

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS**

MARIANA LARA MENEGAZZO

**CULTIVO DE *Chlorella sorokiniana* PARA EXTRAÇÃO DE ÓLEO E
PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

Dourados-MS
Maio, 2017

MARIANA LARA MENEGAZZO

**CULTIVO DE *Chlorella sorokiniana* PARA EXTRAÇÃO DE ÓLEO E
PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia na área de concentração Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca

Dourados-MS
Maio, 2017

Catálogo na Publicação

M534c Menegazzo, Mariana Lara.
Cultivo de *Chlorella sorokiniana* para extração de óleo e produção de biodiesel. / Mariana Lara Menegazzo. – Dourados, MS : UFGD, 2017.
127f.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca.
Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia) – Universidade Federal da Grande Dourados.

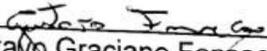
1. Lipídios. 2. FAME. 3. Biocombustível. 4. Colheita. 5. Microalga. I. Título.

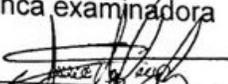


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

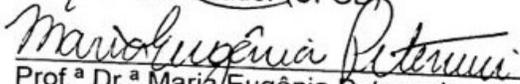
Termo de Aprovação

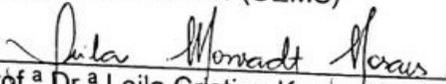
Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a tese intitulada: "**Cultivo de *Chlorella sorokiniana* para extração de óleo e produção de biodiesel**", de autoria de **Mariana Lara Menegazzo**, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.


Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca
Presidente da banca examinadora


Prof. Dr. William Renzo Cortez-Vega
Membro Examinador (UFGD)


Prof. Dr. Emerson Machado de Carvalho
Membro Examinador (UFGD)


Prof.^a Dr.^a Maria Eugênia Petenuci
Membro Examinador (UEMS)


Prof.^a Dr.^a Leila Cristina Konradt Moraes
Membro Examinador (UEMS)

Dourados/MS, 12 de maio de 2017.

DEDICATORIA

Dedico este trabalho a todos que
confiaram em mim e que contribuíram para
sua realização.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à Deus, pelas bênçãos alcançadas no decorrer deste caminho e por iluminar, encorajar e discernir meus passos nos momentos fáceis e difíceis;

Ao Cleber que sempre me apoiou e também por todo companheirismo, paciência e colaboração direta ou indireta na realização das pesquisas deste trabalho;

A minha mãe, meu irmão e aos novos membros nessa família que amparam e motivam a estudar, estudar e estudar;

As minhas amigas de longa data Cinthia e Maria Eugenia, que com muito carinho, companheirismo e auxílio, fizeram esta jornada ser suave;

Aos companheiros do laboratório e arredores, pela convivência, tererés e pipoca, Valkirea, Marta, Pedro, Carmem, Alisson, Dagon, Nathanya, Otavio, Rosiane, Alessandra, Cintia, Ligia;

Aos meus amigos do CSF, Raissa, Thalita, Cinthia, Barbara, Fatima, Humeyra e Mahmood por me acolherem e tornarem a vida mais fácil num lugar maravilhoso;

Aos Professores Dr. Gustavo Graciano Fonseca e Dr. Jamie Hestekin, exemplos de dedicação e de pesquisadores, agradeço pelas orientações, ensinamentos, confiança, oportunidades, liberdade e pelos elogios que incentivaram e que me motivaram a melhorar;

À banca examinadora (qualificação e final) pelas contribuições de melhoria desta tese e artigos vindouros;

À Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD, em nome de todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, pelos ensinamentos e apoio.

EPIGRAFE

“Toda ação humana, quer se torne positiva ou negativa, precisa depender de
motivação”.

Dalai Lama

Lista de Figuras

Figura 3.1 Condições ambientais para o período de cultivo.....	74
Figura 4.1 Variação da eficiência de floculação	91
Figura 4.2 Variação eficiência ao longo do tempo	95
Figura 5.1 Efeito do método de rompimento celular, solvente e tempo na extração de lipídios	105
Figura 5.2 Produtividade alcançada neste estudo.	107
Figura 5.3 Comparação do perfil e composição de ácidos graxos para extração por ultrassom e solventes.	110
Figura 5.4 Comparação do perfil e composição de ácidos graxos para extração por agitação e solventes.	110
Figura 5.5 Composição em gráfico ternário de saturados, mono- e poli-insaturados para extração por ultrassom.....	113
Figura 5.6 Composição em gráfico ternário de saturados, mono- e poli-insaturados para extração por agitação.....	113

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 Recuperação de biomassa por sedimentação e auto floculação.....	12
Tabela 2.2 Recuperação de biomassa por flotação.	14
Tabela 2.3 Recuperação de biomassa por floculação.....	16
Tabela 2.4 Recuperação de biomassa por centrifugação.....	18
Tabela 2.5 Teor de sólidos suspensos, em biomassa, por filtração.....	19
Tabela 2.6 Métodos de separação da biomassa	20
Tabela 2.7 Efeito dos métodos de recuperação na fração lipídica	23
Tabela 2.8 Conteúdo lipídico e ácidos graxos em diferentes espécies de microalgas	26
Tabela 2. 9 Processos para extração de lipídios.....	30
Tabela 2. 10 Comparação dos métodos de rompimento celular de biomassa de microalgas para escalonamento e produção de biocombustíveis.....	37
Tabela 2.11 Influência do método de rompimento celular no rendimento de lipídios....	38
Tabela 2. 12 Componentes extraídos pelos solventes	43
Tabela 2.13 Influência do método de rompimento celular assistido por solventes no rendimento de lipídios	47
Tabela 2.14 Propriedades de diferentes biodieseis	52
Tabela 3.1 Crescimento, produtividade e composição de <i>Chlorella sorokiniana</i>	75
Tabela 3.2 Propriedades de diferentes biodieseis	77
Tabela 5. 1 Sistema de extração.....	103
Tabela 5. 2 Métodos de extração de lipídios para o gênero <i>Chlorella</i>	108

Lista de Abreviaturas, Siglas e Fórmulas

A	Alto
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AM	Agitação
ANP	Agência Nacional do Petróleo
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
B	Baixo
B100	Biodiesel puro
BeD	Bligh & Dyer
BT	Sebo bovino
C	Clorofórmio
C16:0	Ácido palmítico
C16:1	Ácido palmitoleico
C18:1	Ácido oleico
C18:2	Ácido linoleico
C18:3 ω 3	Ácido alfa-linolênico
C18:4	Ácido estearidônico
C20:1	Ácido araquídico
C20:3	Ácido eicosatrienóico
C20:4 ω 3	Ácido araquidônico
C20:5	Ácido eicosapentaenóico
C22:6 ω 3	Ácido docosaexanóico
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto de Calcio dihidratado
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	Nitrato de cobalto hexahidratado
CP	<i>Chlorella protothecoides</i>
CS	<i>Chlorella sorokiniana</i>
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado
CV	<i>Chlorella vulgaris</i>
D	Densidade (g cm ⁻³)
DE	Dietileter
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Etanol
EDTA-Na ₂	Ácido etilenodiaminotetracético
EMAG	Ésteres metílicos de ácidos graxos
EPA	Ácido eicosapentaenóico
ETA	Ácido eicosatetraenóico
FAEE	Ésteres etílicos de ácidos graxos
FAME	Ésteres metílicos de ácidos graxos
FC	Fator de Concentração

FDA-USA	Food and Drug Administration
FID	Detector de ionização por chama
GC	Cromatografia gasosa
GI	Grau de instauração
GRAS	Generally Recognized as Safe
H	Hexano
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
H ₃ BO ₃	Ácido bórico
He	Altura do espessado
HI	Altura da fase líquida
HPH	Homogeneização à alta pressão
I	Isopropanol
II	Índice de iodo
IS	Índice de saponificação
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	Fosfato de potássio dibásico trihidratado
KH ₂ PO ₄ ,	Fosfato monopotássio
KOH	Hidróxido de potássio
M	Médio
M	Metanol
MEL	Métodos de extração de lipídios
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de Magnésio heptahidratado
MnCl ₂ .4H ₂ O	Cloreto de magnésio tetrahidratado
MoO ₃	Trióxido de molibdênio
MRC	Métodos de rompimento celular
MUFA	Ácidos graxos monoinsaturados (%)
n.e.	Não especificado
NaCl	Cloreto de sódio
NaNO ₃	Nitrato de sódio
NC	Número de cetano
NO	<i>Nannochloopsis oculata</i>
OD ₆₇₀	Densidade ótica mensurada em 670 nm
OD _i	Densidade ótica no tempo zero (inicial)
OD _t	Densidade ótica no tempo t.
PB	Biodiesel de palma
PC	Poder calorífico (MJ kg ⁻¹)
PEFF	Ponto de entupimento de filtro à frio (°C)
PN	Ponto de nuvem (°C)
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel
PUFA	Ácidos graxos poli-insaturados (%)
Ref.	Referência
SB	Biodiesel de soja

SC-CO ₂	Supercrítico – dióxido de carbono
SD	<i>Scenedesmus dimorphos</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFA	Ácidos graxos saturados (%)
TAG	Triacilglicerol
TD	Tempo de duplicação
TS	Tempo de sedimentação (h)
US	Ultrassom
UV	Ultravioleta
V	Viscosidade cinemática (mm ² s ⁻¹)
VS	Volume de sedimentação
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinco heptahidratado
μ _{max}	Velocidade específica de crescimento máxima

ABSTRACT

Menegazzo, M. L. Cultivation of *Chlorella sorokiniana* to oil extraction and biodiesel production. 2017.122p. Thesis (PhD in Environmental Science and Technology) - Faculty of Exact Sciences and Technology, Federal University of Great Dourados, Dourados/MS, 2017.

The microalgae biomass, mainly rich in lipids, carbohydrates and other compound groups, has been considered as a promising raw material for biodiesel production. This research aimed to evaluate the biomass of *Chlorella sorokiniana*, and how the yield of lipid and the fatty acids composition are impacted by the extraction methods (cell disruption with ultrasonic or agitation assisted by solvents with different polarities). The parameters and conditions of cultivation like nitrogen stress, lighting and temperature could affect the lipid content and the fatty acids. In this work, microalgae were cultivated with BBM, outside and the temperature was 26.28 ± 3.42 °C, light intensity 580.02 ± 87.18 $\mu\text{moles.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ with photoperiod of 12/12 h light/dark during 30 days in photobioreactor with 18 liters. The growth rate, biomass productivity and dry biomass were 0.250 day^{-1} , $0.0433 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ and 1.3 g L^{-1} respectively. The lipid yield was $20.07 \pm 1.53\%$, quantified by Bligh & Dyer method. The harvesting was tested with flocculation followed by sedimentation using ferric chloride, zinc sulfate, aluminum sulfate, sodium hydroxide (concentration 0.25 g L^{-1}) and autoflocculation, the best flocculant, ferric chloride, was examined using different concentrations (0.25 to 1 g L^{-1}). The concentration that guaranteed better yields (80%) in a shorter time (10 min) was 0.75 g L^{-1} . The extraction methods using ultrasound and agitation as disrupt cell, assisted by different solvent like hexane, chloroform, ethanol, methanol and chloroform: methanol 2:1 (v v^{-1}) present different yields of lipids. When the polarity increase, yields of lipids increase. The solvent mixture reached 13-16%, methanol 9-15%, followed by ethanol 5-13%, and chloroform and hexane did not reach 5%. Ultrasound, as a method of cellular disruption, was less efficient than agitation. The biomass of *Chlorella sorokiniana* has a predominance of polar lipids in its composition. These lipids could be extract using ethanol, however, the ethanol extraction productivity was lower than mixture of solvents. The polarity of the solvent did not affect the profile and composition of fatty acids methyl esters in all methods, with slightly differences in percentages of C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 and C18:3. Biodiesel produced from different methods of extraction lipid has the potential to be used as blends, due to its high content of saturated fatty acids. This kind of profile affect the parameters of cold filter plugging point and cloud point.

Keywords: Lipids; FAME; biofuel; harvesting; microalgae.

SUMÁRIO

1	Introdução geral	1
1.1	Objetivo geral.....	2
1.2	Objetivos específicos.....	2
1.3	Estrutura do trabalho.....	2
	Referências	4
2	Artigo: Processos de recuperação de biomassa e extração de lipídios para produção de biodiesel de microalgas: uma revisão	6
2.1	Introdução.....	6
2.2	Microalgas.....	7
2.3	Condições de cultivo e sua influência no conteúdo lipídico.....	8
2.4	Separação da biomassa de microalgas.....	10
2.4.1	Métodos de espessamento da biomassa.....	10
2.4.1.1	Sedimentação gravimétrica e auto floculação.....	11
2.4.1.2	Flotação.....	12
2.4.1.3	Floculação.....	14
2.4.2	Métodos de deságue da biomassa.....	16
2.4.2.1	Centrifugação.....	17
2.4.2.2	Filtração.....	18
2.4.2.3	Seleção do método de espessamento e desague da biomassa.....	20
2.4.3	Efeito dos métodos de recuperação de biomassa no conteúdo lipídico e perfil de ácidos graxos.....	21
2.5	Conteúdo lipídico em microalgas.....	26
2.5.1	Ácidos graxos.....	27
2.6	Processos para extração de lipídios em microalgas.....	29
2.6.1	Métodos de rompimento celular.....	30
2.6.1.1	Ultrassom.....	30
2.6.1.2	Homogeneização à alta pressão.....	31
2.6.1.3	Prensagem.....	32
2.6.1.4	Moinho de bolas.....	32
2.6.1.5	Micro-ondas.....	33
2.6.1.6	Choque osmótico.....	34
2.6.1.7	Quebra química.....	35
2.6.1.8	Quebra enzimática.....	36
2.6.2	Seleção de métodos de rompimento celular.....	36

2.7	Métodos de Secagem biomassa e redução do tamanho das partículas	39
2.8	Métodos de extração de lipídios	41
2.8.1	Fluido supercrítico	42
2.8.2	Solventes	43
2.8.3	Efeito dos métodos de rompimento celular e extração no conteúdo lipídico e perfil de ácidos graxos	45
2.9	Biodiesel	49
2.9.1	Microalgas como potencial para produção de biodiesel	49
2.9.2	Transesterificação direta	50
2.9.3	Propriedades do biodiesel de microalgas.....	51
2.10	Conclusão	53
	Referências	54
3	Artigo: Cultivo de <i>Chlorella sorokiniana</i> como potencial para produção de biodiesel	70
3.1	Introdução.....	70
3.2	Material e métodos.....	71
3.2.1	Preparação e tratamento da microalga	71
3.2.2	Análise de crescimento e composição da biomassa	72
3.2.3	Perfil e composição de ácidos graxos.....	72
3.2.4	Predição de propriedades do biodiesel	73
3.3	Resultados e discussão	73
3.3.1	Crescimento e composição da biomassa	73
3.3.2	Recuperação da biomassa	76
3.3.3	Propriedades do biodiesel	76
3.4	Conclusão	79
	Referências	80
4	Artigo: Recuperação de biomassa de <i>Chlorella sorokiniana</i> através de diferentes flocculantes.....	85
4.1	Introdução.....	85
4.2	Materiais e métodos	87
4.2.1	Espécies e cultivo de microalga.....	87
4.2.2	Sistema de flocculação	87
4.2.3	Grau de flocculação	88
4.2.4	Avaliação de desempenho da flocculação.....	88
4.2.5	Análise estatística	88
4.3	Resultados e discussão	89
4.3.1	Ação dos agentes flocculantes.....	89

4.3.2	Grau de floculação dos diferentes floclantes	89
4.3.3	Recuperação e clareamento do meio	90
4.3.4	Estudo de diferentes concentrações de FeCl ₃ para floculação.....	93
4.3.5	Grau de floculação das concentrações de FeCl ₃	94
4.3.6	Recuperação e clareamento do meio	94
4.4	Conclusão	96
	Referências	96
5	Artigo: Composição de FAME obtidos por diferentes métodos de extração de lipídios de <i>Chlorella sorokiniana</i>	100
5.1	Introdução.....	100
5.2	Materiais e métodos	102
5.2.1	Preparação e tratamento da microalga	102
5.2.2	Extração lipídica utilizando agitação ou banho de ultrassom	102
5.2.3	Transesterificação	103
5.2.4	Perfil e composição de ácidos graxos.....	103
5.2.5	Produtividade dos métodos de extração lipídica	104
5.2.6	Análise estatística	104
5.3	Resultados e discussão	104
5.3.1	O impacto da polaridade do solvente na extração lipídica	104
5.3.2	Produtividade de lipídios nos sistemas de extração	107
5.3.3	Perfil e composição de ácidos graxos.....	109
5.4	Conclusão	114
	Referências	115
6	Considerações finais.....	120
	Anexo A – Equações para predição de propriedades do biodiesel	121

1 Introdução geral

As microalgas podem ser consideradas uma promissora fonte alternativa energética. Entre as principais razões tem-se o baixo consumo de água durante seu cultivo; alto rendimento de biomassa por área comparado a outras culturas; possibilidade de se utilizar terras não agriculturáveis para tal cultivo e uso de resíduos agroindustriais como fonte de nutrientes. Por sua capacidade de sintetizar lipídios vem sendo estudada para produção de biodiesel (1–4).

Os teores de lipídios de microalgas encontrados na literatura podem variar de 5 a 75% em termos de biomassa seca (5–7). Os lipídios das microalgas apresentam composição em ácidos graxos de 14 a 22 átomos de carbono semelhante ao dos óleos vegetais usados na produção de biodiesel (8–10). A biomassa residual da microalga, após extração dos lipídios, pode ser utilizada para gerar energia (biogás) ou coprodutos com valor comercial (11,12). Estas alternativas mostram-se promissoras para a redução de impactos ambientais. Porém, deve-se enfatizar a otimização de parâmetros, como as características da biomassa a ser produzida (sistemas de cultivo), a eficiência da produção e a produtividade lipídica e sua conversão a biodiesel (9,13,14).

As microalgas do gênero *Chlorella* são consideradas aptas para sintetizar compostos como proteínas e lipídios, sendo reconhecida pela sua capacidade de crescer em condições de stress ambiental e habilidade de se desenvolver em efluentes (15,16). Os valores nutricionais da *Chlorella* sp. apresentam variações dependendo do modo de cultivo, quantidade de energia solar, estação climática e outros fatores (17). Sua biomassa é rica em carboidratos e lipídios quando cultivada em condições mínimas com adição de nitrogênio, fosforo e outros nutrientes traços e na presença de luz e dióxido de carbono (CO₂) (16).

Chlorella sp. pode se desenvolver em temperaturas médias elevadas. Estudos relatam que possui grande vantagem por apresentar alta tolerância à temperatura e concentração de CO₂, mantendo crescimento a 42°C e 40% de CO₂, em pH neutro (18). Portanto, sua produção pode ser simplificada e não necessita um meio de cultivo complexo e de custo elevado (17,16,19). Possui o certificado G.R.A.S. (*Generally Recognized As Safe*) concedido pelo F.D.A. (*Food and Drug Administration*), que a libera para consumo humano nos Estados Unidos e que é aceito pela quase totalidade dos demais países, incluindo Japão e toda a Europa, sem risco à saúde.

A *Chlorella solokiniana* pertence ao Gênero *Chlorella*, Família *Oocystaceae*, Ordem *Chlorococcale*, Classe *Chlorophyceae* e Divisão *Chlorophyta*. É considerada

microalga verde, unicelular microscópica, eucariótica, esférica e com diâmetro variando entre 5-30 μm , que pode ser encontrada em tanques e lagos, com alta capacidade fotossintética (17).

1.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi a extração de lipídios de *Chlorella sorokiniana* usando métodos de rompimento celular assistidos por solventes orgânicos, para a produção de biodiesel.

1.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

- Analisar o crescimento e a produtividade em cultivos com *Chlorella sorokiniana* em fotobiorreatores de 18 L, caracterizar a biomassa obtida e o potencial dos lipídios extraídos para produção de biodiesel;
- Analisar os diferentes agentes flocculantes afim de estabelecer uma concentração rápida e eficaz para a recuperação da biomassa de *Chlorella sorokiniana*;
- Avaliar a extração de lipídios através de planejamento experimental combinando dois métodos de rompimento celular e solventes orgânicos em três tempos distintos;
- Comparar os rendimentos da extração com o método convencional (Bligh & Dyer, 1959);
- Avaliar as produtividades dos métodos de extração de lipídios;
- Examinar as diferenças qualitativas e quantitativas no perfil de ácidos graxos obtidos a partir dos diferentes métodos de extração de lipídios;
- Avaliar a influência desse perfil de ácidos graxos nas características dos biodieseis obtidos.

1.3 Estrutura do trabalho

Este estudo foi motivado pela necessidade de avaliação de métodos de extração da fração lipídica de microalgas para a produção de biodiesel. Buscou-se contribuir especificamente para avaliação das produtividades e rendimentos de lipídios e o impacto na composição de ácidos graxos. Esta tese de doutorado foi dividida em artigos, descrevendo-se numa sequência experimental, a pesquisa desenvolvida ao longo do período.

O Capítulo 1 apresenta uma introdução geral sobre o tema e os objetivos deste trabalho. O Capítulo 2 trata de uma revisão sobre produção de lipídios pelas microalgas e métodos de extração dessa fração lipídica, intitulado “Processos de recuperação de biomassa e extração de lipídios para produção de biodiesel de microalgas: uma revisão”. O Capítulo 3 aborda o cultivo e o crescimento da microalga, visando a exploração desta como fonte de lipídios para a produção de biodiesel, intitulado “Cultivo de *Chlorella sorokiniana* e seu potencial para produção de biodiesel”. O Capítulo 4 apresenta a avaliação das biomassas de microalgas recuperadas, comparando diversos agentes floculantes e estabelecendo a melhor concentração para sua recuperação, levando-se em conta a rapidez e a eficiência de processo, intitulado “Recuperação de biomassa de *Chlorella sorokiniana* através de diferentes agentes floculantes”. O Capítulo 5 reporta os métodos de extração da fração lipídica das biomassas de microalgas, utilizando combinação de rompimento celular, solventes orgânicos e tempo afim de avaliar as produtividades lipídicas e os perfis e as porcentagens de ácidos graxos para a produção de biodiesel, intitulado “Composição de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) obtidos por diferentes métodos de extração de óleo de *Chlorella sorokiniana*”.

