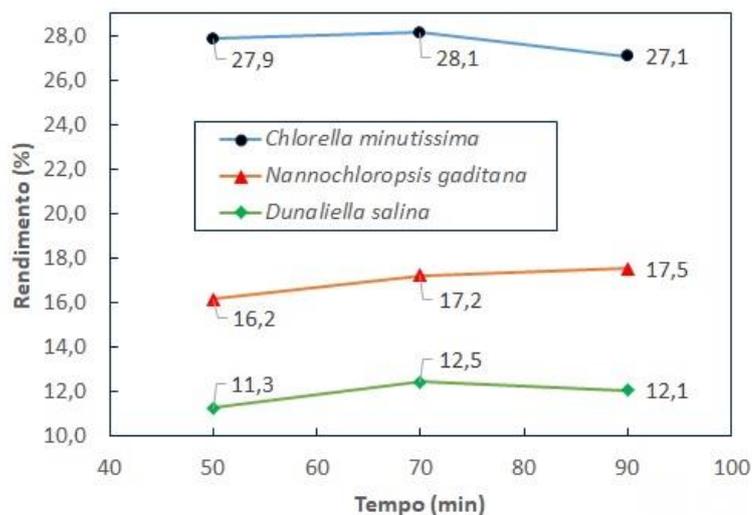
13 De acordo com a Figura 2, nota-se que os rendimentos de extração de lipídios para
14 os diferentes tempos de ultrassom de cada espécie de microalga possuem valores próximos,
15 por volta de 27, 17 e 12%, para *C. minutissima*, *N. gaditana* e *D. salina*, respectivamente.
16 Realizou-se uma análise estatística para verificar se a diferença entre esses dados é
17 significativa. Segundo Torman, Coster e Riboldi [33], para número de amostras menor que
18 10, deve-se utilizar métodos não paramétricos de análise. Como os experimentos foram
19 realizados em triplicata, optou-se pela utilização do método não paramétrico de Kruskal–
20 Wallis, o qual não assume que os dados apresentam um comportamento normal [34].

21 Os testes, realizados no software estatístico Minitab 16®, revelaram que os dados
22 são estatisticamente diferentes ao nível de confiança de 95%, entretanto, a proximidade dos
23 valores obtidos evidencia a baixa influência dos tempos de ultrassom no intervalo estudado.
24 Logo, visando economia de recursos, sugere-se empregar o tempo de ultrassom de 50
25 minutos para extração de lipídios. Resultados parecidos foram obtidos por Escorsim *et al.*

1 [35], que também investigaram o efeito do tempo de ultrassom (37 kHz, 165 W e 60°C) na
2 extração de lipídios da espécie *Acutodesmus obliquus*, utilizando uma mistura de solvente
3 etanol:hexano 2:1 (v/v). Os autores estudaram um intervalo de 5 a 120 minutos de ultrassom
4 e observaram que próximo a 40 minutos o rendimento da extração de lipídios alcançava o
5 equilíbrio. Este resultado corrobora o do presente estudo, no qual o tempo de ultrassom
6 apresentou baixo efeito na faixa de 50 a 90 minutos.

7 Adam *et al.* [36] pesquisaram os efeitos do tempo de ultrassom (20 kHz, 1000 W),
8 no intervalo de 5 a 30 minutos, na extração de lipídios de *Nannochloropsis oculata*,
9 utilizando metanol:clorofórmio (2:1, v/v) como solvente e notaram que o tempo foi
10 significativo no intervalo avaliado, com 95% de confiança. A utilização do ultrassom é
11 importante para o processo, uma vez que o colapso de microbolhas e o aumento da
12 temperatura facilitam a penetração dos solventes e a liberação dos lipídios [28]. Portanto,
13 mesmo considerando espécies de microalgas e configurações de ultrassom (potência e
14 frequência) diferentes, pode-se observar que o tempo de ultrassom possui influência
15 significativa no rendimento da extração de lipídios de microalgas para tempos menores que
16 50 minutos. Acima deste valor, a influência do tempo de ultrassom diminui e o rendimento
17 passa a ser constante.