As construções dos artigos foram elaboradas seguindo as normas exigidas pelas revistas as quais serão submetidos. Contudo, a de apresentação desta tese está de acordo com as normas da ABNT (sistema numérico de citação e referência por ordem de aparecimento no texto).

Referências

1. BENEMANN, J. Microalgae for biofuels and animal feeds. **Energies**, v.6, n. 11, p. 5869-5886, 2013.
2. SUALI, E.; SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 6, p. 4316–4342, 2012.
3. LAM, M. K.; LEE, K. T. Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 673–90, 2012.
4. MAITY, J. P. et al. Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives – A mini review. **Energy**, v. 78, p. 104–113, 2014.
5. SHARMA, K. K.; SCHUHMANN, H.; SCHENK, P. M. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. **Energies**, v. 5, n. 5, p. 1532–1553, 2012.
6. MARKOU, G.; NERANTZIS, E. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 8, p. 1532–42, 2013.
7. OHSE, S. et al. Lipid content and fatty acid profiles in ten species of microalgae. **IDESIA**, v. 33, n. 1, p. 93–102, 2015.
8. TRINIDAD, M. et al. Producción de biodiesel a partir de microalgas: Biodiesel production from microalgae : **Acta Biológica Colombiana**, v. 18, p. 43–68, 2013.
9. PATIL, V.; TRAN, K. Q.; GISELRØD, H. R. Towards sustainable production of biofuels from microalgae. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n.7, p. 1188-1195, 2008.
10. KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 1059–1070, 2005.
11. HERNÁNDEZ, D. et al. Biofuels from microalgae: Lipid extraction and methane production from the residual biomass in a biorefinery approach. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 370–378, 2014.
12. IYOVO, G. D.; DU, G.; CHEN, J. Sustainable bioenergy bioprocessing: biomethane production, digestate as biofertilizer and as supplemental feed in algae cultivation to promote algae biofuel commercialization. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 2, n. 4, p. 100–106, 2010.
13. CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294–306, 2007.
14. RAWAT, I. et al. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. **Applied Energy**, v. 103, p. 444–467, 2013.

15. KIM, B. H. et al. *Chlorella sorokiniana* HS1, a novel freshwater green algal strain, grows and hyperaccumulates lipid droplets in seawater salinity. **Biomass and Bioenergy**, v. 85, p. 300–305, 2016.
16. KOBAYASHI, N. et al. Characterization of three *Chlorella sorokiniana* strains in anaerobic digested effluent from cattle manure. **Bioresource Technology**, v. 150, p. 377–386, 2013.
17. RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture Biotechnology and Applied Phycology**, Londres: Blackwell Science, 2004, 588p.
18. JI, Y. et al. Mixotrophic growth and biochemical analysis of *Chlorella vulgaris* cultivated with diluted monosodium glutamate wastewater. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 471–6, 2014.
19. URSU, A. V. et al. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 134–139, 2014.

2 Artigo: Processos de recuperação de biomassa e extração de lipídios para produção de biodiesel de microalgas: uma revisão

Resumo

As microalgas são fontes de diversas biomoléculas, *e.g.* lipídios, proteínas, carboidratos, vitaminas e pigmentos. Neste trabalho foram apresentados os processos que influenciam no conteúdo e extração lipídica, através de levantamento bibliográfico dos principais processos envolvidos. Os lipídios das microalgas podem ser utilizados para diferentes aplicações, como fármacos, alimentos e biocombustíveis e seu propósito deve levar em consideração a concentração e o tipo de lipídio que se deseja obter. Isto porque algumas das etapas do processo, como o cultivo e a extração dos lipídios, refletem diretamente sobre os resultados obtidos. O rendimento da fração lipídica pode apresentar diferença quanto ao mecanismo de recuperação da biomassa utilizado, *e.g.* centrifugação, floculação e filtração. A eficiência dos métodos de rompimento celular para a extração de lipídios, *e.g.* ultrassom, micro-ondas, moinho de bolas, choque osmótico e solventes, por sua vez, depende da rigidez da parede celular e dos tipos de lipídios presentes, ligados por forças de Van der Waals ou pontes de hidrogênio, o que é reflexo principalmente da espécie e das condições de cultivo empregados. Assim, o biodiesel obtido a partir de microalgas exibirá características distintas dependendo da espécie, das condições de cultivo, dos métodos de recuperação de biomassa e de extração de lipídios e, conseqüentemente, do perfil e da composição dos ácidos graxos. Tais aspectos influenciam diretamente na qualidade do biodiesel.

Palavras-Chave: óleo, solvente, recuperação, biocombustível, microalgas

2.1 Introdução

As microalgas podem ser consideradas como uma promissora fonte energética. Entre as principais razões tem-se o baixo emprego de água no cultivo; o alto rendimento de biomassa por área comparado a outras culturas; a possibilidade de utilizar terras não agriculturáveis para o cultivo; uso de resíduos agroindustriais como fonte de nutrientes, *e.g.* efluentes de suinocultura, bovinocultura ou vinhaça (1–3). Por sua capacidade de sintetizar lipídios vem sendo estudada para produção de biodiesel e outros produtos de alto valor agregado (1,4,5).

A biomassa de microalgas contém componentes principais como carboidratos, proteínas, lipídios, pigmentos, entre outros (5,6). Cada espécie de microalga é capaz de produzir diferentes teores destes componentes e tem a habilidade de alterar seu metabolismo de acordo com as mudanças na composição química do meio de cultivo e demais condições de cultivo (7).

A utilização da biomassa de microalgas apresenta potencial para ser utilizadas em diversos processos energéticos, no entanto, há vários obstáculos tecnológicos e econômicos que devem ser superados antes de se partir para uma escala industrial de produção de biodiesel a partir de microalgas. Como grande desafio está a escolha de uma efetiva estratégia para a recuperação de biomassa e a extração de lipídios, pois o escalonamento destes processos pode ser crítico, sendo necessário o desenvolvimento de um processo energeticamente favorável, ambientalmente amigável e economicamente viável (5,8).

Esta revisão apresenta uma descrição dos processos de recuperação da biomassa e dos métodos de rompimento celular para a extração dos lipídios, relacionando sua influência aos rendimentos de conteúdo lipídico e de ácidos graxos para a produção de biodiesel.

2.2 Microalgas

Microalgas são microrganismos que estão presentes em sistemas aquáticos com grande diversidade de formas, características e funções ecológicas. Elas podem ser economicamente exploradas sob diversos aspectos, *e.g.* produção de alimentos para nutrição humana e animal (especialmente na aquicultura), fármacos e biocombustíveis (9–11). As microalgas podem crescer em sistemas autotróficos, heterotróficos ou mixotróficos. Este último utiliza simultaneamente fonte luminosa e substrato orgânico como fontes de energia, além de CO₂ e substrato orgânico como fontes de carbono (12,13).

Para o crescimento de microalgas é necessário a interação entre fatores biológicos, químicos e físicos. Os fatores biológicos referem-se às suas próprias taxas metabólicas, específicas da espécie cultivada, e à influência de outros organismos sobre o desenvolvimento microalgal, como fungos, protozoários e outros microrganismos. Os principais fatores físicos e químicos que afetam o crescimento das microalgas são luz, temperatura, pH, salinidade e disponibilidade de nutrientes (9,10,14–16).

Não há um meio de cultivo único para todas as espécies de microalgas, uma vez que cada uma tem suas necessidades específicas. Assim, a composição bioquímica das microalgas, *e.g.* concentração total de proteínas, lipídios e carboidratos, varia conforme os parâmetros utilizados (15,17–20) tais como temperatura, incidência luminosa, fonte de nutrientes entre outros.

2.3 Condições de cultivo e sua influência no conteúdo lipídico

Alguns elementos têm grande importância para o desenvolvimento de um cultivo de microalgas, devendo ser acrescentados em menores ou maiores quantidades nos meios de cultura para obter um melhor desenvolvimento das espécies ou biomoléculas de interesse. Os nutrientes essenciais para garantir um mínimo de condições para crescimento das microalgas são carbono, nitrogênio, fósforo e micronutrientes (12,23,24), além da temperatura, luz, agitação/aeração, disponibilidade de nutrientes entre outros (15,25,26).

O carbono é o nutriente essencial para o cultivo, sendo sua concentração preponderante, pois é constituinte básico para a formação de todas as substâncias orgânicas sintetizadas pela célula, *e.g.*: proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, vitaminas e lipídios (24).

O nitrogênio assume um papel de destaque, pois é fundamental no metabolismo das microalgas, principalmente devido a sua participação na formação de proteínas. Quando há disponibilidade de nitrogênio no cultivo há o aumento das concentrações de proteínas, carotenóides e clorofila. Se este elemento estiver em limitações e estresse, ocasiona o aumento do conteúdo lipídico da microalga (4,12,20,23,27–29).

A temperatura afeta a taxa metabólica das microalgas, sendo específica para cada espécie. Temperaturas constantes proporcionam maior estabilidade nos experimentos e nas operações de rotinas, permitindo reprodutibilidade. No entanto, em sistemas abertos ou fotobiorreatores expostos ao ambiente natural, a temperatura apresenta valores distintos entre o dia e a noite (24,25). A resposta à temperatura de crescimento varia de espécie para espécie, sem nenhuma relação generalizada (25,26). O aumento da temperatura de cultivo microalgal pode causar um aumento no teor proteico e uma diminuição nos teores de carboidratos e lipídios; os percentuais de ácidos graxos insaturados da fração lipídica tendem a diminuir e os dos saturados a aumentar (30,31).

A condição para o crescimento das microalgas depende também da intensidade da luz, do comprimento de onda e duração da iluminação aos quais as células estão expostas.

O fotoperíodo geralmente é de 10/14 ou 12/12 h de claro e escuro. Em escala laboratorial utilizam-se sistemas de iluminação artificial com lâmpadas fluorescentes para simular as condições naturais. A atividade fotossintética se eleva com o aumento da irradiação até determinados valores e então começa a inibição do crescimento celular (24,32). A formação de lipídios polares pode ser induzida pela baixa intensidade luminosa. A intensidade da luz afeta a saturação e insaturação dos ácidos graxos: com alta intensidade luminosa há uma tendência para a formação de ácidos graxos mais saturados e monoinsaturados (31,33).

A aeração e a agitação dispersam a fonte de carbono no cultivo, promovendo a homogeneização e evitando autofloculação. No crescimento da microalga há o consumo do CO₂ dissolvido no meio, ocasionando a elevação do pH. No entanto, a disponibilidade de CO₂ pode reduzir o pH e inibir o crescimento de algumas espécies de microalgas (15,24,32,34).

Algumas condições de cultivo atuam diretamente no perfil lipídico e composição de ácidos graxos das microalgas, principalmente com relação a sua fonte de nutrientes em termos de nitrogênio, temperatura, incidência luminosa (35–37). Essas condições de estresse são estrategicamente utilizadas em cultivos que tenham a finalidade de produzir lipídios ou outras moléculas de interesse comercial (27,38), sendo variável para cada espécie de microalga.

A deficiência de nutrientes pode causar um decréscimo nas taxas de crescimento e sob estas circunstâncias algumas espécies de microalgas continuam sintetizando ácidos graxos ativamente (36) e a sua não utilização na formação de lipídios de membrana acarretaria no acúmulo de triglicerídeos (39). O conteúdo dos ácidos graxos das microalgas e a transformação destes em triglicerídeos dependem não somente das espécies, mas também das condições de cultivo, incluindo composição do meio, aeração, intensidade luminosa, temperatura e idade da cultura (39,40).

Em estudo com diferentes cepas de *Chlorella sorokiniana* cultivadas em 10% de efluente bovino e meio *Bold Basal*, estas apresentaram teor de proteína de até 24% e teor de ácidos graxos de 12% em biomassa, tornando este sistema de cultivo para produção de biomassa apto para uso como alimentação animal (41). Em outro estudo a biomassa de *Chlorella* sp. obtida a partir de cultivos com 150 ppm de MgSO₄, 12,5% de salinidade e baixa intensidade luminosa apresentou um alto teor lipídico (32,5%). Quando cultivada em concentração menor de MgSO₄ e maiores salinidade e intensidade luminosa, produziu teor lipídico menor (12,5%) (42). Para o cultivo de microalgas, existem diferentes

combinações de meios que podem ser utilizados, combinando meios padrão, como *Bold Basal*, TAP, Gilliard F/2 entre outros, e meios alternativos como efluentes, assim como os demais parâmetros como temperatura, pH e fotoperíodo.

2.4 Separação da biomassa de microalgas

Para aproveitar o potencial das microalgas, são necessários que ocorram diversos processos após o seu cultivo, um desses é a recuperação ou colheita da biomassa na qual as microalgas são separadas do seu meio de cultivo (43,44). A dificuldade de separação da biomassa é agravada pela baixa concentração de celular, entre 0,1 e 3,0 g L⁻¹; o tamanho microscópico, entre 3 e 30 µm (45,46); baixa carga superficial, que tende a ser negativa, o que previne ou inibe a agregação das células; densidade semelhante à da água, (47); fase de crescimento (48); baixa força iônica (49), que podem dificultar a sua sedimentação. O processo de recuperação de culturas de microalgas é um fator importante que tem influência direta no custo e na qualidade dos produtos finais (50).

Para aumentar a concentração da biomassa de microalgas e reduzir o volume a ser processado, aplica-se métodos de espessamento como coagulação/floculação, sedimentação gravimétrica, flotação ou eletro flotação (27,51,52) e para deságue da biomassa, os métodos de filtração e centrifugação. Para obter uma biomassa seca, aplicam-se métodos de secagem tais como secagem solar, secagem em estufa, liofilização ou *spray drying*.

Diversos autores (44,50,53,54) comentam que não há nenhum método comum, simples e de baixo custo para ser utilizado em larga escala, e o desenvolvimento dos processos de separação da biomassa de microalgas e o aumento da eficiência são fundamentais para que seja alcançada a viabilidade econômica da produção de bioprodutos.

2.4.1 Métodos de espessamento da biomassa

Os métodos de espessamento de um cultivo de microalgas, acarreta no aumentam da concentração da biomassa e reduzem o volume a ser processado, contribuindo para economia de processo (21). Dentre os métodos de desague compreendem a sedimentação gravimétrica, flotação, floculação. Após a aplicação de algum método de espessamento, há ainda uma quantidade de água que pode ser drenada através de métodos de deságue.

2.4.1.1 Sedimentação gravimétrica e auto floculação

A sedimentação é um processo lento, comum e rudimentar, no entanto, com alta eficiência energética (55). A sedimentação de sólidos é determinada pela densidade e tamanho das células de microalgas aliada a velocidade de sedimentação. Este método é a técnica de recuperação mais comum para a biomassa de microalgas devido aos grandes volumes tratados e ao baixo valor da biomassa gerada. Sua aplicabilidade é adequada para microalgas grandes, com tamanho superior a 70 μm (56,57). A densidade de partículas de microalgas tem um papel fundamental na remoção de sólidos por sedimentação por gravidade, sendo que as partículas de microalgas com baixa densidade não assentam bem, são mal removidas por sedimentação e podem redispersar (58–60).

A recuperação de microalgas por sedimentação pode ser melhorada com a utilização de separadores de lamelas e tanques de sedimentação (21). Os separadores em lamelas oferecem uma área de sedimentação maior comparada aos convencionais, devido à orientação das placas e o baixo consumo energético. O bombeamento da cultura de microalgas para entrada no sistema é de forma contínua e há remoção da biomassa úmida. Os tanques de sedimentação não são muito utilizados nas indústrias. A sedimentação é um método confiável, barato, porém lento para concentrar biomassa (21,52).

A autofloculação é a agregação espontânea de partículas, resultando em sedimentação das microalgas (61,62). A limitação do carbono ou certos fatores abióticos como deficiência ou eliminação da aeração podem induzir a autofloculação (55,63). A autofloculação não ocorre para todas as espécies de microalgas. Caracteriza-se por um processo lento em que pode ocorrer redispersão dos flocos (59,60,62). O aumento do pH utilizando NaOH ou outro agente alcalino pode induzir a sedimentação. Essa mudança de pH tem a vantagem de interferir menos no meio de cultura comparado aos agentes floculantes, permitindo que o meio seja reutilizado (27,58). Este processo também é considerado autofloculação.

Diferentes espécies de microalgas apresentam recuperação distintas entre si. No entanto, mesmo a partir dos métodos de sedimentação e autofloculação, nota-se a maior recuperação de microalgas com a ação de um agente incrementador de pH e o tempo de sedimentação (Tabela 2.1), tornando a escolha deste método altamente dependente da especificidade da microalga, sua interação entre as partículas e com o limiar de ajuste de pH. Em estudos com autofloculação por NaOH percebeu-se a influência do agente químico no teor lipídico e na composição de ácidos graxos, com redução lipídica e perda de ácidos graxos poli-insaturados (64).

Tabela 2.1 Recuperação de biomassa por sedimentação e auto flocculação.

Espécie	Método	Condições	Recuperação (%)	Ref.
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	Autoflocculação com ajuste de pH para 10,2	NaOH: 5M, TS:4 h	98	(65)
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	Sedimentação	27°C no claro, TS:8 dias	91	(65)
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	Sedimentação	4°C no escuro, TS:8 dias	70	(65)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Autoflocculação com ajuste de pH para 10,8	NaOH: 9 mg g ⁻¹ TS:0,5 h	98	(66)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Autoflocculação com ajuste de pH para 10,8	KOH:12 mg g ⁻¹ TS:0,5 h	98	(66)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Sedimentação	TS: 3 h	25	(67)
<i>Neochloris oleoabundans</i>	Sedimentação	TS: 3 h	40	(67)

TS: Tempo de sedimentação

Os métodos de sedimentação e auto flocculação podem não ser aplicados a todas as espécies de microalgas. Espécies de microalgas que formam colônias grandes (50-200 mm), como *Spirulina*, *Actinastrum*, *Micractinium*, *Scenedesmus*, *Coelastrum*, *Pediastrum* e *Dictyosphaerium*, apresentam alta possibilidade de sedimentação (55,56). A autoflocculação tem maior influência na recuperação de microalgas marinhas do que nas de água doce (21,62,67), no entanto, são necessários estudos para determinar o limite de pH a ser utilizado para que as microalgas sedimentem. Apesar de suas vantagens, esses métodos não são preferidos em escala industrial para pré-concentração de microalgas, pela possibilidade de redispersão dos flocos formados (21,58,60).

2.4.1.2 Flotação

Flotação é um processo de separação por gravidade em que as bolhas de ar ou de gás se ligam à partículas sólidas e, em seguida, levam-nas para a superfície líquida, ou seja, a inserção de ar na cultura, sob a forma de microbolhas, englobam as células microalgais e as levam para superfície (56). A flotação é muitas vezes definida como sedimentação invertida ou flocculação ao contrário. É comumente aplicada em processos de tratamento de águas residuais por tratar grandes volumes e requerer pouco espaço, tempo e equipamento operacional (21,55). Algumas espécies de microalgas têm a capacidade de flotar naturalmente conforme aumento do conteúdo lipídico (68). Este método é promissor para microalgas de água doce. No entanto, para microalgas marinhas a flotação pode ser comprometida devido a salinidade ser um fator-chave para a adesão das células à bolha (21,57,69).

A flotação pode ser classificada de acordo com a tecnologia de produção de bolha como flotação de ar dissolvido, flotação dispersa ou flotação eletrolítica. A flotação de ar dissolvido é um processo onde são geradas pequenas bolhas em alta pressão, com um tamanho médio de 40 µm, que aderem e carregam as células para cima. Este sistema remove as microalgas com mais eficácia do que por sedimentação, porém bolhas grandes de ar dissolvido podem quebrar os flocos formados (51,55,57). As bolhas da flotação por ar disperso são formadas por um sistema de injeção de ar e um agitador de alta velocidade ou por passagem do ar continuamente através de um material poroso, formam as bolhas que interagem com as superfícies negativamente carregadas de células de microalgas e as ascendem (21,55,70,71). Na flotação eletrolítica, as bolhas de gás são pequenas e formadas por eletrólise. Este método é eficaz em escala de bancada, porém com intenso uso energético (57) e não é a melhor escolha para a recuperação de microalgas (21,58).

Nos processos de flotação pode-se utilizar a coagulação química através de surfactantes seguida pela flotação de ar para incrementar os rendimentos do processo (21,56,58). Os surfactantes mais utilizados são sulfato de alumínio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$), sulfato de ferro ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$), brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), quitosana e cloreto férrico (FeCl_3) (72–74).

A eficiência de flotação diminui com força iônica elevada. A interação eletrostática entre coletor e superfície celular desempenha um papel crítico nos processos de separação e com base em métodos de geração de bolhas e razões de processo, várias unidades foram desenvolvidas para induzir a flotação (75,76). As vantagens da flotação incluem eficiência de recuperação substancial ($\geq 75\%$) de microalgas (Tabela 2.2) utilizando diversas condições/agentes químicos aliadas à fluxo de ar para garantir eficiência de recuperação. A facilidade de operação e a capacidade de processar grande quantidade de culturas de microalgas a um custo mínimo tornam a flotação uma tecnologia promissora para a colheita de microalgas (57,74–76).

Tabela 2.2 Recuperação de biomassa por flotação.

Espécie	Método	Condições	Recuperação (%)	Ref.
<i>Chlorella</i> sp.	Flotação	Fluxo de ar: 0,114 L min ⁻¹ Quitosana: 10 mg L ⁻¹ e SDS: 20 mg L ⁻¹	90	(75)
<i>Dunaliella salina</i>	Coagulação seguida de micro flotação	FeCl ₃ : 0,15 g L ⁻¹ ; pH 5; Fluxo de ar: 85 L min ⁻¹	99	(74)
<i>Dunaliella salina</i>	Coagulação seguida de micro flotação	Al ₂ (SO ₄) ₃ : 0,15 g L ⁻¹ ; pH 5; Fluxo de ar: 85 L min ⁻¹	95	(74)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Eletrocoagulação-flotação	Eletrodo de alumínio, pH 4-7	100	(73)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Eletrocoagulação-flotação	Eletrodo de ferro, pH 4-7;	78,9	(73)
<i>Chlorella zofingiensis</i>	Flotação por ar dissolvido	Al ₂ (SO ₄) ₃ , pH 7-8,2	91,5	(77)
<i>Chlorella</i> sp.	Flotação dispersa	CTAB - 40 mg L ⁻¹ , pH 7	92	(75)

SDS: dodecil sulfato de sódio; CTAB: brometo de cetiltrimetilamônio

A pesquisa e aplicabilidade de abordagens da flotação na recuperação de microalgas ainda está iniciando e mais pesquisas são fundamentais para otimização de parâmetros operacionais e escalonamento do processo (74–76).

2.4.1.3 Floculação

A floculação é uma tecnologia amplamente utilizada em diferentes processos industriais como cerveja, mineração e tratamento de água e efluentes (27). A floculação ocorre quando as partículas menores se agregam em partículas maiores, através da interação de agentes coagulantes ou floculantes, e ao passar do tempo decantam, por sedimentação. A floculação pode ser realizada por processos tradicionais como floculação química, biofloculação e por tecnologias emergentes como nano partículas magnéticas (53,78,79).

Os mecanismos gerais para floculação de microalgas são semelhantes aos envolvidos na floculação para o tratamento de água (47,50,56). Para a escolha do agente coagulante/floculante devem ser considerados seu grau de interferência no processamento e uso para a biomassa obtida; a eficácia em baixa concentração e o seu custo. A compreensão dos mecanismos de floculação tem a intenção de uma utilização mais eficiente dos agentes floculantes através das suas interações entre com as microalgas.

Na floculação química os principais agentes são os sais metálicos como Al₂(SO₄)₃ e FeCl₃ e polímeros orgânicos como quitosana e amido catiônico (43,59,80). Embora os sais metálicos estejam aptos a ser aplicados para a recuperação de microalgas, a sua utilização pode resultar em concentrações elevadas de metais na biomassa recolhida e

permanecem no resíduo de biomassa após a extração de lipídios ou carotenoides (81), no entanto, a contaminação do conteúdo lipídico e de ácidos graxos não é observada (44,50). Floculantes de polímeros orgânicos, quitosana e amido modificado, apresentaram uma recuperação aceitável de microalgas com uma dosagem mais baixa e impacto reduzido no ambiente e na biomassa em comparação com sais metálicos (48,82,83).

O uso de floculantes comerciais como Magnafloc® e CTBA (poliacrilamida aniônicos) ou Flocan® (poliacrilamida catiônico) podem ser alternativas à recuperação de biomassa de microalgas. Para garantir a máxima eficiência dos floculantes, muitas vezes é necessário o ajuste do pH através de agentes alcalinizantes, como NaOH, que desempenha um papel importante na recuperação por floculação semelhantes para os floculantes catiônicos e aniônicos (50,69); encarecendo o processo, e mesmo assim, ainda há a influência da espécie e dos parâmetros de cultivo no teor lipídico. A floculação realizada apenas com o ajuste do pH, ou seja, através de alcalinização para pH 10, se torna ligeiramente mais vantajosa após a coagulação se faz a neutralização do pH, retornando-o para pH 8 e aliada a uma lavagem com NH_4HCO_2 , ou seja, esta solução isotônica pode remover os sais inorgânicos sem alterar a pressão osmótica e preservar os flocos e o conteúdo lipídico (64).

A biofloculação é a assistência de algum microrganismo, como bactéria ou microalga dotada de capacidade floculante para a floculação (48) e nesse processo não se utilizam floculantes químicos ou poliméricos. A biofloculação de microalgas com bactérias exige substrato adicional para o crescimento bacteriano, no entanto, o mecanismo envolvido ainda não foi devidamente compreendido (44,67).

A recuperação da biomassa de microalgas por floculação é vista como sendo um método superior para métodos de recuperação convencionais, porque permite o tratamento de grandes volumes de cultura de microalgas e é capaz de ser aplicado a uma vasta gama de espécies (Tabela 2.3). A floculação quando combinada com sedimentação gravimétrica ou filtração aumenta a eficiência de recuperação (21,55,57,58).

Tabela 2.3 Recuperação de biomassa por floculação

Espécie	Método	Condições	Recuperação (%)	Ref.
<i>Chlorella minutissima</i>	Floculação seguida por sedimentação	Al ₂ (SO ₄) ₃ : 1g L ⁻¹ , e tempos de 1,5 h	60	(59)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Floculação seguida por sedimentação	NaOH pH entre 11 e 12	95	(84)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Floculação seguida por sedimentação	Quitosana, 30 mg L ⁻¹ , TS: 10 min.	92	(85)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Floculação seguida por sedimentação	Quitosana, 10mg g ⁻¹ biomassa seca	99	(86)
<i>Neochloris oleoabundans</i>	Biofloculação com <i>Tetraselmis suecica</i>	Tempo:3h, Razão microalga/microalga: 0,74	72	(67)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Biofloculação com <i>Ankistrodesmus falcatus</i>	Tempo:3h, Razão microalga/microalga: 1	50	(67)
<i>Nannochloropsis oceanica</i>	Biofloculação com <i>Solibacillus silvestris</i>	Tempo:10 min, Razão microalga/bactéria 3:1	88	(87)
<i>Conticribra weissflogi</i>	Floculação seguida por sedimentação	FO 4990 SH: 0,001 g L ⁻¹ , Tempo: 15 min	75	(88)
<i>Conticribra weissflogi</i>	Floculação seguida por sedimentação	FO 4240 SH: 0,001 g L ⁻¹ , Tempo: 15 min	93	(88)
<i>Chlorella minutissima</i>	Floculação seguida por sedimentação	FeCl ₃ : 0,75 g L ⁻¹ , Tempo: 5 h	65	(59)
<i>Chlorella minutissima</i>	Floculação seguida por sedimentação	FeCl ₃ : 0,25 g L ⁻¹ , Tempo: 5 h	57	(59)
<i>Chlorella minutissima</i>	Floculação seguida por sedimentação	Al ₂ (SO ₄) ₃ : 0,75 g L ⁻¹ , Tempo: 5 h	90	(59)
<i>Chlorella minutissima</i>	Floculação seguida por sedimentação	Al ₂ (SO ₄) ₃ : 0,25 g L ⁻¹ , Tempo: 5 h	38	(59)

Para a escolha do agente floculante devem ser considerados seu grau de interferência no processamento e uso da biomassa obtida; a eficácia em baixa concentração e o seu custo. A especificidade microalga influencia diretamente no processo de recuperação da biomassa (48), tornando a busca por um sistema de recuperação com menor gasto energético e que atenda aos requisitos para o uso da biomassa com qualidade aceitável.

2.4.2 Métodos de deságue da biomassa

O desague da biomassa espessada de microalgas pode ser realizado por processos mecânicos, como centrifugação e filtração. Após o desague, a biomassa recuperada é normalmente seca, por processos de secagem para melhorar a eficiência dos processos a jusante como extração de lipídios ou carboidratos (21,57). Estes processos podem ser realizados para espessamento, no entanto, a eficiência é reduzida.

2.4.2.1 Centrifugação

Neste método de recuperação da biomassa, a aceleração centrífuga faz com que as células se movam através do líquido e se depositem no fundo ou nas paredes do recipiente. A centrifugação é considerada uma extensão da sedimentação por gravidade onde a aceleração gravitacional (g) é substituída pela aceleração centrífuga (55,57,89). Apesar de sua capacidade de recuperar biomassa da maioria dos tipos de microalgas de forma eficiente, este processo requer alto consumo energético e alto custo operacional e de capital (55,57,89–91), podendo limitar seu uso a produtos de alto valor, como ácidos graxos insaturados, produtos farmacêuticos e outras *commodities* (21). As centrifugas são aplicadas como método de deságue para a biomassa espessada de microalgas (46,52,58) e após a centrifugação, a água é separada por drenagem do meio em excesso.

A centrifugação pode ser realizada por dois tipos de equipamentos sendo os de parede fixa tais como hidrociclone ou de parede rotativa como centrífuga decantadora, centrífugas de disco e centrífugas tubulares (52,57). O hidrociclone é constituído de um cilindro, onde a alimentação com o cultivo de microalgas é tangencial superior, com isso forma-se um movimento em espiral descendente, arrastando as partículas maiores e mais pesadas para saída inferior do equipamento (52,57). A centrífuga de discos consiste em um recipiente cilíndrico rasa contendo uma pilha de cones de metal (discos) estreitamente espaçados, que giram. O cultivo de microalgas é alimentado pelo centro da pilha de discos e a biomassa desloca-se para fora, na parte inferior dos discos enquanto a fase aquosa é deslocada para o centro (52,57). As centrífugas tubulares são utilizadas na recuperação de microalgas em escala de bancada para estudos laboratoriais e para as previsões de desempenho da centrífuga de disco e não possuem sistema de deságue, sendo necessário interrupção do processo para deságue do líquido (57). As centrífugas decantadora são caracterizadas por um recipiente cônico horizontal, e sua separação é por diferença de peso específico, sendo a biomassa separada para as paredes e retiradas por uma rosca helicoidal (57), o consumo de energia das centrifugas decantadora é maior do que o das centrifugas de disco (52).

A recuperação de biomassa através de centrifugação pode ser elevada dependendo da espécie de microalga, do tipo e velocidade da centrífuga utilizada (92) e com baixo tempo de processo (Tabela 2.4). No entanto, este método comumente é utilizado como segundo tratamento para recuperação de biomassa, principalmente ao gasto energético que proporciona. A recuperação por centrifugação de 12 a 25% de biomassa apresenta um gasto energético de 50-75 kW (52).

Tabela 2.4 Recuperação de biomassa por centrifugação

Espécie	Método	Condições	Recuperação (%)	Ref.
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Centrifugação	8.000 rpm, Tempo:10 min.	~100	(93)
<i>Nannochloris</i> sp.	Centrifugação	5000 g, Tempo:10 min.	94	(91)
<i>Chlorella</i> sp.	Centrifugação	4.000 rpm, Tempo:10 min.	100	(94)
<i>Pavlova lutheri</i>	Supercentrífuga industrial – alta velocidade	13.000 g	100	(92)
<i>Pavlova lutheri</i>	Centrífuga de bancada – baixa velocidade	1.300 g	66	(92)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Supercentrífuga industrial – alta velocidade	13.000 g	95	(92)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Centrífuga de bancada – baixa velocidade	1.300 g	65	(92)

A energia necessária para operação de uma centrífuga pode ser maior que a energia gerada no biodiesel de microalgas (52), por isso é considerado um método caro e para produtos de alto valor agregado.

2.4.2.2 Filtração

A filtração é um método de separação sólido-líquido que utiliza um meio permeável ou semipermeável, pelo qual uma suspensão é passada, sendo que os sólidos são retidos ao meio permeável e o líquido passe através, separando a biomassa de microalgas (21,95). A recuperação de biomassa via filtração é um dos métodos favoráveis devido à sua capacidade de recolher microalgas com baixa densidade (89). Em alguns sistemas de filtração, podem ocorrer entupimentos pelas células, aumentando os custos operacionais e tempo de processo (21,46). A filtração geralmente é realizada após a coagulação, floculação ou flotação para melhorar a eficiência de recuperação de biomassa (21).

Os métodos de filtragem podem ser divididos em dois tipos, *dead-end* e fluxo tangencial. Os sistemas *dead-end* são cartucho de filtragem, filtro prensa e filtro à vácuo. A filtração em fluxo tangencial ou filtração cruzada são os sistemas de ultrafiltração, microfiltração, nanofiltração e osmose reversa.

O sistema de cartuchos de filtragem consiste em filtros de cartucho onde a operação é contínua e a limpeza é automática (57,89). O filtro prensa é o sistema mais comum de filtragem, apresenta baixo custo de projeto e de manutenção e flexibilidade na operação. No entanto, necessita da desmontagem manual e de mão-de-obra. O sistema de filtração a vácuo ocorre pela aplicação de vácuo, fazendo com que o cultivo líquido seja

sugado e a biomassa seja retida no tecido/membrana (21,57,96). A filtração por membrana tem sido amplamente utilizada em aplicações biotecnológicas, sua elevada eficiência de separação, operação simples e contínua, e nenhuma exigência de produtos químicos no processo trazem vantagens a esse sistema de deságue da biomassa (82) e ocorre através do escoamento tangencial onde promove a separação da biomassa e do líquido. As membranas são barreiras permeáveis, seletivas e podem ser feitas de diversos materiais orgânicos e inorgânicos. A classificação dessas membranas se dá conforme a sua porosidade e diferenciam-se pelo tamanho dos compostos que são capazes de reter. As membranas não-porosas são a osmose reversa e a nanofiltração e as membranas porosas são a microfiltração e a ultrafiltração (21,57,94). A nanofiltração é capaz de reter partículas de tamanho entre 0,01 – 0,001 μm , a microfiltração é capaz de reter partículas de tamanho entre 10 – 0,1 μm e a ultrafiltração é capaz de reter partículas de tamanho entre 0,1 – 0,01 μm (51,56,57,89), no entanto, a microfiltração e a ultrafiltração tem se mostrado mais eficiente na recuperação de biomassa microalgal (94).

As diferenças entre os métodos estão no tamanho dos poros e no tamanho das partículas que serão retidas; das pressões de cada método e do tecido/membrana utilizada (21,57,96). Filtragens *dead-end* são eficazes na recuperação de células de microalgas com diâmetro acima de 70 μm e a filtração de fluxo tangencial é mais apropriada para a recuperação de algas menores devido a menores problemas de incrustação (Tabela 2.5) (21,52,57). Os maiores custos de filtração estão relacionados com a troca de membranas, bombeamento e energéticos (21,46).

Tabela 2.5 Teor de sólidos suspensos, em biomassa, por filtração

Espécie	Método	Condições	Teor de sólido suspensos (%)	Ref.
<i>Coelastrum proboscideum</i>	Filtração à vácuo	Contínuo	18, FC=180	(97)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Microfiltração	Contínuo	98	(98)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Microfiltração	Contínuo	70	(98)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Ultrafiltração	Batelada, Tempo 1 h	FC=10	(99)
<i>Chlorella sp.</i>	Filtração por membrana	Contínuo	98	(94)

FC: Fator de concentração

Para a produção de biocombustíveis à base de microalgas, a filtração por membrana pode facilitar a reciclagem do meio de cultura utilizado para o cultivo de microalgas para reter os nutrientes residuais no meio de cultura e remover os protozoários

e vírus (100). A redução do fluxo de filtração ocasionada por entupimento da membrana filtrante é uma de suas restrições ao processo.

2.4.2.3 Seleção do método de espessamento e deságue da biomassa

A especificidade microalga influencia diretamente no processo de recuperação da biomassa (48), tornando a busca por um sistema de recuperação com menor gasto energético e que atenda aos requisitos para o uso da biomassa com qualidade aceitável. A Tabela 2.6 apresenta vantagens e desvantagens dos diferentes métodos de espessamento e deságue para recuperação de biomassa. A eficiência desses métodos depende das espécies de microalgas, incluindo tamanho, morfologia e composição do meio utilizado, no entanto, há aspectos importantes para a escolha de um método de recuperação de biomassa de microalgas que são eficiência, viabilidade econômica, processo subsequente (extração de lipídios e proteínas) e sustentabilidade. É importante analisar todas as tecnologias disponíveis antes do processo de escolha do método a ser utilizado.

Tabela 2.6 Métodos de separação da biomassa

Método de separação	Vantagens	Desvantagens	Ref.
Floculação	Simples e rápido Baixa demanda energética	Alguns floculantes podem ser caros e tóxicos para biomassa Reuso do meio de cultura é limitado	(43,50,53)
Autofloculação e biofloculação	Baixo custo Permite reuso do meio de cultura Não tóxico para a biomassa microalgal	Possibilidade de contaminação microbiológica	(58,67)
Sedimentação	Método simples Baixo custo	Demorado Possibilidade de deterioração da biomassa Baixa concentração da biomassa	(57,89)
Flotação	Apto para processos em larga escala Baixo custo Rápido Pouco espaço requerido para o processo	Requere uso de floculantes químicos Ineficaz para microalgas marinhas	(69,76)
Filtração	Alta eficiência Permite a separação de espécies sensíveis ao cisalhamento	Possibilidade de entupimento dos poros elevando custos operacionais Troca de membranas com frequência	(21,24,46)
Centrifugação	Rápido Alta eficiência	Método caro Alta demanda energética Aplicável para recuperação de bioprodutos com alto valor agregado Possibilidade de cisalhamento das células	(46,91,101)

Os métodos de recuperação descritos nesta revisão constituem técnicas eficientes para recuperar biomassa de microalgas a partir do meio de cultivo. No entanto, não existe um método universal que possa ser aplicado para colher todas as estirpes de microalgas com a mesma eficiência (55–57).

Para romper o gargalo da recuperação de microalgas algumas indústrias (*Algae to Energy*, *Algaeventure Systems*, *MBDEnergy* e *Scipio Biofuels*) estão atuando em pesquisa e desenvolvimento de sistemas de recuperação através de processos mecânicos (filtração, centrifugação, sedimentação) e biológicos (biofloculação), contudo, ainda há sistemas tradicionais de recuperação com a floculação química seguida de filtração (51).

2.4.3 Efeito dos métodos de recuperação de biomassa no conteúdo lipídico e perfil de ácidos graxos

A influência dos métodos de recuperação de biomassa no conteúdo lipídico ainda não está completa e amplamente definida. A maioria dos trabalhos que apresentam o conteúdo lipídico de diversas microalgas tem como método principal de recuperação de biomassa a centrifugação, geralmente para avaliação da extração lipídica em escala de bancada e avaliar seu potencial para produção de biocombustível (102–105). No entanto, poucos estudos demonstram que há diferenças significativas quando aplicados diferentes métodos de recuperação e há outros estudos em que esta diferença não é significativa. Cabe ressaltar que o perfil de ácidos graxos sofre pequenas alterações (Tabela 2.7). Determinar os efeitos da recuperação de biomassa sobre a qualidade e a composição da biomassa é particularmente importante quando os componentes bioquímicos (biomoléculas) devem atingir padrões de qualidade para subsequente processamento da biomassa como por exemplo lipídios para produção de biodiesel (103,106).

Agentes coagulantes/floculantes populares, tais como FeCl_3 e sulfato férrico, amplamente utilizados em sistemas de tratamento de água, efluentes e indústrias, apresentam elevado potencial para a floculação e recuperação da biomassa (65,107). O conteúdo lipídico extraído a partir de biomassa recuperadas com estes sais sofreram ligeiras variações, na maioria delas insignificantes, sendo a diferença de recuperação/conteúdo lipídico altamente dependente da espécie e dos parâmetros de cultivo (53,90). Em relação aos ácidos graxos, não se encontraram estudos sobre esta influência. A recuperação por centrifugação geralmente apresenta melhores resultados lipídicos quando comparados à floculação ou à filtração, enquanto a mudança no perfil e composição de ácidos graxos é insignificante (64,69,90,94), sendo este sistema o mais

aplicado para estudos em bancada. O perfil e composição de ácidos graxos sofreram interferência quando a recuperação da biomassa foi realizada com agente alcalinizante, como o incremento de PUFA (EPA e ETA) e/ou o perda de alguns ácidos graxos (50,64).

Ainda há uma carência de estudos sobre da influência dos métodos de recuperação de biomassa de microalgas no conteúdo lipídico e perfil de ácidos graxos, mostrando seus efeitos potencializadores ou adversos.