18
19

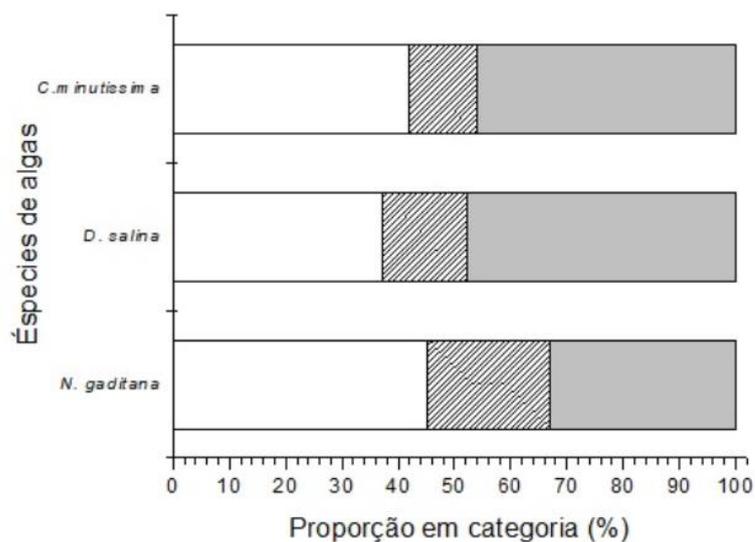


1
2 Figura 2- Rendimento da extração de lipídios com tempos de ultrassom de 50 min, 70 min e
3 90 min, para as espécies *Chlorella minutissima*, *Dunaliella salina* e *Nannochloropsis*
4 *gaditana* (desvio padrão de 0,06%).
5

6 3.3. Perfil em ácidos graxos

7 Os óleos microalgais obtidos nas melhores condições de extração (64% de umidade)
8 foram analisados quanto ao perfil em ácidos graxos. Os ácidos graxos obtidos foram
9 categorizados pelo grau de saturação (saturados, monoinsaturados e poli-insaturados),
10 conforme ilustrado na Figura 3. Verifica-se que o óleo obtido da espécie *D. salina* apresentou
11 proporções de ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados (67%) mais elevados,
12 sendo indicada para obtenção de concentrados de ácidos graxos essenciais. O óleo de *N.*
13 *gaditana* apresentou maior proporção em ácidos graxos saturados e monoinsaturados (63%),
14 sendo recomendada para síntese de biodiesel. O óleo obtido da *C. minutissima*, por outro
15 lado, contendo proporções equilibradas de ácido graxo saturado e poli-insaturado, mostrou-
16 se adequado tanto para obtenção de biocombustível como para concentrado de ácidos graxos
17 essenciais [37]. A composição detalhada dos lipídios das três espécies estudadas encontra-
18 se no Material Suplementar.

19



1
2 Figura 3 - Composição em ácidos graxos das **Espécies** de microalgas, por categorias: em
3 branco (ácidos graxos saturados), em listrado (ácidos graxos **monoinsaturados**) e em cinza
4 (ácidos graxos poli-insaturados).
5

6

7 **3.4. Predição dos parâmetros de qualidade do biodiesel**

8 A partir da composição em ácidos graxos dos óleos extraídos das espécies de
9 microalgas, pode-se prever quatro parâmetros de qualidade do biodiesel utilizando o
10 software Biodiesel Analyser (versão 2.2). Este software demonstra ser uma ferramenta
11 robusta na literatura para predição dos parâmetros de qualidade do biodiesel, sendo aplicado
12 em diferentes trabalhos [38-40]. As equações empíricas utilizadas pelo software tiveram sua
13 precisão estatística para predição das qualidades do biodiesel confirmadas por Ramos *et al.*
14 [41].

15 De acordo com a Tabela 1, o biodiesel das três espécies de microalgas possui um
16 número de cetano (47 a 53) aceitável pelo padrão norte-americano (mínimo de 47), mas
17 somente a *N. gaditana* apresentou valor acima do mínimo estabelecido pelo padrão europeu
18 (51). O padrão brasileiro ainda não possui um limite mínimo de cetano estabelecido para o
19 biodiesel, mas, em geral, o biodiesel tem números de cetano ligeiramente maiores que o
20 diesel fóssil [42]. Para o diesel fóssil o padrão brasileiro estabelece que o número dessa

1 propriedade deve ser superior a 42, o que foi observado para o biodiesel das três microalgas
 2 [42]. Logo, foi possível verificar que somente o biodiesel predito da *N. gaditana* obteve um
 3 número de cetano de acordo com os três padrões citados, o que garante uma boa performance
 4 de início a frio e um funcionamento suave do motor, sem problemas no processo de injeção
 5 e autoignição do combustível [19,43].