Tabela 2.7 Efeito dos métodos de recuperação na fração lipídica

Espécie	Método	Condições	Recuperação biomassa (%)	Rendimento lipídico (%)	Influencia no perfil de FAME	Ref.
<i>Chlorella</i> sp.	Flotação espuma seguida de centrifugação	Taxa de vazão de ar 100 L h ⁻¹ , Tempo de processo: 30 min., CTAB 10 mg L ⁻¹	30,5	13,4	Incremento de MUFA	(69)
<i>Chlorella</i> sp.	Centrifugação	8.700 g, Tempo de processo:20 min.	n.e.	9,9	Incremento de PUFA	(69)
<i>Chlorella</i> sp.	Centrifugação	4000 rpm por 10 min	100	27,96	Sem alteração	(94)
<i>Chlorella</i> sp.	Filtração por membrana	Acetato de celulose com porosidade de 47 mm	90	26,43	Sem alteração	(94)
<i>Chlorella</i> sp.	Floculação	Quitosana: 10 ppm, tempo de processo:40 min.	95	15,38	Sem alteração	(94)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Centrifugação	2.276 g for 25 min.	n.e.	21,4	Incremento de PUFA de cadeia longa	(64)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Centrifugação seguida por lavagem com água	2.276 g for 25 min.	n.e.	30,8	Incremento de PUFA de cadeia longa	(64)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Centrifugação seguida por lavagem com NH ₄ HCO ₂	2.276 g for 25 min.	n.e.	45,4	Incremento de PUFA de cadeia longa	(64)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Floculação com NaOH	pH = 10, Tempo de processo:1h	n.e.	5,3	Maior proporção de SFA, não detectado EPA e ETA	(64)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Floculação com NaOH seguida de lavagem com agua	pH = 10, Tempo de processo:1h	n.e.	3,5	Não detectado EPA e ETA	(64)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Floculação com NaOH seguida de lavagem com NH ₄ HCO ₂	pH = 10, Tempo de processo:1h	n.e.	4,4	Não detectado EPA e ETA	(64)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Floculação com NaOH e neutralização com HCL	Alcalinização prévia com NaOH até pH 10 e após, neutralização a pH 8	n.e.	11,1	Incremento de PUFA de cadeia longa, maior porcentagem de EPA	(64)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Floculação com NaOH e neutralização com HCL seguida de lavagem com água	Alcalinização prévia com NaOH até pH 10 após, neutralização a pH 8	n.e.	10,9	Incremento de PUFA de cadeia longa, maior porcentagem de EPA	(64)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Floculação com NaOH e neutralização com HCL seguida de lavagem com NH ₄ HCO ₂	Alcalinização prévia com NaOH até pH 10 após, neutralização a pH 8	n.e.	21,9	Incremento de PUFA de cadeia longa, maior porcentagem de EPA	(64)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Floculação NaOH	Alcalinização previa com NaOH até pH10, Tempo de processo:1h	n.e.	4,3	Equilíbrio entre SFA, MUFA e PUFA	(50)

Tabela 2.7 Efeito dos métodos de recuperação na fração lipídica (continuação)

Espécie	Método	Condições	Recuperação biomassa (%)	Rendimento lipídico (%)	Influencia no perfil de FAME	Ref.
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Floculação com Magnafloc LT-25 seguida por filtração em papel filtro	Alcalinização prévia com NaOH até pH 10 e Concentração de 0,01 dm ³ de solução por 1 dm ³ de cultivo, Tempo de processo:1h	n.e.	~4,4	elevado C14:0 e baixo C20:5	(50)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Floculação com Flopam seguida por filtração em papel filtro	Alcalinização prévia com NaOH até pH 10 e Concentração de 0,01 dm ³ de solução por 1 dm ³ de cultivo, Tempo de processo:1h	n.e.	3,6	Equilíbrio entre SFA, MUFA e PUFA	(50)
<i>Thalassiosira weissflogi</i>	Floculação NaOH	Alcalinização prévia com NaOH até pH 10, Tempo de processo:1h	n.e.	4,12	Incremento de C16 0, C18:0 e C18:1n9c	(50)
<i>Thalassiosira weissflogi</i>	Floculação com Magnafloc LT-25 seguida por filtração em papel filtro	Alcalinização prévia com NaOH até pH 10 e Concentração de 0,01 dm ³ de solução por 1 dm ³ de cultivo, Tempo de processo:1h	n.e.	~3,1	Equilíbrio entre SFA, MUFA e PUFA	(50)
<i>Thalassiosira weissflogi</i>	Floculação com Flopam seguida por filtração em papel filtro	Alcalinização prévia com NaOH até pH 10 e Concentração de 0,01 dm ³ de solução por 1 dm ³ de cultivo, Tempo de processo:1h	n.e.	2,77	Equilíbrio entre SFA, MUFA e PUFA	(50)
<i>Choricystis minor</i>	Centrifugação seguida por lavagem com água	8.370 g a 4°C, Tempo de processo:10 min.	n.e.	30,0	n.e.	(90)
<i>Neochloris</i> sp.	Centrifugação seguida por lavagem com água	8.370 g a 4°C, Tempo de processo:10 min.	n.e.	16,7	n.e.	(90)
<i>Chlorella vulgaris (agua doce)</i>	Centrifugação seguida por lavagem com água	8.370 g a 4°C, Tempo de processo:10 min.	n.e.	35,2	n.e.	(90)
<i>Chlorella vulgaris (agua salgada)</i>	Centrifugação seguida por lavagem com NH ₄ HCO ₂	8.370 g a 4°C, Tempo de processo:10 min.	n.e.	35,7	n.e.	(90)
<i>Nannochloropsis salina</i>	Centrifugação seguida por lavagem com NH ₄ HCO ₂	8.370 g a 4°C, Tempo de processo:10 min.	n.e.	49,1	n.e.	(90)
<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	Centrifugação seguida por lavagem com NH ₄ HCO ₂	8.370 g a 4°C, Tempo de processo:10 min.	n.e.	23,6	n.e.	(90)
<i>Choricystis minor</i>	Floculação seguida de centrifugação e lavagem com água	Al ₂ (SO ₄) ₃ : 319,0 mg g ⁻¹ , Tempo de processo:1h	n.e.	28,3	n.e.	(90)
<i>Neochloris</i> sp.	Floculação seguida de centrifugação e lavagem com água	Al ₂ (SO ₄) ₃ : 11,8 mg g ⁻¹ , Tempo de processo:1h	n.e.	16,3	n.e.	(90)

Tabela 2.7 Efeito dos métodos de recuperação na fração lipídica (continuação)

Espécie	Método	Condições	Recuperação biomassa (%)	Rendimento lipídico (%)	Influencia no perfil de FAME	Ref.
<i>Chlorella vulgaris</i> (água doce)	Floculação seguida de centrifugação e lavagem com água	Al ₂ (SO ₄) ₃ : 503,2 mg g ⁻¹ , Tempo de processo:1h	n.e.	36,3	n.e.	(90)
<i>Chlorella vulgaris</i> (água salgada)	Floculação seguida de centrifugação e lavagem com NH ₄ HCO ₂	Al ₂ (SO ₄) ₃ : 62,9 mg g ⁻¹ , Tempo de processo:1h	n.e.	34,8	n.e.	(90)
<i>Nannochloropsis salina</i>	Floculação seguida de centrifugação e lavagem com NH ₄ HCO ₂	Al ₂ (SO ₄) ₃ : 229,6 mg g ⁻¹ , Tempo de processo:1h	n.e.	48,9	n.e.	(90)
<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	Floculação seguida de centrifugação e lavagem com NH ₄ HCO ₂	Al ₂ (SO ₄) ₃ : 154.6 mg g ⁻¹	n.e.	22,1	n.e.	(90)
<i>Choricystis minor</i>	Floculação seguida de centrifugação e lavagem com água	FeCl ₃ : 257,8 mg g ⁻¹ , Tempo de processo:1h	n.e.	29,5	n.e.	(90)
<i>Neochloris sp.</i>	Floculação seguida de centrifugação e lavagem com água	FeCl ₃ : 32,2 mg g ⁻¹ , Tempo de processo:1h	n.e.	15,3	n.e.	(90)
<i>Chlorella vulgaris</i> (água doce)	Floculação seguida de centrifugação e lavagem com água	FeCl ₃ : 265,3 mg g ⁻¹ , Tempo de processo:1h	n.e.	36,1	n.e.	(90)
<i>Chlorella vulgaris</i> (agua salgada)	Floculação seguida de centrifugação e lavagem com NH ₄ HCO ₂	FeCl ₃ : 67,7 mg g ⁻¹ , Tempo de processo:1h	n.e.	34,9	n.e.	(90)
<i>Nannochloropsis salina</i>	Floculação seguida de centrifugação e lavagem com NH ₄ HCO ₂	FeCl ₃ : 290,1 mg g ⁻¹ , Tempo de processo:1h	n.e.	47,2	n.e.	(90)
<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	Floculação seguida de centrifugação e lavagem com NH ₄ HCO ₂	1FeCl ₃ : 32,7 mg g ⁻¹ , Tempo de processo:1h	n.e.	21,9	n.e.	(90)

~ dados interpolados de figuras/gráficos. n.e. não especificado

2.5 Conteúdo lipídico em microalgas

O teor lipídico em microalgas pode alcançar até 75% de sua biomassa, dependendo das condições de cultivo e espécie escolhidas (Tabela 2.8). Os lipídios obtidos a partir das microalgas podem ser utilizados como matéria-prima para biocombustíveis ou biomateriais. A produção de lipídios por microalgas pode ser até 20 vezes maior se comparada a espécies vegetais oleaginosas (5,36,108). O teor de lipídios das microalgas pode ser modificado, dependendo da fisiologia das microalgas, de sua fase de crescimento e das condições do meio, como temperatura, salinidade e nutrientes (12,24,27) e o rendimento de extração dependente do método e solventes utilizados. Microalgas como *Chlorella* sp., *Nannochloropsis* sp. e *Scenedesmus* sp. são candidatas promissoras para produções de biocombustíveis dado a sua produtividade lipídica alta e crescimento rápido (104,109–111).

Tabela 2.8 Conteúdo lipídico e ácidos graxos em diferentes espécies de microalgas

Espécie	Lipídios (%)				Ref.
	Totais	Saturados	Monoinsaturados	Poli-insaturados	
<i>Achnanthes</i> sp.	44,5	40,2	45,9	14,3	(102)
<i>Amphora</i> sp. (Persian Gulf)	24	41,28	38,16	8,42	(112)
<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	16,49	41,39	28,41	30,20	(104)
<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>	20,66	37,33	22,43	40,24	(104)
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	17,5	23,43	23,27	37,16	(112)
<i>Botryococcus braunii</i>	44,97	9,85	79,61	10,54	(104)
<i>Botryococcus terribilis</i>	49,00	43,15	44,29	12,56	(104)
<i>Chlamydocapsa bacillus</i>	13,52	35,68	23,58	40,74	(104)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	18,9	28,18	22,88	32,07	(112)
<i>Chlamydomonas</i> sp.	15,07	78,61	14,63	6,76	(104)
<i>Chlorella emersonii</i>	18,6	24,55	17,01	38,3	(112)
<i>Chlorella protothecoides</i>	18	22,79	19,23	36,19	(112)
<i>Chlorella salina</i>	11	29,34	18,52	40,63	(112)
<i>Chlorella vulgaris</i>	28,07	52,15	37,51	10,33	(104)
<i>Chlorella vulgaris</i>	17,3	25,06	24,80	45,90	(112)
<i>Coelastrum microporum</i>	20,55	45,87	38,03	16,10	(104)
<i>Desmodesmus brasiliensis</i>	17,99	34,54	44,08	21,38	(104)
<i>Dunaliella salina</i> (Shariati)	18,9	13,93	29,52	42,65	(112)
<i>Dunaliella salina</i> (UTEX)	24	22,77	22,89	34,47	(112)
<i>Dunaliella</i> sp. (Persian Gulf)	22	13,47	24,74	48,1	(112)
<i>Heterosigma</i> sp.	39,9	45,4	31,0	23,7	(102)
<i>Kirchneriella lunaris</i>	17,30	32,06	23,11	44,83	(104)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	42,4	35,7	34,8	27,0	(102)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	16,73	70,83	21,71	7,46	(104)
<i>Scenedesmus</i> sp.	16	18,59	26,86	30,00	(112)

Os lipídios desempenham diferentes funções podendo ser classificados em lipídios de reserva, os neutro e apolares; e lipídios de membrana, polares (34,39,113–

115). Os lipídios polares ou complexos incluem os fosfolipídios e glicolipídios, predominante na maioria das microalgas e na composição total dos lipídios; os lipídios apolares e neutros são aqueles que não contêm grupos carregados, isto inclui triacilgliceróis (TAG), glicerídeos, carotenóides, esteróis e uma escala limitada dos hidrocarbonetos de alto peso molecular (31,116–118). Os triacilgliceróis são considerados como produto de estocagem energética, enquanto que fosfolipídios e glicolipídios são estruturas lipídicas presentes na parede celular (8,119,120).

Há dois tipos de associações que ocorrem nos lipídios: forças de van der Waals nos lipídios neutros e apolares; ligações de hidrogênio e forças eletrostáticas nos lipídios polares (116,121,122). Essas interações devem ser quebradas para sua efetiva extração. Comumente usa-se solventes orgânicos apolares, como hexano, para romper interações hidrofóbicas entre lipídios neutro e apolares, e os solventes orgânicos polares, como os álcoois (metanol ou etanol), rompem as pontes de hidrogênio entre os lipídios polares. Portanto, a escolha do solvente está diretamente ligada a espécie de microalga e nos seus arranjos lipídicos e ainda deve ser levado em conta, na escolha do solvente, seu custo, toxicidade, volatilidade, polaridade e seletividade (90,123,124).

Os lipídios de microalga são tipicamente compostos por glicerol, açúcares ou bases esterificadas à ácidos graxos, contendo entre 12 e 24 carbonos, sendo os ácidos graxos de cadeia média (C10-C14), de cadeia longa (C16-18) e de cadeia muito longa (C20) (125). Os ácidos graxos sem insaturações são chamados de saturados (SFA), aqueles com apenas uma ligação insaturada são chamados de monoinsaturados (MUFA), aqueles com mais de duas são os poli-insaturados (PUFA) (113). Os ácidos graxos saturados correspondem à maior fração dos lipídios e, em algumas espécies, os ácidos graxos insaturados podem representar entre 20 e 60% dos lipídios totais (117,120,122) (Tabela 2.8).

Os triacilgliceróis são preferidos para a produção de biodiesel, devido ao seu alto teor de ácidos graxos (estrutura de glicerol com três ácidos graxos) e a ausência de outros constituintes químicos além do glicerol, como ocorre nos fosfolípidos ou glicolípidos (25,120).

2.5.1 Ácidos graxos

Os ácidos graxos são componentes de moléculas de lipídios e denominados com base em duas características importantes sendo o número total de átomos de carbono na cadeia e o número de ligações duplas na cadeia de hidrocarboneto (113,126). Quando a

extremidade carboxila da molécula de ácido graxo está ligado a um grupo glicerol, então uma molécula de lipídio neutro é formada; quando a associação de uma molécula de ácido graxo está com um grupo fosfato, forma uma molécula polar de lipídio, por exemplo fosfolipídio (11,36).

Os ácidos graxos podem estar livres ou esterificados e comumente contam com número par de carbonos dispostos em cadeia linear. Os ácidos graxos insaturados, de ocorrência natural, normalmente possuem configuração *cis*, já que a maioria dos ácidos graxos de configuração *trans* não é encontrada na natureza e sim em gorduras que passaram por processos artificiais, especialmente como produto minoritário da hidrogenação de gorduras insaturadas que consiste em reduzir as ligações duplas de ácidos *cis* a ligações simples (11,36,113).

A composição dos ácidos graxos nas microalgas varia de acordo com espécie e os parâmetros de cultivo, diferindo na composição do conteúdo de ácidos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados (127,128). A quantidade de ácidos graxos saturados nas microalgas está situada entre 13% e 58% (31,39,117). Os ácidos graxos dominantes em alguns filos como *Bacillariophyta* são C16:0, C16:1, C20:5 ω 3 e C22:6 ω 3; em *Eustigmatophyta* C16:0, C18:1, C20:3 e C20:4 ω 3; em *Clorofitina* C16:0, C18:1, C18:2 e C18:3 ω 3; em *Criptofita* C16:0, C20:1, C18:3 ω 3, C18:4 e C20:5; em *Dinofita* C16:0, C18:5 ω 3 e C22:6 ω 3; em *Cianofita* C16:0, C16:1, C18:1 C18:2 e C18:3 ω 3 (104,117,128,129). Contrapondo com as plantas superiores, há maior variação na composição de ácidos graxos e algumas microalgas tem a capacidade de sintetizar ácidos graxos de cadeia média, enquanto outras produzem ácidos graxos de cadeia muito longa (125,128).

A composição de ácidos graxos é fundamental para a produção de biodiesel, pois influencia diretamente a qualidade do biodiesel; grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados podem afetar positivamente viscosidade, ponto de nevoa, ponto de entupimento a frio, mas podem afetar negativamente a estabilidade oxidativa; grandes quantidades de ácidos graxos saturados têm excelentes propriedades de combustão (106,130,131)

O metabolismo lipídico e de ácidos graxos tem sido pouco estudado em microalgas em comparação com plantas superiores. Com base na homologia de sequências de genes e em algumas características bioquímicas compartilhadas, microalgas e plantas superiores estão envolvidas no mesmo metabolismo lipídico (128,132,133).

2.6 Processos para extração de lipídios em microalgas

A extração e análise de lipídios e ácidos graxos para as microalgas se diferencia de outras bases como óleos vegetais e alimentos, devido à presença de parede celular rígida, diversidade de classes lipídicas e ácidos graxos (120,134). Para romper a parede celular devem ser utilizados métodos específicos que consigam quebrar a parede e então liberar os lipídios. Os convencionais métodos de extração de lipídios estabelecidos por Bligh & Dyer (135) e Folch (136) utilizam mistura de clorofórmio e metanol para liberar todas as classes de lipídios, no entanto, estes métodos são quantificáveis e podem não ser escalonáveis. A Tabela 2.8 apresenta os lipídios extraídos por estes métodos convencionais.

Quando utilizado diferentes métodos de rompimento celular, aliados a solventes, o conteúdo lipídico tende a ser diferente (120,124,127,134,137). No caso de uma extração incompleta ou seletiva de lipídios, a eficiência de extração das diferentes classes lipídicas pode variar e conseqüentemente ter efeito na composição de ácidos graxos.

O método para extração de lipídios deve ser rápido, eficiente e delicado, a fim de reduzir a degradação dos lipídios e economicamente viável (5,46,138). A extração se inicia através do rompimento da parede celular da microalga e então os lipídios podem ser extraídos de diferentes formas. O processo de rompimento celular é um pré-requisito para uma eficiente extração de lipídios (124). Há diversos estudos sendo realizados para aperfeiçoar o processo e maximizar a extração com um custo cada vez menor. (82,108,137). Os métodos mais utilizados para extração de lipídios de microalgas estão estabelecidos na Tabela 2.9, separados por processos sequenciados (8,56,124,139,140), até a remoção do solvente residual.

Tabela 2. 9 Processos para extração de lipídios

Processos	Métodos
Métodos de rompimento celular (MRC)	Ultrassom Homogeneização à alta pressão Prensagem Moinho de bolas Micro-ondas Choque osmótico Quebra química (ácidos e enzimas)
Secagem da biomassa úmida	Secagem em estufa <i>Spray drying</i> <i>Freeze drying</i>
Redução do tamanho das partículas	Moagem em peneira específica Esmagamento
Métodos de extração de lipídios (MEL)	Solventes orgânicos Extração fluido supercrítico Equipamento Soxhlet MRC aliado a solventes
Remoção de detritos celulares do solvente de extração - mistura de lipídios e água residual	Filtração Centrifugação
Remoção de solvente residual	Destilação Evaporação à vácuo Adsorção fase sólida

2.6.1 Métodos de rompimento celular

A eficiência dos métodos de rompimento celular depende das espécies de microalga e da composição e da morfologia da membrana celular. Os custos de rompimento e extração podem ser significativamente reduzidos utilizando o método adequado (82,141). Esses métodos podem utilizar biomassa úmida ou biomassa seca, e neste caso, deve-se utilizar algo líquido para promover uma melhor dispersão (108,127,142,143).

Existem dois métodos para quebrar a membrana celular: os mecânicos e os não mecânicos. Os métodos mecânicos são: ultrassom, homogeneização alta pressão, prensagem, moinho de bolas, micro-ondas e os não mecânicos são: choque osmótico, quebra química e enzimas. Para um escalonamento industrial, os métodos mecânicos apresentam a vantagem de serem rápidos e monitorados, no entanto, seu consumo energético é elevado (82,140,141). Convencionalmente a ruptura celular é quantificada pela liberação dos metabolitos (*e.g.* lipídios ou proteínas), absorvância na região ultravioleta (UV), turbidez, dimensionamento de partículas ou contagem de células (142).

2.6.1.1 Ultrassom

A utilização do ultrassom para rompimento celular e extração de lipídios de microalgas vem sendo aplicada nos últimos anos (108,144–148). A ação das ondas

ultrassônicas se propagam em meio líquido e em ciclos alternados de alta e baixa pressão, onde microbolhas de vácuo são produzidas nos ciclos de baixa pressão e durante o ciclo de alta pressão entram em colapso, resultando na cavitação, que quebra a estrutura celular mecanicamente, possibilitando a liberação dos lipídios (140,149).

A cavitação ultrassônica é significativamente mais intensa na frequência baixa (18-40 kHz) do que na frequência alta (400-800 kHz) e é afetada pelo tipo de parede celular, viscosidade, tempo de reação e temperatura do meio. Uma baixa temperatura é favorável para a sonólise efetiva, para refrigerar continuamente o meio e evitar que a temperatura aumente devido a dissipação do calor (82,150). Em contrapartida, o consumo de energia é elevado devido à alta potência dos ultrassons e ao arrefecimento, sendo difícil escalonar este processo porque a cavitação ocorre em regiões perto das sondas ultrassônicas (8,142).

O desempenho do ultrassom como método de pré-tratamento na extração de lipídios se apresenta satisfatório para algumas espécies de microalgas. Em estudo utilizando *Chlorella* sp., *Nostoc* sp. e *Tolypothrix* sp. foram testados diferentes métodos de rompimento celular para extração de lipídios, o ultrassom se apresentou como melhor sistema para rompimento celular e liberação dos lipídios (150). Para *Chlorella pyrenoidosa* não houve diferença significativa quando utilizado agitação e ultrassom assistido pela mistura clorofórmio:metanol 2:1 (127). No entanto, em outros estudos com *Botryococcus* sp., *Chlorella vulgaris* (108) e *Schizochytrium* sp. S34 o ultrassom se mostrou menos eficiente em romper a parede celular e permitir que o solvente liberasse a fração lipídica (143).

2.6.1.2 Homogeneização à alta pressão

Homogeneização à alta pressão (HPH) é conhecida como prensa francesa. O processo de ruptura de células utiliza a força de cisalhamento hidráulica gerada quando a biomassa, à alta pressão é pulverizada através de um tubo estreito (82,142). Neste processo há pouca transmissão de calor e risco de degradação térmica, baixo custo operacional, médio consumo energético quando comparado a ultrassom e possibilidade de escalonamento (108). A eficiência do HPH nas células microalgais varia entre as espécies e pode diminuir dependendo da rigidez das paredes celulares (151,152). Apesar de promissora, é necessária uma avaliação mais aprofundada do HPH em um processo de produção de biocombustíveis em escala industrial.

Comparou-se a eficiência rompimento celular de biomassa de *Chlorococcum* sp. com os métodos HPH, ultrassom, moinho de bolas e tratamento com ácido sulfúrico, e através da contagem de células e medição dos diâmetros das colônias, mostrou-se que o HPH pôde destruir 73,8% das células totais (153). Em estudo com *Scenedesmus acutus* a recuperação não alcançou 80% em ácidos graxos, mesmo as células terem sido rompidas em quase na sua totalidade (142). Para extração de componentes intracelulares de *Nannochloropsis* sp., o HPH teve a maior eficiência, no entanto com elevado consumo energético (154).

2.6.1.3 Prensagem

O rompimento celular da parede da microalga pode ser realizado por prensagem, através da utilização de força mecânica para romper as células e liberar o conteúdo lipídico (140). A extração mecânica minimiza a contaminação da biomassa de microalgas a partir de fontes externas e mantém a integridade química da substância originalmente contida (8). A prensagem mecânica é amplamente utilizada para a extração industrial de óleo de sementes como a soja e girassol. Este método é considerado simples a ser aplicado à extração de óleo de microalgas. As tecnologias mecânicas para a extração de óleo de microalgas incluem a prensa parafuso ou pistão, extrusora e pulverização de biomassa (29).

A extração de óleo a partir de biomassa de microalgas utilizando prensagem não é facilmente alcançada porque parte da biomassa pode fluir na umidade, ocasionando a perda de biomassa, sendo necessário melhorar a eficácia do processo. A prensagem para o processo de microalgas pode ser aplicada tanto em pequena escala quanto em grande escala para a produção de biodiesel (29).

A eficiência deste método de extração pode chegar a 75%, entretanto é lento e requer grande quantidade de biomassa em estudo com microalga filamentosa (139,140). Apesar da aplicação deste método não ser exaustivamente tratado na literatura para extração de lipídios de microalgas, deve ser considerado como uma opção viável para a extração em escala industrial de lipídios haja vista algumas indústrias que já atuam neste segmento como *Algaeoil*, *Origin oil*.

2.6.1.4 Moinho de bolas

O moinho de bolas é constituído de cilindro rotativo com esferas metálicas ou de quartzo, que atuam como meios de moagem. Este sistema causa um dano direto a parede

celular, por colisão ou fricção, através da velocidade de giro das esferas. Este método é comumente utilizado para extrair DNA de amostras biológicas (82,140). O dano à esfera pode romper uma célula dentro poucos minutos, e pode ser aplicada à biomassa sem qualquer preparação (úmida ou seca). O sistema de moinho de bolas tem sido utilizado concomitantemente a solvente em escala laboratorial como industrial (108).

Existem diversos fatores que afetam a eficiência de ruptura e o consumo energético do método sendo a forma do recipiente; a velocidade de agitação; o tamanho, tipo e quantidade de esferas. A simplicidade do equipamento e a rapidez do processo trazem vantagens a este método, no entanto, seu escalonamento requer um sistema de arrefecimento intensivo para evitar a degradação térmica dos lipídios (82,140,150,153).

O desempenho do moinho de bolas como método de pré-tratamento na extração de lipídios é vantajoso para algumas espécies de microalgas. Obteve-se uma extração de 28% de lipídios de *Botryococcus* sp. utilizando-se o sistema de moinho de bolas, *i.e.*, 20% a mais do que quando utilizado ultrassom, seguido por extração com solvente. Porém, quando utilizado para *Scenedesmus* sp., este método se mostrou menos eficiente do que extração por micro-ondas (108). No entanto, para *Tolypothrix* sp. e *Chlorella* sp. não houve diferença na extração de lipídios quando comparado ao ultrassom (150). Em outros estudos que compararam o moinho de bolas e outros métodos de rompimento celular, este método não foi tão eficiente como os outros processos (155).

2.6.1.5 Micro-ondas

As micro-ondas são radiações eletromagnéticas de frequência de 0,3 para 300 GHz, que é inferior à do infravermelho e superior à das ondas de rádio (82,140,142), no entanto, apenas micro-ondas de pequena escala de aproximadamente 2450 MHz são usadas em fornos de micro-ondas para o rompimento de células (82,147).

A utilização de micro-ondas para extração de lipídios é realizada através das ondas que quebram a parede celular por indução de calor e interação com moléculas liberando assim os lipídios (55,140). O aquecimento assistido por micro-ondas é mais rápido do que o aquecimento convencional à medida que o calor é transmitido via radiação ao invés de convecção ou condução. Este método é muito seletivo para solventes polares, tais como a água, que gera vapor, e rompe a parede celular, liberando conteúdo intercelular (142) e leva a um procedimento de extração de lipídios eficaz (29). Devido à alta temperatura, alguns produtos, como lipídios e ácidos graxos podem ser degradados durante o processo. Este processo requer um sistema de resfriamento ou tempo reduzido de processo para

evitar que alguns bioprodutos sejam degradados durante o processo. A utilização de micro-ondas pode ser um método com redução do tempo de extração e menor uso de solventes, no entanto, tem elevado custo energético para seu escalonamento (8,156).

Em estudo utilizando micro-ondas assistido por hexano, foi identificado uma maior recuperação de lipídios e maior proporção de ácidos graxos comparadas a extração somente por solvente (147). Outro estudo utilizando *pool* de microalgas foram testados diferentes métodos para extração de lipídios. O uso de micro-ondas se apresentou como o mais rápido e eficiente (33,7%) seguido por eletroflotação e autoclave (137). Em experimentos realizados com diferentes métodos de rompimento celular assistidos por solvente em três espécies de microalgas *Botryococcus* sp., *Scenedesmus* sp., *Chlorella vulgaris*, os melhores resultados obtidos com todas as espécies foram com a utilização de micro-ondas (108).

2.6.1.6 Choque osmótico

O choque osmótico ocorre por meio de uma elevação ou redução brusca na concentração de sal do meio, o que perturba o equilíbrio da pressão osmótica entre o interior e o exterior das células, fazendo com que as células em solução sofram ruptura e possam liberar os lipídios (82,142). Há duas tecnologias de estresses osmóticos capazes danificar as células: estresse hiper-osmótico e estresse hipo-osmótico. Quando a concentração de sal é maior no exterior, as células sofrem de estresse hiper-osmótico e à medida que as células se contraem, os fluidos dentro das células se difundem para fora, causando danos a parede celular. O estresse hipo-osmótico ocorre quando a concentração de sal é menor no exterior, a água flui para as células para equilibrar a pressão osmótica, inchando até estourar, liberando os lipídios, no entanto, este processo requer uma grande quantidade de água para a diluição do meio líquido, o que torna o escalonamento de processo inviável (82,150).

O choque osmótico utiliza agentes químicos de baixo custo como sorbitol e NaCl através de um processo simples, porém, seu desempenho muitas vezes não é tão eficiente quanto o obtido por outras técnicas, visto que resulta em uma águas residuais com alta salinidade e é específico para espécie de microalga com parede celular permeável a esta solução (143,157,158). Para obtenção de melhores resultados na extração de lipídios, faz-se necessário incluir uma etapa posterior com uso de solvente (142,159).

Em estudo realizado com biomassa úmida de *Chlamydomonas reinhardtii* e choque osmótico com NaCl, seguido de extração por solvente, demonstrou rendimentos de

23,81 e 34,50% durante a fase estacionaria e pós-estacionaria (157). Utilizando trituração, ultrassom, micro-ondas e choque osmótico com NaCl, seguido por solvente para extrair lipídios de *Schizochytrium sp. S35* e *Thraustochytrium sp.* os resultados demonstraram que o choque osmótico teve o rendimento mais elevado comparado ao ultrassom e micro-ondas (143). No entanto, em estudo com *Scenedesmus sp.*, *Chlorella vulgaris* e *Botryococcus sp.*, a eficiência do choque osmótico foi menor comparada a micro-ondas e moinho de bolas (108). Isso significa que o uso de choque osmótico deve ser direcionado a espécies que tendem a romper sua parede celular a partir de soluções salinas.

2.6.1.7 Quebra química

As células das microalgas podem ser rompidas pelo uso de ácidos, álcalis ou surfactantes, que podem degradar as ligações químicas na parede celular, e induzir a liberação das biomoléculas intracelulares. A permeabilidade da parede celular pode ser aumentada através de produtos químicos, tais como polimixina, polímeros de lisina, protamina, peptídeos policatiônicos e detergentes catiônicos, se a permeabilidade exceder um certo limite, as células irão romper (82). O consumo de energia é menor em comparação com os métodos mecânicos, pois não requer grande quantidade de calor ou eletricidade para que ocorra a quebra, no entanto, ainda é necessário o uso de solventes para liberar os lipídios e carrear para a micela (55,56,108,160). Os agentes químicos devem ser consumidos continuamente, no entanto, ácidos e álcalis podem corroer/incrustar a superfície dos reatores. A neutralização dos ácidos e álcalis duplica o custo.

O método de quebra química pode ser uma técnica promissora para facilitar a extração lipídica de microalgas visto que rompe as paredes celulares e as ligações entre os lipídios e a matriz de biomassa tornando-os acessíveis ao solvente (142). Em uma extração utilizando ácidos e álcalis para a rompimento da biomassa úmida e mista de *Chlorella sp.* e *Scenedesmus sp.* o rompimento celular foi realizado com H₂SO₄ 1M e NaOH 5M a 90°C por 30 min., e então, a clorofila foi dissolvida e os ácidos graxos livres foram convertidos por uma solução de ácido sulfúrico 0,5M (161).

O processo de transesterificação direta de biomassa de microalgas pode reduzir o custo da produção de biodiesel de microalgas e aumentar o rendimento em ácidos graxos, pela extração e transesterificação que ocorrem simultaneamente em uma única etapa (127,162) com uma catalise ácida e de conversão dos lipídios em ácidos graxos. Este processo pode ser considerado como método de rompimento celular por quebra química.

2.6.1.8 Quebra enzimática

O rompimento da parede celular das microalgas através de enzimas é considerado um método biológico de rompimento celular. As enzimas são preferidas devido a sua disponibilidade comercial e o processo é mais facilmente controlado do que na autólise ou fagocitose, no entanto, e um método mais caro do que os métodos mecânicos ou químicos (82,163). As enzimas podem degradar seletivamente uma ligação química específica e isto não ocorre nos métodos mecânicos, onde esses destroem quase todas as partículas existentes na solução, e os químicos podem induzir reações secundárias dos bioprodutos (82,155,164). A combinação de diferentes enzimas nem sempre dá melhores resultados porque a inibição da reação pode ocorrer se estes forem de absorção competitiva em substratos (155).

As enzimas devem ser escolhidas cautelosamente, o rompimento celular enzimático é eficaz, no entanto, o alto custo das enzimas ainda é um fator limitante do escalonamento deste processo. Existem duas maneiras de reduzir o custo de um processo enzimático: a imobilização das enzimas ou a combinação deste processo com outros métodos (82).

Em estudo com *Chlorella salina*, utilizou-se *Rhodotorula mucilaginosa* MTCC8737, imobilizada em bagaço de cana de açúcar, para romper parede celular e liberar os lipídios para produção de biodiesel (165). As enzimas lisozima e celulase foram utilizadas para romper as células de biomassa úmida de *Scenedesmus* sp. para extração de lipídios utilizando solventes e alcançou rendimento de 16,6% e 16% respectivamente. Enzimas imobilizadas podem degradar eficientemente as paredes celulares de *Chlorella pyrenoidosa*, e aumentam o rendimento de extração lipídica em 75% (82).

2.6.2 Seleção de métodos de rompimento celular

A principal função do pré-tratamento de biomassa é expor lipídios para melhorar sua extração. Os métodos de pré-tratamento da biomassa para rompimento celular estão sumarizados na Tabela 2.10, para melhor comparação quanto ao escalonamento de processo, consumo de energia, efeitos na extração lipídica e vantagens x desvantagens de cada. O alto consumo de energia é devido à combinação de vários fatores, sendo as condições de temperatura e pressão do processo de extração, o custo de destilação associado à separação de lipídios de solventes orgânicos e o custo de secagem de biomassa, no entanto, estes fatores estão ligados diretamente à parede celular das microalgas, que, muitas vezes, é composta por uma camada espessa, rígida, com

resistência mecânica e química (8,82,140,141). A Tabela 2.10 identifica alguns dos requisitos, em termos de alto, médio e baixo (82,140,142,153).

Tabela 2. 10 Comparação dos métodos de rompimento celular de biomassa de microalgas para escalonamento e produção de biocombustíveis

Métodos de rompimento celular	Escalonamento	Consumo de energia	Custo operacional	Capacidade de incremento	Uso de solvente
Homogeneização	A	B-A	M-A	B	B
Alta pressão					
Moinho de bolas	A	A	B-M	B	M-A
Ultrassom	B-M	A	M-A	B	M-A
Micro-ondas	M-A	M-A	M-A	B	M-A
Quebra enzimática	A	B-M	A	M-A	B
Quebra química	A	B	M-A	M-A	M-A
Choque osmótico	B-M	B-M	A	B-M	M-A
Prensagem	A	B	B-M	B	B

A: Alto; M: Médio, B: Baixo. Capacidade de incremento refere-se a habilidade de aumentar o rendimento lipídico. Adaptado de (56,82,140)

A busca por processos menos energéticos e de eficiência elevada para romper a parede celular e liberar os lipídios deve ser específica ao propósito das biomoléculas e as especificidades da microalga, sendo necessário uma abordagem sinérgica que combina diferentes métodos. Deve-se levar em conta o consumo energético do processo; o custo, uso e impacto de solventes no bioprodutos; o tempo de processamento e o escalonamento.

Para demonstrar o impacto que os métodos de rompimento celular e extração de lipídios, a Tabela 2.11 apresenta o rendimento lipídico de diversas espécies de microalgas, que após o rompimento celular, passaram por processo de secagem e então extraídas por com solvente (método Bligh & Dyer). Esta influência demonstra sendo que não há um método único que possa igualmente ser benéfico para todas as espécies microalgas, a exceção da *Spirulina sp.* (156), no entanto, nota-se que os métodos de ultrassom, micro-ondas e choque osmótico, apresentaram as maiores eficiências de rendimento lipídico.

Tabela 2.11 Influência do método de rompimento celular no rendimento de lipídios.

Espécie	Método de rompimento celular	Secagem	Rendimento lipídico (%)	Ref.
<i>Chlorella vulgaris</i>	Autofloculação	Solar	3*	(155)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Esmagamento da biomassa úmida com sílica	Solar	4,7*	(155)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Esmagamento da biomassa seca com sílica	Solar	6*	(155)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Esmagamento com nitrogênio líquido	Solar	29*	(155)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Ultrassom 600W por 20 min.	Solar	14*	(155)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Moinho de bolas 1500 rpm por 20 min.	Solar	9,6*	(155)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Snailase a 37°C por 2 h	-	6,8*	(155)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Lysozyme a 55°C por 10 h	-	24*	(155)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Celulase a 55°C por 10 h	-	22*	(155)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Micro-ondas a 100°C, 2450 MHz por 5 min.	secagem solar	17*	(155)
<i>Spirulina</i> sp.	Autofloculação	Sim, n.e.	5,86	(156)
<i>Spirulina</i> sp.	Moinho de bolas, 2 h a 600 rpm	Sim, n.e.	5,82	(156)
<i>Spirulina</i> sp.	Micro-ondas, 120 s, frequência de 2450 MHz	Sim, n.e.	5,7	(156)
<i>Spirulina</i> sp.	Autoclave, 30 min a pressão absoluta de 0.2 MPa	Sim, n.e.	5,85	(156)
<i>Chlorella</i> sp.	Autofloculação	Sim, n.e.	15*	(150)
<i>Chlorella</i> sp.	Autoclave a 121°C com 15 lbs por 5 min.	Sim, n.e.	24*	(150)
<i>Chlorella</i> sp.	Moinho de bolas, 3.500 rpm por 5 min.	Sim, n.e.	30*	(150)
<i>Chlorella</i> sp.	Micro-ondas, 5 min a 100C, frequência de 2.450 MHz	Sim, n.e.	36*	(150)
<i>Chlorella</i> sp.	Ultrassom, 15 min com frequência 50 Hz	Sim, n.e.	38*	(150)
<i>Chlorella</i> sp.	Choque osmótico com 10% NaCl com vórtex por 1 min. e após, mantido por 48 h	Sim, n.e.	34*	(150)
<i>Nostoc</i> sp.	Autofloculação	Sim, n.e.	14,8*	(150)
<i>Nostoc</i> sp.	Autoclave a 121°C com 15 lbs por 5 min.	Sim, n.e.	20*	(150)
<i>Nostoc</i> sp.	Moinho de bolas, 3.500 rpm por 5 min.	Sim, n.e.	26*	(150)
<i>Nostoc</i> sp.	Micro-ondas, 5 min a 100C, frequência de 2450 MHz	Sim, n.e.	32*	(150)
<i>Nostoc</i> sp.	Ultrassom, 15 min com frequência 50 Hz	Sim, n.e.	35*	(150)
<i>Nostoc</i> sp.	Choque osmótico com 10% NaCl com vórtex por 1 min e após, mantido por 48 h	Sim, n.e.	24*	(150)
<i>Tolypothrix</i> sp.	Autofloculação	Sim, n.e.	6*	(150)
<i>Tolypothrix</i> sp.	Autoclave a 121°C com 15 lbs por 5 min.	Sim, n.e.	18*	(150)
<i>Tolypothrix</i> sp.	Moinho de bolas, 3.500 rpm por 5 min.	Sim, n.e.	28*	(150)
<i>Tolypothrix</i> sp.	Micro-ondas, 5 min a 100°C, frequência de 2.450 MHz	Sim, n.e.	32*	(150)
<i>Tolypothrix</i> sp.	Ultrassom, 15 min com frequência 50 Hz	Sim, n.e.	28*	(150)
<i>Tolypothrix</i> sp.	Choque osmótico com 10% NaCl com vórtex por 1 min. e após, mantido por 48 h	Sim, n.e.	26*	(150)

Tabela 2.11 Influência do método de rompimento celular no rendimento de lipídios (continuação).

Espécie	Método de rompimento celular	Secagem	Rendimento lipídico (%)	Ref.
<i>Botryococcus</i> sp.	Autofloculação	Sim, n.e.	7*	(108)
<i>Botryococcus</i> sp.	Autoclave por 5 min. 125°C com 1,5 MPa	Sim, n.e.	11*	(108)
<i>Botryococcus</i> sp.	Moinho de bolas por 5 min. a 2.800 rpm	Sim, n.e.	28*	(108)
<i>Botryococcus</i> sp.	Micro-ondas por 5 min a 100°C e frequência de 2.450 MHz	Sim, n.e.	28,5*	(108)
<i>Botryococcus</i> sp.	Ultrassom por 5 min com frequência de 10 kHz	Sim, n.e.	8*	(108)
<i>Botryococcus</i> sp.	Choque osmótico com 10% NaCl com vórtex por 1 min. e após, mantido por 48 h	Sim, n.e.	10*	(108)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Autofloculação	Sim, n.e.	5*	(108)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Autoclave por 5 min. 125°C com 1,5 MPa	Sim, n.e.	10*	(108)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Moinho de bolas por 5 min. a 2.800 rpm	Sim, n.e.	8*	(108)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Micro-ondas por 5 min. a 100°C e frequência de 2450 MHz	Sim, n.e.	10*	(108)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Ultrassom por 5 min com frequência de 10 kHz	Sim, n.e.	5,5*	(108)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Choque osmótico com 10% NaCl com vórtex por 1 min e após, mantido por 48 h	Sim, n.e.	8*	(108)
<i>Scenedesmus</i> sp.	Autofloculação	Sim, n.e.	2*	(108)
<i>Scenedesmus</i> sp.	Autoclave por 5 min. 125°C com 1.5 MPa	Sim, n.e.	5*	(108)
<i>Scenedesmus</i> sp.	Moinho de bolas por 5 min a 2.800 rpm	Sim, n.e.	9*	(108)
<i>Scenedesmus</i> sp.	Micro-ondas por 5 min. a 100°C e frequência de 2.450 MHz	Sim, n.e.	10*	(108)
<i>Scenedesmus</i> sp.	Ultrassom por 5 min. com frequência de 10 kHz	Sim, n.e.	7*	(108)
<i>Scenedesmus</i> sp.	Choque osmótico com 10% NaCl com vórtex por 1 min. e após, mantido por 48 h	Sim, n.e.	7*	(108)

n.e., não especificado. * valores obtidos por figura/gráfico

2.7 Métodos de Secagem biomassa e redução do tamanho das partículas

Após o pré-tratamento de rompimento celular, a biomassa, que muitas vezes está úmida devido ao processo de quebra da parede celular, deve estar seca e em micropartículas para os próximos processamentos, dependendo do tipo de processo que se deseja, como extração de lipídios, carboidratos, pigmentos, entre outros. Diversos trabalhos utilizam métodos de secagem da biomassa após sua recuperação (90,108,137,147). A secagem pode ser realizada por secagem em estufa; em pulverização (*spray-drying*); liofilização (*freeze-drying*); secagem solar, e como outras formas de secagem como micro-ondas e infravermelho (4,29,46).

A secagem em estufas é o método mais utilizado para remoção de água por aquecimento. É um método lento que pode levar de 3 a 24 h em temperaturas de 60°C ou 105°C dependendo do processo. É um processo barato e simples, no entanto a exatidão, para mensurar a remoção da água ou outro líquido, depende de vários fatores como a temperatura de secagem, o tamanho das partículas e a formação de crosta na superfície da amostra (4,46). A secagem solar consiste em expor a biomassa em ambiente externo e aproveitar a incidência luminosa e calor para evaporar a água. Este método é barato, no entanto dependente das condições climáticas.