6 O índice de iodo é outro parâmetro chave para o estabelecimento da qualidade dos
 7 biocombustíveis. Este índice, com limite especificado somente pelo padrão europeu, mede
 8 a quantidade total de insaturações de uma mistura de ácidos graxos [42]. Combustíveis com
 9 valores elevados para o índice de iodo tendem a polimerizar, levando a formação de
 10 depósitos nos componentes do motor ou deterioração do lubrificante [44]. De acordo com
 11 os valores preditos encontrados para o biodiesel das três espécies (90 a 114 g de iodo/ 100 g
 12 de biodiesel), pode-se verificar que todas atendem à especificação, pois seus índices
 13 encontram-se abaixo de 120 g de iodo por 100 g de amostra [19, 45, 46].

14

15 Tabela 1 – Parâmetros de qualidade preditos para o biodiesel com base na composição em ácidos
 16 graxos das três espécies de microalgas marinhas; propriedades do biodiesel a partir de óleo de soja; e
 17 padrão brasileiro, norte americano e europeu de qualidade de biodiesel.

Parâmetros de Qualidade do Biodiesel					
		Número de Cetano (mínimo)	Índice de Iodo (g de iodo/100 g de biodiesel, máximo)	Ponto de entupimento de filtro a frio (°C, máximo)	Estabilidade à oxidação (h a 110 °C, mínimo)
Biodiesel Vegetal¹	Soja	51,3	125,5	-4	~2
	<i>C. minutissima</i>	47,64	113,2	15,9	5,2
Biodiesel Microalgal²	<i>D. salina</i>	48,11	112,12	11,8	5,2
	<i>N. gaditana</i>	52,63	90,06	14	6,2
Padrão Brasileiro⁵	Limite	Reportar	Reportar	5 – 19 ³	8
Padrão Norte – Americano⁵	Limite	47	Não definido	Não definido	6

1 ¹Valores obtidos de [47]

2 ²Valores calculados com o Software Biodiesel Analyser versão 2.2 [18]

3 ³Baseado em limites regionais de cada país.

4 ⁴Adaptado de [48]

5 ⁵Limites de [42]

6

7 A terceira propriedade que se destaca é o ponto de entupimento de filtro a frio.

8 Quando submetido a baixas temperaturas, o combustível pode formar ceras, sedimentando-
9 se e causando o entupimento dos filtros. Quanto a isto, os ésteres de ácido esteárico e
10 palmítico são os primeiros a precipitar e causar entupimento, portanto, elevadas quantidades
11 desses constituintes são desfavoráveis [44]. Cada país estabelece os limites de temperatura,
12 em função das condições climáticas [42]. *As predições para o biodiesel das três espécies de*
13 *microalgas (11 – 16 °C) obtiveram resultados dentro do limite estabelecido pelo padrão*
14 *brasileiro (5 – 19°C). Como o padrão europeu estabelece uma temperatura mais baixa para*
15 *o ponto de entupimento de filtro a frio, devido ao clima, nenhuma predição conseguiu se*
16 *adequar a esse padrão [42].*

17 Quanto a estabilidade à oxidação, que é mensurada em horas, observa-se *que as*
18 *predições para o biodiesel das três espécies (5,2 – 6,2 h) atenderam somente ao padrão*
19 *europeu (3 h). Apenas o biodiesel predito para a *N. gaditana* obteve resultado acima do*
20 *limite mínimo estabelecido pelo padrão norte-americano (6 h) e nenhum dos valores preditos*
21 *para o biodiesel atendeu ao padrão brasileiro (8 h). Para melhorar o resultado desta*
22 *propriedade, há a possibilidade de adição de substâncias antioxidantes, tais como o alfa-*
23 *tocopherol, que prolongam a estabilidade oxidativa [44]. De forma geral, a espécie*
24 **Nannochloropsis gaditana* destacou-se quanto ao atendimento às propriedades relacionadas,*
25 *embora as outras duas espécies também tenham atendido à maioria dos limites especificados*
26 *[42].*

1 A Tabela 1 também apresenta o valor desses quatro parâmetros discutidos para o
2 biodiesel obtido a partir do óleo de soja, reportado por Hoekman *et al.* [47]. Este biodiesel
3 é majoritariamente produzido em diversos países. Em 2015 representou 76,5% do total
4 produzido no Brasil e, em 2016, 55% do total norte-americano [49, 50], por isso foi escolhido
5 para comparação com o biodiesel de microalgas.