A secagem por *spray drying* é um processo de secagem que consiste em pulverizar a biomassa dentro de uma câmara submetida a uma corrente controlada de ar quente, e dessa maneira se consegue uma evaporação da água, obtendo-se uma separação ultrarrápida da biomassa, com a mínima degradação do produto, resultando com a recuperação do produto em pó. Este método é bastante utilizado nas indústrias de alimentos (166).

O *freeze drying*, também conhecido por liofilização é um processo de secagem onde a água é retirada por sublimação e consiste no congelamento da biomassa, seguida de aplicação de vácuo para facilitar a sublimação e então a temperatura é gradativamente aumentada, reduzindo a pressão, permitindo que a água congelada passe do sólido ao gás, sem alterar ou degradar as propriedades da biomassa. A liofilização tende a danificar menos o tecido vegetal que está sendo desidratado que os outros métodos da desidratação, que envolvem temperaturas mais altas.

A secagem por infravermelho é um processo bastante efetivo e envolve ação do calor dentro da amostra, diminuindo o tempo de secagem em até 1/3 do total. O método consiste na desidratação utilizando uma lâmpada de radiação infravermelha com 250 a 500 W, cujo filamento desenvolve uma temperatura próxima a 700°C. A secagem por micro-ondas é um método novo e não é um método padrão, porém é rápido e simples. O calor na amostra é distribuído uniformemente tanto na superfície como internamente no alimento, facilitando a evaporação da água/líquido e evitando a formação de crosta na superfície (166).

A temperatura de secagem afeta tanto a composição lipídica quanto o rendimento lipídico de qualquer matriz (167–169). Temperaturas de secagem abaixo 60°C mantém ainda uma elevada concentração de TAG nos lipídios e apenas diminui ligeiramente o rendimento lipídico, com temperaturas mais elevadas diminui tanto a concentração de TAG como o rendimento lipídico (167). Em estudo com *Scenedesmus* sp. testou-se 3

diferentes métodos de secagem de biomassa e dois métodos de rompimento celular para a extração de lipídios (ultrassom e micro-ondas); não foram observadas diferenças significativas entre os métodos de secagem, porém diferença significativa entre os métodos de rompimento celular para a extração dos lipídios (170) no entanto, o consumo de energia e o tempo foram fatores impactantes no processo. Em estudo com *Spirulina* sp., o método de secagem aliado a diferentes métodos de rompimento celular, não tiveram diferença significativa na extração de lipídios a frio, contudo, no método a quente, os rendimentos lipídicos tiveram uma queda de 60% (156). Em estudo comparando três métodos de secagem (*freeze-drying*, estufa e solar) não houve efeito para a extração lipídica, no entanto, houve incremento de ácidos graxos livres quando realizada secagem solar (147).

Os métodos para tornar a biomassa seca em minúsculas partículas são semelhantes aos utilizados na indústria de alimentos. Quanto maior a área de contato, melhor as possibilidades do solvente em carrear os lipídios para a micela. Em escala laboratorial pode-se triturar a biomassa seca utilizando almofariz e pistilo ou através de moagem com peneiras. Os processos de *spray drying* e *freeze drying* também atuam para a promoção das micropartículas.

2.8 Métodos de extração de lipídios

Os métodos de extração de lipídios podem apresentar variações no rendimento do conteúdo lipídico dependendo do método escolhido. O teor de lipídios extraídos é influenciado pela solubilidade dos ácidos graxos, e pela capacidade do solvente de permear a membrana celular (já rompida pelos métodos de rompimento celular) em liberar o conteúdo lipídico. Esses métodos devem ser rápidos, escalonáveis e não danificar os bioprodutos (55,56,140,142). Dependendo do pré-tratamento escolhido, a biomassa pode estar úmida ou seca. Há diversos estudos abordando a extração lipídica utilizando a biomassa úmida, contudo (90,171–174), a maioria dos trabalhos ainda realiza estudos através de biomassa seca em estufa ou liofilizada (104,108,137,145).

Durante a extração, os lipídios são removidos das matrizes celulares por um solvente de extração. Os lipídios devem ser separados dos detritos celulares, isolados do solvente de extração e qualquer água residual, e finalmente convertidos em biodiesel por transesterificação ou fracionados de acordo com a classe lipídica que se deseja.

O rompimento das células gera uma distribuição de detritos celulares, de vários tamanhos de partícula, que precisam ser removidos. Essa remoção pode ser realizada

através de técnicas de separação, que comumente são a filtração e a centrifugação (8), processos semelhantes aos mencionados para recuperação da biomassa para separar biomassa do meio de cultivo. Os lipídios miscíveis no solvente devem ser separados por técnicas de destilação, evaporação a vácuo ou absorção em fase sólida e muitas vezes é possível recuperar o solvente e utilizar no processo novamente. A biomassa restante pode estar imprópria para consumo animal, nos casos de contaminação excessiva por solventes utilizados durante o processo de extração lipídica, sendo necessário processo de destilação para remover este solvente da biomassa (29).

As principais tecnologias para extração de lipídios são a partir do uso de solventes orgânicos, amplamente utilizada em escala laboratorial; e fluido supercrítico, uma tecnologia verde emergente que está ganhando considerável atenção em pesquisa, para a quantificação de lipídios de microalgas (8,123,174,175). O uso de solventes comumente é utilizado concomitantemente a outros métodos de rompimento celular. A transesterificação direta vem despontando como um método de extração e transesterificação de lipídios para produção de ácidos graxos em um único processo (176).

2.8.1 Fluido supercrítico

A extração com fluido supercrítico ganhou aceitação nos últimos anos, tendo reconhecida a sua alta seletividade e a utilização de substâncias que possuem propriedades de líquidos e gases quando expostas a elevadas temperaturas e pressões (55,123,174). Quando a temperatura e pressão de um fluido atingem seus valores críticos, o fluido entra na região supercrítica. Esta propriedade permite-lhes atuar como um solvente de extração, não deixando resíduo quando o sistema é trazido de volta à pressão atmosférica e temperatura ambiente.

A extração de lipídios utilizando dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂) tem o potencial de tomar a frente dos métodos tradicionais de extração de lipídios por solventes orgânicos (177). O processo consiste de um sistema para compressão e transporte de CO₂ líquido para o recipiente de extração, instalado dentro de um forno, e uma válvula de aquecimento para despressurizar SC-CO₂ de entrada. Uma vez aquecido o forno, o CO₂ comprimido entra num estado supercrítico e extrai o lipídio das microalgas, e então, o CO₂ evapora como gás para o ambiente, forçando o lipídio extraído a precipitar (55,140,174,178). O SC-CO₂ tem alto poder de solvatação e baixa toxicidade. As propriedades de difusão e viscosidade intermediárias do fluido conduzem a um equilíbrio de transferência de massa favorável e este processo produz lipídios isento de solvente, no

entanto, alta infraestrutura e os custos operacionais associados a este processo são suas principais desvantagens (140).

O desempenho da extração de lipídios de microalga *Chlorococcum* sp. com SC-CO₂ quando comparada à extração por Soxhlet e hexano teve rendimentos de lipídicos maiores e exibiu um perfil adequado de ácidos graxos para produção de biocombustível (152). A extração dos lipídios a partir de *Chlorella vulgaris*, utilizando SC-CO₂ teve os rendimentos de extração dos lipídios aumentados com o aumento da pressão (177). Este método pode não ser adequado a todas as espécies de microalgas.

2.8.2 Solventes

A extração por solventes de biomassa de microalgas é amplamente utilizada para extrair metabólitos como astaxantina, β -caroteno e lipídios. Os solventes orgânicos podem extrair diferentes classes lipídicas, de acordo com sua polaridade, dentro da premissa “similar dissolve similar”, os solventes apolares são hexano, benzeno, tolueno, éter dietílico, clorofórmio e solventes polares são metanol, acetona, acetato de etila e etanol. A Tabela 2.12 apresenta a polaridade dos solventes e os tipos de classes lipídicas que conseguem liberar. Com o aumento da polaridade dos solventes, aumentou-se a extração de lipídios em diversos estudos e o uso de misturas (polar e apolar) traz vantagens ao rendimento lipídico (127,137,143).

Tabela 2.12 Componentes extraídos pelos solventes

Solvente	Componente extraído
Hexano	Hidrocarbonetos, triacilgliceróis,
Clorofórmio	Hidrocarbonetos, carotenoides, clorofila, esteróis, triacilgliceróis, ceras e aldeídos
Acetona	Diacilgliceróis, cerebrosídeos e sulfolipídios
Etanol	Fosfolipídios e glicolipídios
Metanol	Fosfolipídios e glicolipídios

Baseado em Mohn (1980) (179)

No processo para extração de lipídios por solvente apolar foram identificados 6 passos detalhados (140): (a) exposição de uma microalga a um solvente; (b) penetração do solvente através da membrana celular, já rompida; (c) o solvente interage com o lipídio neutro/apolar, anulando a fraca força de Van der Waals; (d) há a formação de um complexo solvente-lipídio; (e) o complexo, por gradiente de concentração, passa pela membrana celular; e (f) forma a micela fora da célula. Os lipídios extraídos permanecem dissolvidos no solvente.

Alguns lipídios são encontrados no citoplasma através de lipídios complexos polares. Este complexo está fortemente ligado via pontes de hidrogênio e às proteínas na membrana celular. As interações de Van der Waals formadas entre o solvente apolar e os lipídios neutros no complexo são inadequadas para interromper estas associações lipídicas-proteínas das membranas e então um solvente polar é capaz de romper as associações, liberando os lipídios polares. O mecanismo de atuação é semelhante ao mencionado acima, no entanto, a utilização de misturas de solventes traria a vantagem de extrair todas as classes lipídicas. Essa prática é comumente utilizada para quantificação de lipídios totais e os métodos convencionais são Bligh & Dyer (135), utilizando mistura de clorofórmio, metanol e água; e Folch et al. (136) com mistura de clorofórmio e metanol.

A extração por solventes utilizando equipamento Soxhlet (180) é uma técnica bastante antiga (1879) e leva o nome de seu inventor. É baseada na extração sólido-líquido, onde o solvente extrai, evapora e condensa, fazendo com que sempre esteja em contato com a biomassa (8,140). Em algumas espécies de microalgas, este método tem elevada eficiência quando aliado a métodos de rompimento celular (146,181). Por se tratar de um método a quente, podem ocorrer degradação dos lipídios e ácidos graxos presentes na microalga. Seu escalonamento é difícil devido à complexidade do equipamento (82,180).

Na extração por solventes, estes devem ser baratos, voláteis (para que sejam removidos e reutilizados posteriormente), de baixa toxicidade, puros, imiscível em água e seletivos, ou seja, que não sejam extratores para compostos indesejáveis. Os solventes orgânicos são muitos utilizados na extração de lipídio, mas devido ao potencial antioxidante e a polaridade dos compostos, o rendimento depende do tipo de solventes utilizado (8,124,182). Os métodos de extração de lipídios por solventes, comumente são assistidos por ultrassom e micro-ondas, tornando o processo mais rápido e com rendimentos superiores (17,139,140,174).

Em diversos estudos com solventes polares, apolares e misturas para extração de lipídios de *Chlorella pyrenoidosa* (127), *Chlorella vulgaris* (145), *Botryococcus braunii* (108) e *Schizochytrium* sp. S31(143) observou que os maiores rendimentos de lipídios foram para os sistemas extraídos utilizando misturas de solventes polar e apolar. Para o gênero *Chlorella* e *Botryococcus braunii*, seguiu-se rendimentos com solventes polares, no entanto para *Schizochytrium* sp. os solventes apolares demonstraram melhor rendimento do que os polares. Diferentes métodos de rompimento celular assistido por

mistura de solventes para extração de lipídios impactam significativamente no rendimento (108,143,150,156). Isso significa que a busca do método mais adequado para extrair os lipídios desejados (polares, apolares ou ambos) é específica para espécie de microalgas, condições de cultivo, propósito da biomolécula, além dos fatores que influenciam para o escalonamento do processo.

2.8.3 Efeito dos métodos de rompimento celular e extração no conteúdo lipídico e perfil de ácidos graxos

A produção de biodiesel a partir de microalgas envolve quatro etapas principais que são cultivo, recuperação da biomassa, extração de lipídios e conversão dos lipídios em biodiesel. Os métodos de rompimento celular e extração lipídica adequados são pré-requisitos para a extração de lipídios de microalgas, garantindo eficiência e custo-benefício para o escalonamento do processo. À exceção do uso de fluido supercrítico para extração de lipídios, os demais métodos de rompimento celular são assistidos por solventes, isso significa que a eficiência da extração lipídica depende da polaridade do solvente e da combinação da mistura de solventes aliada a especificidade de cada microalga.

Para selecionar o método mais eficaz, eficiente e que mantenha o conteúdo lipídico e perfil de ácidos graxos adequado ao propósito, é necessário conhecer o comportamento da biomassa de microalgas frente aos métodos, através de experimentos em bancada (143) e então analisar seus efeitos para o escalonamento do processo. Alguns fatores devem ser levados em conta consumo energético, custos operacionais, produtividade na extração lipídica (entradas e saídas no processo), toxicidade de solventes, tempo de processo, entre outros.

O efeito do método de rompimento celular assistido por solventes polares, e/ou apolares, e/ou uma combinação de solventes a extração lipídica é significativa, nítida e específica (Tabela 2.13) para o rendimento do conteúdo lipídico. A utilização de misturas de solventes polares e apolares, como clorofórmio e metanol, hexano e etanol, diclorometano e metanol, comumente, traz resultados superiores quando comparados com a extração sem misturas de solventes; e mesmo com a utilização destas misturas (polar + apolar), dependendo do método de rompimento celular escolhido, ainda haverá impacto ao conteúdo lipídico. Isso significa que para conhecer o conteúdo lipídico de determinada espécie de microalgas, o ideal é utilizar diferentes métodos aliados a combinação de solventes polares e apolares, ou seja, através do método convencional

Bligh & Dyer; no entanto, se pretende um escalonamento do processo de extração lipídica, é necessário avaliar o melhor sistema de rompimento celular e solventes, e de processo tecnológico como todo.

Com relação ao perfil e composição de ácidos graxos, a variação é mínima, muitas vezes não significantes (127,143,174,182), exceto nos estudos de Soares et al. (19) quando comparou diferentes espécies de microalgas e métodos com combinações de solventes polares e apolares como os métodos de Folch, Bligh & Dyer, Rose Gootlieb, transesterificação direta, mistura de hexano/etanol, diclorometano/metanol e hexano.

Tabela 2.13 Influência do método de rompimento celular assistido por solventes no rendimento de lipídios

Espécie	Método de extração de lipídios	Solvente	Rendimento lipídico (%)	Ref.
<i>Schizochytrium</i> sp. S31	Vórtex e centrifugação 4.000 rpm assistido por solvente	Clorofórmio	9,7	(143)
<i>Schizochytrium</i> sp. S31	Vórtex e centrifugação 4.000 rpm assistido por solvente	Metanol	7,5	(143)
<i>Schizochytrium</i> sp. S31	Vórtex e centrifugação 4.000 rpm assistido por solvente	Diclorometano	9	(143)
<i>Schizochytrium</i> sp. S31	Vórtex e centrifugação 4.000 rpm assistido por solvente	Éter dietílico	7	(143)
<i>Schizochytrium</i> sp. S31	Vórtex e centrifugação 4.000 rpm assistido por solvente	Hexano	12,5	(143)
<i>Schizochytrium</i> sp. S31	Vórtex e centrifugação 4.000 rpm assistido por solvente	Tolueno	3	(143)
<i>Schizochytrium</i> sp. S31	Vórtex e centrifugação 4.000 rpm assistido por solvente	Isopropanol	3	(143)
<i>Schizochytrium</i> sp. S31	Vórtex e centrifugação 4.000 rpm assistido por solvente	Etanol	7	(143)
<i>Schizochytrium</i> sp. S31	Vórtex e centrifugação 4.000 rpm assistido por solvente	Heptano	11	(143)
<i>Schizochytrium</i> sp. S31	Vórtex e centrifugação 4.000 rpm assistido por solvente	Clorofórmio:Metanol 2:1	22	(143)
<i>Schizochytrium</i> sp. S31	Vórtex e centrifugação 4.000 rpm assistido por solvente	Clorofórmio:hexano 2:1	13,4	(143)
<i>Schizochytrium</i> sp. S31	Agitação assistida solvente	Bligh & Dyer	22,1	(143)
<i>Tetraselmis</i> sp.	Equipamento Soxhlet por 7 h	hexano	2,4	(123)
<i>Tetraselmis</i> sp.	Equipamento Soxhlet por 7 h	hexano:etanol 3:1	6,6	(123)
<i>Tetraselmis</i> sp.	CO ₂ supercrítico: 15 MPa 40°C 12 h	-	10,88	(123)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Agitação a 700 rpm assistida solvente	Clorofórmio:Metanol 2:1	20,2	(127)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Agitação a 700 rpm assistida solvente	Metanol	8,3	(127)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Agitação a 700 rpm assistida solvente	Etanol	7,2	(127)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Agitação a 700 rpm assistida solvente	Clorofórmio	9,1	(127)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Agitação a 700 rpm assistida solvente	Hexano	1,7	(127)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Ultrassom de 40 kHz assistido por solvente	Bligh & Dyer	52,5	(145)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Ultrassom de 40 kHz assistido por solvente	Metanol:Diclorometano 2:1	10,9	(145)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Ultrassom de 40 kHz assistido por solvente	Folch	16,1	(145)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Ultrassom de 40 kHz assistido por solvente	Isopropanol:Hexano2:3	2,2	(145)

Tabela 2.14 Influência do método de rompimento celular assistido por solventes no rendimento de lipídios (continuação)

Espécie	Método de extração de lipídios	Solvente	Rendimento lipídico (%)	Ref.
<i>Chlorella vulgaris</i>	Equipamento Soxhlet por 8 h	Acetona	1,8	(145)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Ultrassom de 30W e 50 Hz assistido por solvente	Clorofórmio:Metanol (2:1)	34,3	(147)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Extração rápida por solvente 100°C, pressão de 1.200 kPa	Clorofórmio:Metanol (2:1)	32,6	(147)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Homogenizador, 810W e 12000 rpm	Clorofórmio:Metanol (2:1)	37,7	(147)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Soxhlet por 6 h	Clorofórmio:Metanol (2:1)	33,4	(147)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Ultrassom de 30W e 50 Hz assistido por solvente	Hexane:Methanol (3:2)	22,3	(147)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Extração rápida por solvente 100°C, pressão 1200 kPa	Hexane:Methanol (3:2)	30	(147)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Homogenizador, 810W e 12000 rpm	Hexane:Methanol (3:2)	29,1	(147)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Soxhlet por 6 h	Hexane:Methanol (3:2)	30,8	(147)
<i>Schizochytrium</i> sp. S31	Esmagamento com nitrogênio líquido assistido por solvente	Clorofórmio:Metanol (2:1)	45,8	(143)
<i>Schizochytrium</i> sp. S31	Vórtex e perolas zircônia assistido por solvente	Clorofórmio:Metanol (2:1)	22,8	(143)
<i>Schizochytrium</i> sp. S31	Ultrassom 20 kHz assistido por solvente	Clorofórmio:Metanol (2:1)	31,4	(143)
<i>Schizochytrium</i> sp. S31	Choque osmótico 10% NaCl assistido por solvente	Clorofórmio:Metanol (2:1)	48,7	(143)
<i>Schizochytrium</i> sp. S31	Termólise 90°C assistido por solvente	Clorofórmio:Metanol (2:1)	20	(143)
<i>Schizochytrium</i> sp. S31	Agitação 1060 ciclos min ⁻¹ assistido por solvente	Clorofórmio:Metanol (2:1)	31,4	(143)
<i>Thraustochytrium</i> sp.	Solvente	Clorofórmio:Metanol (2:1)	10,7	(143)
<i>Thraustochytrium</i> sp.	Esmagamento com nitrogênio líquido assistido por solvente	Clorofórmio:Metanol (2:1)	9,3	(143)
<i>Thraustochytrium</i> sp.	Vórtex e perolas zircônia assistido por solvente	Clorofórmio:Metanol (2:1)	25,7	(143)
<i>Thraustochytrium</i> sp.	Ultrassom 20 kHz assistido por solvente	Clorofórmio:Metanol (2:1)	10	(143)
<i>Thraustochytrium</i> sp.	Choque osmótico 10% NaCl assistido por solvente	Clorofórmio:Metanol (2:1)	29,1	(143)
<i>Thraustochytrium</i> sp.	Termólise 90°C assistido por solvente	Clorofórmio:Metanol (2:1)	8,5	(143)
<i>Thraustochytrium</i> sp.	Agitação 1.060 ciclos min ⁻¹ assistido por solvente	Clorofórmio:Metanol (2:1)	10	(143)

2.9 Biodiesel

O biodiesel é uma alternativa ao diesel que pode ser obtido a partir de óleos vegetais, gorduras animais, óleo de fritura ou outros materiais contendo lipídios ou TAG, através de uma reação de transesterificação com um álcool, usualmente metanol ou etanol (5,130,183) formando ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos (FAME ou FAEE). O biodiesel foi desenvolvido para ser usado em motores a ciclo diesel com ignição por compressão, misturados ao óleo diesel em diversas proporções ou puro (1,5,183,184).

Os padrões e regulamentações para biodiesel foram estabelecidos em diversos países como a norma americana ASTM (*American Society for Testing and Materials*) D67513; a norma europeia EN 142144 e a Brasileira ANP 45/2014 servindo como diretrizes para o desenvolvimento de padrões e garantia da qualidade e características do biodiesel.

A produção de biodiesel no Brasil ainda está em dependência de uma única matéria-prima, a soja e ao óleo de fritura, contrapondo-se ao objetivo do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) de sustentar sua cadeia na diversidade de materiais graxos disponíveis nas várias regiões do País (185). Há diversas opções que podem ser utilizadas como matéria prima para biodiesel ou serem utilizadas como blends (misturas) ao biodiesel de soja, sendo a palma, sebo bovino e como fonte promissora, as microalga (1,186,187).

2.9.1 Microalgas como potencial para produção de biodiesel

O biodiesel obtido a partir de microalgas apresenta diversas potencialidades como manipulação seletiva ou genética de espécies de microalgas; facilidade de cultivo, com uso de áreas não aráveis ou fontes de nutrientes de baixo custo, até mesmo efluentes industriais; alta taxa de crescimento e produtividade lipídica (4,5,45,140).

As microalgas mais estudadas para a produção de biodiesel são as pertencentes aos grupos das cianofíceas, clorofíceas (algas verdes) e diatomáceas, a citar os gêneros com maior conteúdo lipídico: *Chlorella* sp. de 20 a 30%; *Dunaliella* sp. de 17,5 a 67% *Scenedesmus* sp. de 11 a 55% (33,104,105). Após a extração, realiza-se a transesterificação dos lipídios, e para microalgas, geralmente utiliza-se a catálise ácida (29,174). Alguns autores verificaram a produção de biodiesel de microalgas utilizando catalisadores alcalinos convencionais, e estes não foram adequados à transesterificação dos lipídios de microalgas devido a reação paralela de saponificação que ocorre em decorrência dos elevados teores de ácidos graxos livres (188,189).

Em estudo com *Botryococcus braunii* notou-se que a maior taxa de lipídios esterificáveis foi alcançada através de extração lipídica utilizando solventes polares e apolares do que quando utilizado solvente sozinho, impactando na conversão à biodiesel (182), contudo, em outro estudo com *Botryococcus sp.* esta espécie apresentou maior extração lipídica utilizando moinho de bolas e micro-ondas e exibiu porcentagem elevada de ácido oleico (108), e semelhantes resultados foram encontrado para *Nostoc sp.* e *Tolypothrix sp.* apresentando maior teor de ácido oleico, extraídos por ultrassom e micro-ondas respectivamente; tornando-as adequadas para a produção de biodiesel de boa qualidade.

Diversos estudos verificam que há uma predominância de cadeia carbônica entre C14 e C24 no perfil de ácidos graxos em microalgas, porem em composições distintas, o que determina diferentes características do biodiesel (19,102,104,105), isto sugere que cada microalga proporciona um biodiesel único, influenciado com as características de seu perfil de ácidos graxos, no entanto, algumas espécies são mais adequadas do que outras tanto para elevado teor de lipídios como pela seu perfil/composição de ácidos graxos.

2.9.2 Transesterificação direta

A transesterificação direta vem sendo estudada como uma forma de produção de biodiesel sem a etapa de extração e purificação do óleo (162,190,191). A transesterificação direta ou transesterificação *in situ* ocorre quando a biomassa de microalgas, um álcool e um catalisador, geralmente ácido, são misturados e aquecidos a alta temperatura. A extração lipídica e a transesterificação ocorrem simultaneamente e o biodiesel é produzido (140,170,192,193). Este processo pode ser realizado com biomassa úmida (162,194) ou seca, e além de reduzir os passos para produção de biodiesel e consumo energético do processo, também reduz custo do processo e custo final (127,193,194). A biomassa restante é separada do biodiesel dos detritos celulares, glicerol e excesso de álcool usando os métodos de filtração ou centrifugação (195). A transesterificação direta pode ser utilizada para conhecer o perfil e a composição dos ácidos graxos em uma pequena amostra de microalgas (162). A limitação deste método é que ao converter os lipídios para ácidos graxos, os lipídios não podem mais ser separados e avaliados em classes diferentes, como fosfolipídios, glicolipídios e triacilgliceróis. Se o estudo requer a diferenciação das classes lipídicas, a extração com solvente é necessária (191).

Os rendimentos comparativos de biodiesel a partir da transesterificação *in situ* muitas vezes são superiores à produção de biodiesel de rota convencional (176), porém, em alguns casos, alcançou-se resultados semelhantes utilizando transesterificação direta ou extração seguida de transesterificação na produção de biodiesel (127). Com relação ao perfil e composição de ácidos graxos, há uma alteração entre o método convencional, extração utilizando diversos solventes (polares e apolares) e a transesterificação direta para *Nannochlorophysis oculata*, *Chaetoceros muelleri* e *Chlorella* sp. (19), semelhante ao que ocorre quando compara a extração a diversos solventes. No entanto, a quantificação de ácidos graxos por transesterificação direta não sofreu diferença significativa quando comparada ao método convencional Folch, no entanto foi significativa para o método Bligh & Dyer e Smedes & Askland, em todas as microalgas analisadas (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp. e *Nannochloropsis* sp.) (191).

2.9.3 Propriedades do biodiesel de microalgas

Além do conteúdo lipídico, o perfil e composição de ácidos graxos deve ser levado em consideração para a produção de biodiesel. Os ácidos graxos mais comuns que contem no biodiesel são palmítico, ácido esteárico, oleico e linolênico (106). O comprimento da cadeia de carbono e o número de ligações duplas, a quantidade e a composição detalhada dos ácidos graxos são algumas das principais propriedades que influenciam a qualidade do biodiesel (5,106).

As características de qualidade do biodiesel estão relacionadas diretamente a configuração da cadeia de ácidos graxos (131,196–200). As cadeias saturadas apresentam maior estabilidade à oxidação fazendo com que parâmetros de estabilidade à oxidação, sejam atendidos mais facilmente do que no caso da presença majoritária de cadeias insaturadas. As cadeias insaturadas amenizam a possibilidade de gelificação do biodiesel, portanto, o ponto de entupimento do filtro à frio será um problema menor em climas frios (106,196,199).

Para verificar a qualidade e características do biodiesel e atender as regulamentações (ANP 45 para Brasil e EN 14-103 para União Europeia) são necessários diversas análises, muitas vezes caras, demoradas e demandam grandes quantidades de amostras, no entanto, em alguns casos, pode ser impossível obter uma grande amostra de biodiesel a partir de um óleo de matéria-prima emergente para análises detalhadas, como o de microalgas. Diversos estudos apresentam que algumas propriedades relevantes do biodiesel podem ser preditas usando informações sobre o perfil e composição de ácidos

graxos do lipídio matriz, principalmente para microalgas (33,130,196,198,201). As propriedades de combustível, mencionadas anteriormente, podem ser determinadas por equações empíricas e a precisão e a confiabilidade dessas equações já foram comprovadas (42,131,196,198).

A Tabela 2.14 apresenta as características de diversos biodieseis, microalgais e comuns como soja, palma e sebo bovino, e é nítida a influência do perfil/composição (verificado mesmo por SFA, MUFA, PUFA) nas características do biodiesel. As propriedades baseadas no perfil e composição de ácidos graxos são grau de instauração, número de cetano, índice de iodo, índice de saponificação, ponto de nuvem, ponto de entupimento de filtro a frio, poder calorífico, viscosidade cinemática, densidade e estabilidade oxidativa.

Tabela 2.15 Propriedades de diferentes biodieseis

Características	EN 14214	CV (104)	CV (112)	CP (112)	NO (201)	SD (201)	SB (196)	PB (131)	BT (196)
SFA	-	52,15	25,0	22,79	39,4	18,1	15	44,7	25,2
MUFA	-	37,51	24,80	19,23	49,6	17,4	24,7	46,4	33,4
PUFA	-	10,33	45,90	36,19	9,6	64,5	60,3	8,9	41,1
GI	-	58,17	116,59	91,60	-	-	-	64,2	-
NC	Min 51	61,83	44,0	54,57	57,9	37,1	51,7	61	49,2
IS	-	199,37	194,00	163,37	203	195,7	-	-	-
II	Max 120	52,63	135,26	111,75	80,6	183,7	-	57	-
FCLS	-	1,57	6,71	4,93	3,7	3,8	-	7,7	-
PEFF*	variável	-10,81	4,60	-0,99	-4,8	-4,6	-	10	-
PN	-	-	2,66	3,51	-	-	0	-	3
PC	-	-	-	-	39,8	40,2	39,79	-	39,77
V	3.5-5.0	-	-	-	4,2	3,6	4,10	4,5	4,29
D	0,86-0,9	-	-	-	0,9	0,9	0,881	-	0,877

CV: *Chlorella vulgaris*, CP: *Chlorella protothecoides*, NO: *Nannochloopsis oculata*, SD: *Scenedesmus dimorphos* SB: biodiesel de soja, PB: biodiesel de palma, BT: sebo bovino, SFA: ácidos graxos saturados (%), MUFA: ácidos graxos monoinsaturados (%), PUFA: ácidos graxos poli-insaturados (%), GI: grau de instauração, IS: índice de saponificação (mg g⁻¹), II: índice de iodo (g I₂/100 g), NC: número de cetano, FCLS: fator de cadeia longa saturada, PEFF: ponto de entupimento de filtro à frio (°C), PN: ponto de nuvem (°C), PC: poder calorífico, (MJ kg⁻¹), V: viscosidade cinemática (mm² s⁻¹), D: densidade (g cm⁻³). PEFF * temperatura varia de acordo com região e estação do ano.

Ésteres (m)etílicos de ácidos graxos com maior comprimento de cadeia; e menor grau de insaturação, mensurado pela porcentagens de MUFA e PUFA; nas cadeias de carbono são mais adequados para o biodiesel de qualidade (106,131). A elevada concentração de ácidos graxos saturados contribui para viscosidades incompatíveis, sendo este parâmetro intimamente relacionada ao número de insaturações; e fracas propriedades de fluxo a frio do combustível, como ponto de nuvem e ponto de

entupimento a frio, relacionadas ao comprimento de cadeia e saturações. A massa molecular e a porcentagem de cada ácido graxos, juntamente com número de bandas duplas afetam os índices de iodo e saponificação, que simultaneamente, impactam no número de cetano, ou seja, na capacidade do combustível em queimar rapidamente após ser injetado (202). Estabilidade oxidativa expressa a susceptibilidade à oxidação, relacionada ao número de insaturações e índice de iodo (131,183,196). O poder calorífico aumenta com ácidos graxos saturados de cadeia longa (201).

Em um trabalho com 12 espécies de microalgas, selecionou-se as que mais apresentavam conteúdo lipídico e perfil de ácidos graxos para biodiesel, dentre elas *Chlorella* sp., *Botryococcus braunii* e *Botryococcus terribilis* tiveram os maiores teores lipídicos, no entanto *Chlamydomonas* sp. e *Scenedesmus obliquus* indicaram-se como fonte de biodiesel com maior estabilidade à oxidação, maior número de cetano (104); e em outro estudo com três diferentes espécies de microalgas e diversos solventes para extração de lipídios, evidenciou-se que as melhores extrações ocorreram utilizando mistura de solvente apolar e polar, no entanto, a espécie *Chaetoceros muelleri* apresentou-se dentro dos padrões especificados pela norma EN 14214. As demais microalgas, mostraram-se favoráveis a extração de ácidos graxos essenciais (19).

A influência de cada ácido graxo para nas propriedades do biodiesel tem um impacto significativo na escolha de todo o processo para efetiva produção deste biocombustível. Isso mostra que não somente a espécie deve ser levada em consideração, mas as condições em que ela é cultivada, o método de recuperação desta biomassa e principalmente a escolha do método mais eficaz e eficiente para extração dos lipídios e sua conversão em biodiesel.

2.10 Conclusão

Os processos que influenciam no rendimento lipídico de microalgas se iniciam desde a escolha da espécie a ser cultivada e dos parâmetros de cultivo, tais como temperatura, intensidade luminosa e stress de nitrogênio; do sistema de recuperação da biomassa e principalmente dos sistemas de extração de lipídios (rompimento celular e extração em si). Foram identificados, em todos os processos apresentados, o efeito que se tem sobre o conteúdo lipídico e perfil/composição de ácidos graxos e como isso afeta as características e qualidade do biodiesel.

Em relação à recuperação da biomassa, a centrifugação se apresenta como método mais comumente utilizado e com nenhuma/mínima influência nos lipídios, no entanto, é

um método altamente energético, e dificultoso para o escalonamento de processo, já a floculação se mostra com vantagens em relação a pouca influência no conteúdo lipídico, custos operacionais e energéticos relativamente baixos e um processo facilmente escalonável. Estes dois processos podem ser os mais benéficos para uma produção de biodiesel.

A eficiência do método de extração depende de diversos fatores como espécie e natureza de sua parede celular pois afeta a escolha para o método de rompimento desta parede; tipo de lipídio presente (polar ou apolar) para a escolha dos solventes e extração para a micela; além dos custos operacionais e energéticos. Ultrassom e micro-ondas assistidos por solventes se expõem como eficientes no rompimento celular e na extração lipídica, porem são de elevado consumo energético e de difícil escalonamento.

O principal caminho para o desenvolvimento de um processo de produção de biodiesel a partir de lipídios de microalgas é a obtenção deste a um custo competitivo, através da seleção das melhores espécie e condições de cultivo que permitem alcançar máxima produtividade de lipídios com um perfil de ácidos graxos que concedem qualidade ao biodiesel.

Referências

1. SCOTT, S. A. et al. Biodiesel from algae: challenges and prospects. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 277–286, 2010.
2. IYOVO, G. D.; DU, G.; CHEN, J. Sustainable bioenergy bioprocessing: biomethane production, digestate as biofertilizer and as supplemental feed in algae cultivation to promote algae biofuel commercialization. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 2, n. 4, p. 100–106, 2010.
3. DEMIRBAS, A. Use of algae as biofuel sources. **Energy Conversion and Management**, v. 51, n. 12, p. 2738–2749, 2010.
4. MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010.
5. CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294–306, 2007.

6. SILVA, G. DE S. et al. Oil extraction of microalgae for biodiesel production. **Espaço Energia**, n. 21, p. 12–19, 2014.
7. BEHRENS, P. W.; KYLE, D. J. Microalgae as a source of fatty acids. **Journal of Food Lipids**, v. 3, n.4, p. 259-272, 1996.
8. HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 709-732, 2012.
9. MARKOU, G.; NERANTZIS, E. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1532–42, 2013.
10. KLOK, A J. et al. Edible oils from microalgae: insights in TAG accumulation. **Trends in biotechnology**, v. 32, n. 10, p. 521–528, 26, 2014.
11. BELLOU, S. et al. Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 8, p. 1476–1493, 2014.
12. ABREU, A. P. et al. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 61–6, 2012.
13. LIU, J. et al. Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: Assessment of algal oils for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 106–110, 2011.
14. PIORRECK, M.; POHL, P. Formation of biomass, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids in green and blue-green algae during one growth phase. **Phytochemistry**, v. 23, n. 2, p. 217–223, 1984.
15. RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture Biotechnology and Applied Phycology**. London: Blackwell Science, 588p., 2004.
16. MAKAREVICIENE, V. et al. Cultivation of microalgae *Chlorella sp.* and *Scenedesmus sp.* as a potential biofuel feedstock. **Environmental Research, Engineering and Management**, v. 57, n. 3, p. 21–27, 2011.
17. RYCKEBOSCH, E.; BRUNEEL, C.; TERMOTE-VERHALLE, R.; MUYLEAERT, K.; et al. Influence of extraction solvent system on extractability of lipid components from different microalgae species. **Algal Research**, v. 3, p. 36–43, 2014.
18. STEFANOV, K. et al. Fatty acid composition of some algae from the black sea. **Phytochemistry**, v. 27, n. 11, p. 3495–3497, 1988.
19. SOARES, A. T. et al. Comparative analysis of the fatty acid composition of microalgae obtained by different oil extraction methods and direct biomass transesterification. **BioEnergy Research**, v. 7, p. 1035-1044, 2014.

20. VIEGAS, C. V. et al. Algal products beyond lipids: Comprehensive characterization of different products in direct saponification of green alga *Chlorella* sp. **Algal Research**, v. 11, p. 156–164, 2015.
21. BARROS, A. I. et al. Harvesting techniques applied to microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 1489–1500, 2015.
22. SCHMITZ, R.; MAGRO, C.; COLLA, L. Aplicações ambientais de microalgas. **Revista CIATEC-UPF**, v. 4, n. 1, p. 48–60, 2012.
23. BENEMANN, J. Microalgae for biofuels and animal feeds **Energies**, v. 6, p. 5869–86, 2013.
24. LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas – Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMa 1. ed. 2006, 606p.
25. BREUER, G.; LAMERS, P. P. et al. Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 1–9, 2013.
26. RAVEN, J. A.; GEIDER, R. J. Temperature and algal growth. **New Phytologist**, v. 110, n. 4, p. 441–461, 1988.
27. CHEN, C.-Y. et al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 71–81, 2011.
28. BREUER, G. et al. The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 217–226, 2012.
29. RAWAT, I. et al. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. **Applied Energy**, v. 103, p. 444–467, 2013.
30. MORTENSEN, S. H. et al. Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* - Effects of silicate deprivation, temperature and light intensity. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 122, n. 2, p. 173–185, 1988.
31. SAMANTRAY, S.; GURUPRASAD, S.; RAMACHANDRA, T. V. **Diversity of lipids in algae** In: Lake 2010: Wetlands, Biodiversity and Climate Change. **Anais**..Bangalore, India,2010, p. 1-9.
32. VEGA, B. O. A.; VOLTOLINA, D. **Metodos y herramientas analíticas en la evaluacion de la biomassa microalgal**. Mexico, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, 2007, 97p.

33. ISLAM, M. A.; MAGNUSSON, M. et al. Microalgal species selection for biodiesel production based on fuel properties derived from fatty acid profiles. **Energies**, v. 6, n. 11, p. 5676–5702, 2013.
34. BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. In: Richmond, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. London: Blackwell Science, 2004. p. 312–351.
35. SIBI, G.; SHETTY, V.; MOKASHI, K. Enhanced lipid productivity approaches in microalgae as an alternate for fossil fuels – A review. **Journal of the Energy Institute**, v.89, n.3, p. 330-334, 2015.
36. THOMPSON, G. A. Lipids and membrane function in green algae. **Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1302, n. 1, p. 17–45, 1996.
37. FRUMENTO, D. et al. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in tubular photobioreactors: A lipid source for biodiesel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 120–125, 2013.
38. WANG, S.-K. et al. Scale-up cultivation of *Chlorella ellipsoidea* from indoor to outdoor in bubble column bioreactors. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 117–22, 2014.
39. GUSCHINA, I. A.; HARWOOD, J. L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. **Progress in Lipid Research**, v. 45, n. 2, p. 160–86, 2006.
40. DUNSTAN, G. A. et al. Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (*Bacillariophyceae*). **Phytochemistry**, v. 35, n. 1, p. 155–161, 1993.
41. KOBAYASHI, N. et al. Characterization of three *Chlorella sorokiniana* strains in anaerobic digested effluent from cattle manure. **Bioresource Technology**, v. 150, p. 377–386, 2013.
42. SHEKH, A. Y. et al. Biomass and lipid enhancement in *Chlorella* sp. with emphasis on biodiesel quality assessment through detailed FAME signature. **Bioresource Technology**, v. 201, p. 276–286, 2015.
43. GRANADOS, M. R. et al. Evaluation of flocculants for the recovery of freshwater microalgae. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 102–110, 2012.
44. SALIM, S. et al. Harvesting of microalgae by bio-flocculation. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 5, p. 849–855, 2011.
45. DERNER, R. B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959–1967, 2006.
46. MOLINA GRIMA, E. et al. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 7–8, p. 491–515, 2003.

47. BANERJEE, C. et al. Study of algal biomass harvesting using cationic guar gum from the natural plant source as flocculant. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 675–81, 30 2013.
48. VANDAMME, D. et al. Flocculation of microalgae using cationic starch. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 4, p. 525–530, 2010.
49. UDOM, I. et al. Harvesting microalgae grown on wastewater. **Bioresource technology**, v. 139, p. 101–6, 2013.
50. BORGES, L. et al.. Effect of harvesting processes on the lipid yield and fatty acid profile of the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. **Aquaculture Reports**, v. 4, p. 164–168, 2016.
51. CHRISTENSON, L.; SIMS, R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 686–702, 2011.
52. MILLEDGE, J. J.; HEAVEN, S. A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 12, n. 2, p. 165–178, 2013.
53. CHATSUNGNOEN, T.; CHISTI, Y. Harvesting microalgae by flocculation–sedimentation. **Algal Research**, v. 13, p. 271–283, 2016b.
54. LIU, J. et al. Freshwater microalgae harvested via flocculation induced by pH decrease. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 98, 2013.
55. PRAGYA, N.; PANDEY, K. K.; SAHOO, P. K. A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 24, p. 159–171, 2013.
56. BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010.
57. SHELEF, G.; SUKENIK, A. Microalgae Harvesting and Processing : A Literature Review. **Technion Research and Development Foundation Ltd**. Haifa, Israel, 1984.
58. UDUMAN, N. et al. Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v. 2, n. 1, 2010.
59. PAPAZI, A.; MAKRIDIS, P.; DIVANACH, P. Harvesting *Chlorella minutissima* using cell coagulants. **Journal of Applied Phycology**, v.22, n.3, p. 349–355, 2010.