6 De acordo com a Tabela 1, quanto ao número de cetano, verifica-se que o biodiesel
7 de óleo de soja atende a todos os padrões definidos, assim como o biodiesel predito para a
8 *N. gaditana*. Com relação ao índice de iodo, o biodiesel de óleo de soja não se enquadra no
9 padrão europeu, pois apresenta resultado acima do permitido, enquanto o biodiesel predito
10 para as três espécies de microalgas atende a este padrão. Quanto ao ponto de entupimento
11 de filtro a frio, nota-se que o biodiesel do óleo de soja atende somente à especificação do
12 padrão brasileiro, assim como o biodiesel predito para as microalgas. Com relação ao
13 parâmetro de estabilidade à oxidação do biodiesel do óleo de soja, este não atende à
14 especificação de nenhum dos padrões discutidos, enquanto o biodiesel predito de microalgas
15 obedece ao padrão europeu, sendo que o da *N. gaditana* também atende ao padrão norte-
16 americano. Portanto, verifica-se que dentre os parâmetros de qualidade avaliados, o biodiesel
17 predito para as microalgas apresentou mais parâmetros que se enquadram nos padrões [42]
18 que o biodiesel de óleo de soja. Estes resultados evidenciam o potencial de produção de
19 biodiesel a partir dos lipídios de microalgas.

20

21 **4. CONCLUSÃO**

22 De acordo com as condições de cultivo e de extração empregadas, teores mais
23 elevados de lipídios totais foram obtidos com a biomassa contendo 64% de umidade, para
24 as três espécies de microalgas cultivadas, inclusive em comparação com a biomassa seca. O
25 excesso de umidade, no entanto, na faixa entre 72 e 80%, resultou na inibição do processo

1 de extração, o que pode estar associado à dissolução de lipídios polares na fase aquosa. Além
2 disso, verificou-se que o tempo de ultrassom apresentou baixa influência no processo de
3 extração de lipídios dentro do intervalo avaliado. Visando a economia de recursos, sugere-
4 se empregar tempo de ultrassom de 50 minutos para extração de lipídios para as espécies de
5 microalgas estudadas. A avaliação destas variáveis permitiu melhorar a eficácia da extração,
6 com economia de tempo e de energia.

7 Quanto à composição em ácidos graxos, observou-se que os óleos da espécie *D.*
8 *salina* são mais ricos em ácidos graxos essenciais; os da *N. gaditana* são adequados para a
9 produção de biodiesel e os da *C. minutissima* são apropriados tanto para obtenção de
10 biocombustível como para concentrado de ácidos graxos essenciais. Contudo, em relação
11 aos quatro parâmetros de qualidade preditos (número de cetano, índice de iodo, estabilidade
12 à oxidação e ponto de entupimento de filtro a frio), a espécie *N. gaditana* mostrou-se mais
13 adequada que a *C. minutissima* para a produção de biodiesel. Com base nos padrões de
14 qualidade brasileiro, norte-americano e europeu, o biodiesel de microalgas mostrou-se
15 potencialmente promissor frente ao biodiesel de óleo de soja.

16

17 **AGRADECIMENTOS**

18 Agradecimento à FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
19 e à CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo
20 financiamento do projeto e ao Instituto de Oceanografia da USP, pela doação das cepas de
21 microalgas utilizadas no estudo.

22

23 **REFERÊNCIAS**

24

25 [1] KWIETNIEWSKA, E.; TYS, J.; KRZEMINSKA, I.; KOZIEL, W. Microalgae:
26 cultivation and application of biomass as a source of energy: a review. **Instytut**
27 **Agrofizyki**, v. 1, p. 30-36, 2012.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

[2] KHAN, M; SHIN, J, KIM, J. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, 2018.

[3] BRENNAN L, OWENDE P. Biofuels from microalgae- a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renew Sustain Energy Rev.** v. 14, p. 557–577, 2010.

[4] PATIL, J. A.; HONAGUNTIKAR, P. An Overview on developments in biodiesel production from algae. **International Journal of Science and Research (IJSR)**, v. 3, n. 12, p. 102–106, 2014.

[5] CHEAH, W. Y.; SHOW P. L.; CHANG, J.; LING, T. C.; JUAN, J. C. Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae. **Bioresource technology**, v. 184, p. 190–201, 2015.

[6] NEOFOTIS, P.; HUANG, A.; SURY, K.; CHANG, W.; JOSEPH, F.; GABR, A.; TWARY, S.; QIU, W.; HOLGUIN, O.; POLLE, J. E. W. Characterization and classification of highly productive microalgae strains discovered for biofuel and bioproduct generation. **Algal Research**, v. 15, p. 164–178, 2016.

[7] GARCIA, L. J; VICENTE, DE M; GALÁN, B. Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. **Microbial Biotechnology**, v. 10, p. 1017 – 1024, 2017.

[8] LIU, J.; SONG, Y.; QIU, W. Oleaginous microalgae *Nannochloropsis* as a new model for biofuel production: Review & analysis. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 72, p. 154–162, 2017.

[9] HE, Y.; CHEN, L.; ZHOU, Y.; CHEN, H.; ZHOU, X.; CAI, F.; HUANG, J.; WANG, M.; CHEN, B.; GUO, Z. Analysis and model delineation of marine microalgae growth and lipid accumulation in flat-plate photobioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 111, p. 108–116, 2016.

- 1 [10] ANGLES, E; JAOUEN, P, PRUVOST, J, MARCHAL, L. Wet lipid extraction from
2 the microalga *Nannochloropsis* sp.: Disruption, physiological effects and solvent
3 screening. **Algal Research**, v. 21, p. 27-34, 2017.
4
- 5 [11] MCKENNEDY, J.; ÖNENÇ, S.; PALA, M.; MAGUIRE, J. Supercritical carbon
6 dioxide treatment of the microalgae *Nannochloropsis oculata* for the production of fatty
7 acid methyl esters. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 116, p. 264-270, 2016.
8
- 9 [12] XUE, Z; WAN, F; YU, W; LIU, J; ZHANG, Z; KOU, X. Edible Oil Production From
10 Microalgae: A Review. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, v. 133 (6), p. 1-11, 2018.
11
- 12 [13] DU, Y; SCHUUR, B; KERSTEN, S; BRILMAN, D. Opportunities for switchable
13 solvents for lipid extraction from wet algal biomass: an energy evaluation. **Algal**
14 **Research**, v. 11, p. 271–283, 2015.
15
- 16 [14] REDDY, H. K; MUPPANENIA, T; SUN, Y; LI, Y; PONNUSAMY, S; PATIL, P. D;
17 DAILEY, P; SCHAUB, T; HOLGUIN, F. O; DUNGAN, B; COOKE, P; LAMMERS,
18 P; VOORHIES, W; LU, X; DENG, S. Subcritical water extraction of lipids from wet
19 algae for biodiesel production. **Fuel**, v. 133, p. 73–81, 2014.
20
- 21 [15] ECKELBERRY, N.; GREEN, M. P .; FRASER, S. A. Systems And Methods For
22 Extracting Non-Polar Lipids From An Aqueous Algae Slurry And Lipids Produced
23 Therefrom. **United States Patent: US9085745B2**, v. 2, Data da Patente: 21 Jul. 2015
24
- 25 [16] GAROMA, T.; JANDA, D. Investigation of the effects of microalgal cell concentration
26 and electroporation, microwave and ultrasonication on lipid extraction efficiency.
27 **Renewable Energy**, v. 86, p. 117–123, 2016.
28
- 29 [17] SANTOS, R; MOREIRA, D; KUNIGAMI, C; ARANDA, D; TEIXEIRA, C.
30 Comparison between several methods of total lipid extraction from *Chlorella vulgaris*
31 biomass. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 22, p. 95–99, 2015.
32
- 33 [18] CHEN, C. L; HUANG, C. C; HO, K. C; HSIAO, P. X; WU, M. S; CHANG, J. S.
34 Biodiesel production from wet microalgae feedstock using sequential wet

- 1 extraction/transesterification and direct transesterification processes. **Bioresource**
2 **Technology**, v. 194, p. 179–186, 2015.
- 3
- 4 [19] TALEBI, A. F; MOHTASHAMI, S. K; TABATABAEI, M; TOHIDFAR, M;
5 BAGHERI, A; ZEINALABEDINI, M; MIRZAEI, H. H; MIRZAJANZADEH, M;
6 SHAFAROUDI, S. M; BAKHTIARI, S. Fatty acids profiling: a selective criterion for
7 screening microalgae strains for biodiesel production. **Algal Research**, v. 2, n. 3, p.
8 258–267, 2013.
- 9
- 10 [20] SOUZA, N. E. DE; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos:
11 estrutura, classificação, nutrição e saúde. **Arquivos do Museu Dinâmico**
12 **Interdisciplinar**, v. 2, n. 2, p. 102–107, 2012.
- 13
- 14 [21] TALEBI, A. F.; TABATABAEI, M.; CHISTI, Y. A User-friendly software for
15 predicting the properties of prospective biodiesel. **Biofuel Research Journal**, v. 2, n.
16 2, p. 55–57, 2014.
- 17
- 18 [22] SAJJADI, B.; RAMAN, A. A. A.; ARANDIYAN, H. A comprehensive review on
19 properties of edible and non-edible vegetable oil-based biodiesel: Composition,
20 specifications and prediction models. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**.
21 v. 63, p. 62-92, 2016.
- 22
- 23 [23] ZORN S. M. F. E; PEDRO, G.A; AMARAL, M. S; LOURES, C. C. A; SILVA, M. B.
24 Avaliação dos fatores envolvidos na extração de lipídios da biomassa da microalga
25 *Chlorella minutissima* via solventes, **Holos On Line**, v. 2, p. 66 - 78, 2017.
- 26
- 27 [24] Free Fatty Acids, **AOCS Official Method**, Ae 4-52, 2017.
- 28
- 29 [25] COHEN, Z. Chemicals from Microalgae, **CRC press**, v.1, p. 1-560, 2012.
- 30
- 31 [26] HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae
32 for biodiesel production: a review. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 3, p. 709–732,
33 2012.
- 34

- 1 [27] BLIGH, E. G.; DYER, W. J., A Rapid Method of Total Lipid Extraction and
2 Purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 389–
3 395, 1959.
- 4
- 5 [28] RÓS, P; FIORE, M. F; CASTRO, H. F; SILVA, C. S. P; SILVA, M. E; Microbial oil
6 derived from filamentous cyanobacterium trichormus sp. as feedstock to yield fatty acid
7 ethyl esters by enzymatic synthesis. **Journal of Advances in Biology &**
8 **Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 1–14, 2017
- 9
- 10 [29] CHATSUNGNOEN, T.; CHISTI, Y. Optimization of oil extraction from
11 nanochloropsis salina biomass paste. **Algal Research**, v. 15, p. 100–109, 2016.
- 12
- 13 [30] SILVEA, A.; PAPACHRISTOUA, I; WÜSTNERA, R.; STRÄßNERA, R.;
14 SCHIRMERA, M.; LEBERA, K.; GUO, B.; INTERRANTED, L.; POSTENC, C.;
15 FREYA., W., Extraction of lipids from wet microalga *Auxenochlorella protothecoides*
16 using pulsed electric field treatment and ethanol-hexane blends. **Algal Research**, v. 29,
17 p. 212-222, 2018.
- 18
- 19 [31] TAN, X. B.; LAM, M. K.; UEMURA, Y.; LIM, J. W.; WONG, C. Y.; LEE, K. T.;
20 Cultivation of microalgae for biodiesel production: A review on upstream and
21 downstream processing., **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 26, p. 17–30,
22 2018.
- 23
- 24 [32] SIVARAMAKRISHNAN, R.; INCHAROENSAKDI, A.; Microalgae as feedstock for
25 biodiesel production under ultrasound treatment - A review. **Bioresource Technology**,
26 v. 250, p. 877-887, 2018.
- 27
- 28 [33] TORMAN, V. B. L.; COSTER, R.; RIBOLDI, J. Normalidade de variáveis: métodos
29 de verificação e comparação de alguns testes não-paramétricos por simulação. **Revista**
30 **HCPA**, v. 32 (2), p. 227-234, 2012.
- 31
- 32 [34] GUO, S.; ZHONG, S.; ZHANG, A. Privacy-preserving Kruskal–Wallis test. **Computer**
33 **Methods and Programs in Biomedicine**, v. 112, p. 135-145, 2013.
- 34

- 1 [35] ESCORSIM, A. M.; ROCHA, G.; VARGAS, J. V. C.; MARIANO, A. B.; RAMOS, L.
2 P.; CORAZZA, M. L.; CORDEIRO, C. S. Extraction of *Acutodesmus obliquus* lipids
3 using a mixture of ethanol and hexane as solvent. **Biomass and Bioenergy**, v. 108, p.
4 470-478, 2018.
5
- 6 [36] ADAM, F; ABERT-VIAN, M; PELTIER, G; CHEMAT, F. “Solvent-free” ultrasound-
7 assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: A green, clean and scalable
8 process. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 457–465, 2012.
9
- 10 [37] ZORN, S. M. F. E; Desenvolvimento do processo de extração da biomassa de
11 microalgas marinhas, Dissertação de Mestrado, EEL - Universidade de São Paulo, 123
12 p. 2017.
13
- 14 [38] BHATIA, A. K.; YI, D-H.; KIM, Y. H.; KIM, H. J.; SEO, H. M.; LEE, J. H.; KIM, J.
15 H.; JEON, J. M. ; JANG, K. S. ; KIM, Y. G.; YANG, Y. H., Development of semi-
16 synthetic microbial consortia of *Streptomyces coelicolor* for increased production of
17 biodiesel (fatty acid methyl esters). **Fuel**, v. 159, p. 189-196, 2015.
18
- 19 [39] BHATIA, A. K.; KIM, J.; SONG, H. K.; KIM; H. J.; JEON, J. M.; Sathiyarayanan,
20 G.; YOON, J. J.; PARK, K.; KIM, Y. G.; YANG, Y. H., Microbial biodiesel production
21 from oil palm biomass hydrolysate using marine *Rhodococcus* sp. YHY01,
22 **Bioresource Technology**, v. 233, p. 99-109, 2017.
23
- 24 [40] ABOIM, J. B.; OLIVEIRA, D.; FERREIRA, J. E.; SIQUEIRA, A. S.; DALL’AGNOL,
25 L. T.; ROCHA FILHO, G. N.; GONÇALVES, E. C.; NASCIMENTO, L. A.,
26 Determination of biodiesel properties based on a fatty acid profile of eight Amazon
27 cyanobacterial strains grown in two different culture media. **RSC Adv.**, v. 6, 109751-
28 10758, 2016.
29
- 30 [41] RAMOS, M.J., FERNANDEZ, C.M., CASAS, A., RODRIGUEZ, L., PEREZ, A.,
31 Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresour.**
32 **Technol.** v. 100, p. 261–268, 2009.
33

- 1 [42] WHITE PAPER, White Paper On Internationally Compatible Biofuel Standards, **Tripartite Task**
2 **Force Brazil, European Union & United States Of America**, v. 1, p. 1 – 94, 2007.
3
- 4 [43] VERDUZCO, F. L. R; RODRÍGUEZ, R. E.J; JACOB, J. R. A. Predicting cetane
5 number, kinematic viscosity, density and higher heating value of biodiesel from its fatty
6 acid methyl ester composition. **Fuel**, v. 91, p. 102-111, 2012
7
- 8 [44] RÓS, P. **Avaliação de óleos de cianobactérias como matéria-prima lipídica para**
9 **síntese de biodiesel pela rota etílica**. 2012. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de
10 Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.
11
- 12 [45] KNOTHE, G., A comprehensive evaluation of the cetane numbers of fatty acid methyl
13 esters. **Fuel**, v. 119, n. 1, p. 6–13, 2014.
14
- 15 [46] KNOTHE, G.; MATHEAUS, A. C.; RYAN, T. W., Cetane numbers of branched and
16 straight-chain fatty esters determined in an ignition quality tester. **Fuel**, v. 82, n. 8, p.
17 971–975, 2003.
18
- 19 [47] HOEKMAN, S. K; BROCH, A; ROBBINS, C; CENICEROS, E; NATARAJAN, M.,
20 Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renewable and*
21 *Sustainable Energy Reviews*, v.16, p. 143-169, 2012.
22
- 23 [48] PEREZ, A; LISINGER, T. P. J. CERTIFICATION REPORT The certification of the
24 cold filter plugging point (CFPP) and the cloud point (CP) in biodiesel from rapeseed:
25 ERM®- EF002. **Publications Office of the European Union**, p. 1-36, 2016.
26
- 27 [49] OLIVEIRA, M. Óleo para o biodiesel. **Revista Pesquisa FAPESP**, Ed. 245, Julho
28 2016.
29
- 30 [50] EIA (U.S. Energy Information Administration), "Biofuels: Ethanol and Biodiesel
31 Explained", 2017. Disponível online em: <
32 https://www.eia.gov/energyexplained/index.php?page=biofuel_biodiesel_home>;
33 última visita em 11/05/2018.