60. MORIOKA, L. R. I. et al. Flocculação de *Chlorella* sp. produzida em concentrado de dessalinização e estudo de método de extração de lipídios intracelulares. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 44–49, 2014.
61. ŞIRIN, S. et al. Harvesting the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* with polyaluminum chloride, aluminium sulphate, chitosan and alkalinity-induced flocculation. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 5, p. 1067–1080, 2012.
62. GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; BALLESTEROS, M. Microalgae autoflocculation: an alternative to high-energy consuming harvesting methods. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 4, p. 991–999, 2013.
63. VANDAMME, D.; FOUBERT, I.; MUYLAERT, K. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. **Trends in biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 233–9, 2013.
64. BORGES, L. et al. Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 10, p. 4449–4454, 2011.
65. HARITH, Z. T. et al. Effect of different flocculants on the flocculation performance of microalgae, *Chaetoceros calcitrans*, cells. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 21, p. 5971–5978, 2009.
66. VANDAMME, D. et al. Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: Role of magnesium and calcium and practical implications. **Bioresource Technology**, v. 105, p. 114–119, 2012.
67. SALIM, S.; VERMUË, M. H.; WIJFFELS, R. H. Ratio between autoflocculating and target microalgae affects the energy-efficient harvesting by bio-flocculation. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 49–55, 2012.
68. BRUTON, T. et al. **A Review of the Potential of Marine Algae as a Source of Biofuel in Ireland Sustainable Energy Ireland Dublin**. Technical Report; Sustainable Energy Ireland: Dublin, Irlanda, 2009.
69. COWARD, T.; LEE, J. G. M.; CALDWELL, G. S. Harvesting microalgae by CTAB-aided foam flotation increases lipid recovery and improves fatty acid methyl ester characteristics. **Biomass and Bioenergy**, v. 67, p. 354–362, 2014.
70. YAP, R. K. L. et al. Hydrophobically-associating cationic polymers as micro-bubble surface modifiers in dissolved air flotation for cyanobacteria cell separation. **Water Research**, v. 61, p. 253–262, 2014.
71. LAAMANEN, C. A.; ROSS, G. M.; SCOTT, J. A. Flotation harvesting of microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 75–86, 2016.
72. ZHANG, X. et al. Harvesting microalgal biomass using magnesium coagulation-dissolved air flotation. **Biomass and Bioenergy**, v. 93, p. 43–49, 2016.

73. GAO, S. et al. Electro-coagulation–flotation process for algae removal. **Journal of Hazardous Materials**, v. 177, n. 1–3, p. 336–343, 2010.
74. HANOTU, J.; BANDULASENA, H. C. H.; ZIMMERMAN, W. B. Microflotation performance for algal separation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 7, p. 1663–1673, 2012.
75. LIU, J. C.; CHEN, Y. M.; JU, Y. H. Separation of algal cells from water by column flotation. **Separation Science and Technology**, v. 34, n. 11, p. 2259–2272, 1999.
76. NDIKUBWIMANA, T. et al. Flotation: A promising microalgae harvesting and dewatering technology for biofuels production. **Biotechnology Journal**, v. 11, n. 3, p. 315–326, 2016.
77. ZHANG, J.; HU, B. A novel method to harvest microalgae via co-culture of filamentous fungi to form cell pellets. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 529–535, 2012.
78. ZHANG, B.; CHEN, S. Effect of different organic matters on flocculation of *Chlorella sorokiniana* and optimization of flocculation conditions in swine manure wastewater. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 774–780, 2015.
79. LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J. Microbial flocculation, a potentially low-cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, n. 5, p. 559–567, 2009.
80. WYATT, N. B. et al. Critical conditions for ferric chloride-induced flocculation of freshwater algae. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 2, p. 493–501, 2012.
81. RWEHUMBIZA, V. M.; HARRISON, R.; THOMSEN, L. Alum-induced flocculation of preconcentrated *Nannochloropsis salina*: residual aluminium in the biomass, FAMES and its effects on microalgae growth upon media recycling. **Chemical Engineering Journal**, v. 200-202, p. 168–175, 2012.
82. KIM, J. et al. Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 6, p. 862–76, 2013.
83. ROSELET, F.; BURKERT, J.; ABREU, P. C. Flocculation of *Nannochloropsis oculata* using a tannin-based polymer: Bench scale optimization and pilot scale reproducibility. **Biomass and Bioenergy**, v. 87, p. 55–60, 2016.
84. RAS, M. et al. Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 200–206, 2011.
85. RASHID, N.; REHMAN, M. S. U.; HAN, J.-I. Use of chitosan acid solutions to improve separation efficiency for harvesting of the microalga *Chlorella vulgaris*. **Chemical Engineering Journal**, v. 226, p. 238–242, 2013.

86. XU, Y.; PURTON, S.; BAGANZ, F. Chitosan flocculation to aid the harvesting of the microalga *Chlorella sorokiniana*. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 296–301, 2013.
87. WAN, C. et al. Bioflocculant production from *Solibacillus silvestris* W01 and its application in cost-effective harvest of marine microalga *Nannochloropsis oceanica* by flocculation. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 207–212, 2013.
88. KÖNIG, R. B. et al. Harvesting of the marine microalga *Conticribra weissflogii* (Bacillariophyceae) by cationic polymeric flocculants. **Biomass and Bioenergy**, v. 68, p. 1–6, 2014.
89. JAPAR, A. S.; TAKRIFF, M. S.; YASIN, N. H. M. Harvesting microalgal biomass and lipid extraction for potential biofuel production: A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v.5, n. 1, p. 555–563, 2017.
90. CHATSUNGNOEN, T.; CHISTI, Y. Oil production by six microalgae: impact of flocculants and drying on oil recovery from the biomass. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 5, p. 2697–2705, 2016a.
91. DASSEY, A. J.; THEEGALA, C. S. Harvesting economics and strategies using centrifugation for cost effective separation of microalgae cells for biodiesel applications. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 241–5, 2013.
92. HEASMAN, M. et al. Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs - a summary. **Aquaculture Research**, v. 31, n. 8–9, p. 637–659, 2000.
93. ANTHONY, R. J. et al. Effect of coagulant/flocculants on bioproducts from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 149, p. 65–70, 2013.
94. AHMAD, A. L. et al. Comparison of harvesting methods for microalgae *Chlorella* sp. and its potential use as a biodiesel feedstock. **Environmental Technology**, v. 35, n. 17, p. 2244–2253, 2014.
95. SHOW, K.-Y.; LEE, D.-J. Algal Biomass Harvesting. In: **Biofuels from Algae**, p. 85–110, 2014.
96. DANQUAH, M. K. et al. Dewatering of microalgal culture for biodiesel production: Exploring polymer flocculation and tangential flow filtration. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, n. 7, p. 1078–1083, 2009.
97. MOHN, F. H. Experiences and strategies in the recovery of biomass from mass cultures of microalgae. In: Shelef G, Soeder CJ, editors. **Algae Biomass**, p. 547–571, 1980.
98. BILAD, M. R. et al. Harvesting microalgal biomass using submerged microfiltration membranes. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 343–352, 2012.

99. RÍOS, S. D. et al. Antifouling microfiltration strategies to harvest microalgae for biofuel. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 406–418, 2012.
100. AHMAD, A. L. et al. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 1, p. 584–593, 2011.
101. KNUCKEY, R. M. et al. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. **Aquacultural Engineering**, v. 35, n. 3, p. 300–313, 2006.
102. DOAN, T. T. Y.; SIVALOGANATHAN, B.; OBBARD, J. P. Screening of marine microalgae for biodiesel feedstock. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 7, p. 2534–2544, 2011.
103. GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 269–74, 2009.
104. NASCIMENTO, I. A. et al. Screening microalgae strains for biodiesel production: Lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. **Bioenergy Research**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 2013.
105. SYDNEY, E. B. et al. Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3291–3294, 2011.
106. KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Process. Technol.**, v. 86, p. 1059–1070, 2005.
107. GERDE, J. A. et al. Microalgae flocculation: Impact of flocculant type, algae species and cell concentration. **Algal Research**, v. 3, p. 30–35, 2014.
108. LEE, J.-Y. et al. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 575–577, 2010.
109. MOAZAMI, N. et al. Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of *Nannochloropsis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 39, p. 449–453, 2012.
110. ONCEL, S. S. Microalgae for a macroenergy world. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 26, p. 241–264, 2013.
111. MILANO, J. et al. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 180–197, 2016.
112. TALEBI, A. F. et al. Fatty acids profiling: A selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. **Algal Research**, v. 2, n. 3, p. 258–267, 2013.

113. CHRISTIE, W. W., XILIAN, H. **Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis**. Oily Press p. 72–73, 2004.
114. SMITH, W. L.; MURPHY, R. C. **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes**. 4th edicao, Elsevier, 2016, p. 259-296.
115. HARWOOD, J. L.; JONES, A. L. Lipid Metabolism in Algae. **Advances in Botanical Research**, v. 16, p. 1–53, 1989.
116. MOLINA, G. E.; MEDINA, R. A.; GIMENEZ, G. A. Recovery of algal PUFAs. In: **Chemicals from microalgae** London: Taylor & Francis, 1999 p. 108-144.
117. BASOVA, M. M. Fatty acid composition of lipids in microalgae. **International Journal on Algae**, v. 7, n.1, p 33-57 2005.
118. RYCKEBOSCH, E.; BRUNEEL, C.; TERMOTE-VERHALLE, R.; GOIRIS, K.; et al. Nutritional evaluation of microalgae oils rich in omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids as an alternative for fish oil. **Food chemistry**, v. 160, p. 393–400, 2014.
119. LEHNER, R.; QUIROGA, A. D. **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes**. Elsevier, 2016 p. 149-184.
120. BREUER, G.; EVERS, W. A. C.; et al. Analysis of Fatty Acid Content and Composition in Microalgae. **Journal of Visualized Experiments**, v. 80, p. e50628, 2013.
121. NIEUWENHUYZEN, W. VAN. **Polar Lipids**. Elsevier, 2015, p. 479-499.
122. PETKOV, G.; GARCIA, G. Which are fatty acids of the green alga *Chlorella*? **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 5, p. 281–285, 2007.
123. LI, Y. et al. A comparative study: the impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 14, 2014.
124. RYCKEBOSCH, E.; BERMÚDEZ, S. P. C.; et al. Influence of extraction solvent system on the extractability of lipid components from the biomass of *Nannochloropsis gaditana*. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 3, p. 1501–1510, 2014.
125. SHAHZAD, I. et al. Algae as an alternative and renewable resource for biofuel production. **The BIOL**. v. 1, n. 1, p. 16–23, 2010.
126. PEREIRA, C. M. P. et al. Biodiesel renovável derivado de microalgas: avanços e perspectivas tecnológicas. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2013–2018, 2012.

- 127.D'OCA, M. G. M. et al. Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 4, p. 1533–1538, 2011.
- 128.HU, Q. et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, v. 54, n. 4, p. 621–39, 2008.
- 129.SAHU, A. et al. Fatty acids as biomarkers of microalgae. **Phytochemistry**, v. 89, p. 53–58, 2013.
- 130.KNOTHE, G. Fuel properties of highly polyunsaturated fatty acid methyl esters. prediction of fuel properties of algal biodiesel. **Energy & Fuels**, v. 26, p. 5265-5273, 2012.
- 131.RAMOS, M. J. et al. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 261–8, 2009.
- 132.STUMPF, P. K. **Lipids: Structure and Function**. Academic Press , Elsevier, 1980, 710 p.
- 133.BROWN, A. J.; SHARPE, L. J. **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes**. Elsevier Science, 2016. 612 p.
- 134.RYCKEBOSCH, E.; MUYLAERT, K.; FOUBERT, I. Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 2, p. 189–198, 2012.
- 135.BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **The National Research Council of Canada**, v. 37, n. 8, 1959.
- 136.FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues **Journal of Biological Chemistry**, v.226, p 497–509, 1957.
- 137.FLORENTINO DE SOUZA SILVA, A. P. et al. Comparison of pretreatment methods for total lipids extraction from mixed microalgae. **Renewable Energy**, v. 63, p. 762–766, 2014.
- 138.GREENWELL, H. C. et al. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. **Journal of The Royal Society Interface**, v.23, 2009.
- 139.NIRAJ, S. J. R. et al. Extraction of oil fromalgae by solvent extraction and oil expeelerme thod. **International Journal Chemical Science.**, v. 9, p. 1746–1750, 2011.
- 140.MUBARAK, M.; SHAIJA, A.; SUCHITHRA, T. V. A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. **Algal Research**, v. 7, p. 117–123, 2015.

141. D'ALESSANDRO, E. B. et al. Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 832–841, 2016.
142. DONG, T. et al. Lipid recovery from wet oleaginous microbial biomass for biofuel production: A critical review. **Applied Energy**, v. 177, p. 879–895, 2016.
143. BYREDDY, A. R. et al. Comparison of cell disruption methods for improving lipid extraction from *Thraustochytrid* strains. **Marine Drugs**, v. 13, n. 8, p. 5111–5127, 2015.
144. ADAM, F. et al. “Solvent-free” ultrasound-assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: a green, clean and scalable process. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 457–465, 2012.
145. ARAUJO, G. S. et al. Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: prospection of the optimal extraction method. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 1, p. 95–98, 2013.
146. KIM, Y. H. et al. Ultrasound-assisted extraction of lipids from *Chlorella vulgaris* using MeSO₄. **Biomass and Bioenergy**, v. 56, p. 99–103, 2013.
147. BALASUBRAMANIAN, R. K.; YEN DOAN, T. T.; OBBARD, J. P. Factors affecting cellular lipid extraction from marine microalgae. **Chemical Engineering Journal**, v. 215–216, p. 929–936, 2013.
148. EHIMEN, E. A.; SUN, Z.; CARRINGTON, G. C. Use of Ultrasound and Co-Solvents to Improve the In-Situ Transesterification of Microalgae Biomass. **Procedia Environmental Sciences**, v. 15, p. 47–55, 2012.
149. NETO, A. M. P. et al. Improvement in microalgae lipid extraction using a sonication-assisted method. **Renewable Energy**, v. 55, p. 525–531, 2013.
150. PRABAKARAN, P.; RAVINDRAN, A. D. A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 150–154, 2011.
151. URSU, A. V. et al. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 134–139, 2014.
152. HALIM, R. et al. Mechanical cell disruption for lipid extraction from microalgal biomass. **Bioresource Technology**, v. 140, p. 53–63, 2013.
153. HALIM, R. et al. Microalgal cell disruption for biofuel development. **Applied Energy**, v. 91, n. 1, p. 116–121, 2012.

154. GRIMI, N. et al. Selective extraction from microalgae *Nannochloropsis* sp. using different methods of cell disruption. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 254–259, 2014.
155. ZHENG, H. et al. Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel-producing lipids: A comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis, and microwaves. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, n. 7, p. 1215–1224, 2011.
156. POHNDORF, R. S. et al. Production of lipids from microalgae *Spirulina* sp.: Influence of drying, cell disruption and extraction methods. **Biomass and Bioenergy**, v. 93, p. 25–32, 2016.
157. YOO, G. et al. Direct lipid extraction from wet *Chlamydomonas reinhardtii* biomass using osmotic shock. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 717–22, 2012.
158. SHARMA, K. K.; SCHUHMANN, H.; SCHENK, P. M. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. **Energies**, v. 5, n. 5, p. 1532–1553, 2012.
159. MANDAL, S. et al. Comparative assessment of various lipid extraction protocols and optimization of transesterification process for microalgal biodiesel production. **Environmental Technology**, v. 34, n. 13–14, p. 2009–2018, 1 2013.
160. RANJAN, A.; PATIL, C.; MOHOLKAR, V. S. Mechanistic assessment of microalgal lipid extraction. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 6, p. 2979–2985, 2010.
161. SATHISH, A.; SIMS, R. C. Biodiesel from mixed culture algae via a wet lipid extraction procedure. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 643–647, 2012.
162. LIU, J. et al. Direct transesterification of fresh microalgal cells. **Bioresource Technology**, v. 176, p. 284–287, 2015.
163. KIM, D.-Y. et al. Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 300–310, 2016.
164. NORAINI, M. Y. et al. A review on potential enzymatic reaction for biofuel production from algae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 39, p. 24–34, 2014.
165. SURENDRHIRAN, D.; VIJAY, M.; SIRAJUNNISA, A. R. Biodiesel production from marine microalga *Chlorella salina* using whole cell yeast immobilized on sugarcane bagasse. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 3, p. 1294–1300, 2014.
166. CECCHI, H. M. **Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos**. 2. ed. rev ed. Campinas, SP: UNICAMP, 208 p.

167. WIDJAJA, A.; CHIEN, C.-C. C.; JU, Y.-H. H. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 40, n. 1, p. 13–20, 2009.
168. BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Metodo de extração e qualidade da fração lipídica de materias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 849–854, 2009.
169. MENEGAZZO, M. L.; PETENUCCI, M. E.; FONSECA, G. G. Quality assessment of Nile tilapia and hybrid sorubim oils during low temperature storage. **Food Bioscience**, v. 16, p. 1–4, 2016.
170. GULDHE, A. et al. Efficacy of drying and cell disruption techniques on lipid recovery from microalgae for biodiesel production. **Fuel**, v. 128, p. 46–52, 2014.
171. HITA PEÑA, E. et al. Extraction of free fatty acids from wet *Nannochloropsis gaditana* biomass for biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 75, p. 366–373, 2015.
172. TAHER, H. et al. Effective extraction of microalgae lipids from wet biomass for biodiesel production. **Biomass and Bioenergy**, v. 66, p. 159–167, 2014b.
173. PARK, J. Y. et al. Advances in direct transesterification of algal oils from wet biomass. **Bioresource Technology**, v. 184, n. 3, p. 267–275, 2015.
174. HALIM, R. et al. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 178–85, 2011.
175. BAUMGARDT, F. J. L. et al. Lipid content and fatty acid profile of *Nannochloropsis oculata* before and after extraction with conventional solvents and/or compressed fluids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 108, p. 89–95, 2016.
176. MENEZES, R. S. et al. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 10–15, 2013.
177. MENDES, R. L. et al. Applications of supercritical CO₂ extraction to microalgae and plants. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 62, n. 1, p. 53–59, 1995.
178. TAHER, H. et al. Mass transfer modeling of *Scenedesmus* sp. lipids extracted by supercritical CO₂. **Biomass and Bioenergy**, v. 70, p. 530–541, 2014a.
179. GRIMA, E. M. et al. Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, n. 9, p. 955–959, 1994.
180. SOXHLET, F. Soxhlet, über gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. **Polytechnisches Journal**, v. 232, p. 461–465, 1879.

- 181.CAVALCANTE, A. K.; SOUSA, L. B. DE; HAMAWAKI, O. T. Determinação e avaliação do teor de óleo em sementes de soja pelos métodos de ressonância magnética nuclear e Soxhlet. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 1, p. 8–15, 2011.
- 182.HIDALGO, P.; CIUDAD, G.; NAVIA, R. Evaluation of different solvent mixtures in esterifiable lipids extraction from microalgae *Botryococcus braunii* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v.201, p.360-4, 2016.
- 183.KNOTHE, G.; KRAHL, J.; GERPEN, J. H. VAN. **The biodiesel handbook**. 2nd Ed., AOCS Press, 2010, 302 p.
- 184.PIYUSHI NAUTIYAL, K.A. SUBRAMANIAN, M. G. D. Production and characterization of biodiesel from algae. **Fuel Processing Technology**, v.120, p 79-88, 2014.
- 185.FRANCO, A. L. C. et al. Biodiesel De Microalgas: avanços e desafios. **Quimica Nova**, v. 36, n. 3, p. 437–448, 2013.
- 186.ANDRÉ, P. et al. Biodiesel production in Brazil : Current scenario and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 415–428, 2015.
- 187.CARDOSO, A.; ELIZA, G.; MARQUES³, A. K. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 4, p. 542–549, 2011.
- 188.MIAO, X.; WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 6, p. 841–6, 2006.
- 189.SUALI, E.; SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 6, p. 4316–4342, 2012.
- 190.ZHANG, Y. et al. Biodiesel production by direct transesterification of microalgal biomass with co-solvent. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 712–5, 2015.
- 191.GRIFFITHS, M. J.; HILLE, R. P. VAN; HARRISON, S. T. L. Selection of direct transesterification as the preferred method for assay of fatty acid content of microalgae. **Lipids**, v.45, n. 11, p. 1053-1060, 2010.
- 192.VELASQUEZ-ORTA, S. B.; LEE, J. G. M.; HARVEY, A. Alkaline in situ transesterification of *Chlorella vulgaris*. **Fuel**, v. 94, p. 544–550, 2012.
- 193.EHIMEN, E. A.; SUN, Z. F.; CARRINGTON, C. G. Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids. **Fuel**, v. 89, n. 3, p. 677–684, 2010.
- 194.SUH, W. I. et al. Direct transesterification of wet microalgal biomass for preparation of biodiesel. **Algal Research**, v. 12, p. 405–411, 2015.

195. CHEN, C.-L. et al. Biodiesel production from wet microalgae feedstock using sequential wet extraction/transesterification and direct transesterification processes. **Bioresource Technology**, v. 194, p. 179–186, 2015.
196. RAMÍREZ-VERDUZCO, L. F.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, J. E.; JARAMILLO-JACOB, A. D. R. Predicting cetane number, kinematic viscosity, density and higher heating value of biodiesel from its fatty acid methyl ester composition. **Fuel**, v. 91, n. 1, p. 102–111, 2012.
197. MENEGAZZO, M. L. et al. Production of biodiesel via methyl and ethyl routes from Nile tilapia and hybrid Sorubim crude oils. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 3, n. 1, p. 150–154, 2015.
198. TALEBI, A. F.; TABATABAEI, M.; CHISTI, Y. a User-Friendly Software for Predicting the Properties of Prospective Biodiesel. **Biofuel Research Journal** **Biofuel Research Journal**, v. 2, n. 2, p. 55–57, 2014.
199. KNOTHE, G. Analyzing biodiesel: Standards and other methods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 83, p. 823–833, 2006.
200. CHUAH, L. F. et al. Influence of fatty acids content in non-edible oil for biodiesel properties. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 18, n. 2, p. 473–482, 2016.
201. ISLAM, M. A.; AYOKO, G. A.; et al. Influence of fatty acid structure on fuel properties of algae derived biodiesel. **Procedia Engineering**, v. 56, p. 591–596, 2013.
202. WANG, L. et al. Influence of fatty acid composition of woody biodiesel plants on the fuel properties. **Journal of Fuel Chemistry and Technology**, v. 40, n. 4, p. 397–404, 2012.

3 Artigo: Cultivo de *Chlorella sorokiniana* como potencial para produção de biodiesel

Resumo

As microalgas têm a habilidade de sintetizar diferentes biomoléculas como proteínas, lipídios, carboidratos, pigmentos e minerais. As potenciais aplicações industriais são alimentação animal e biocombustíveis. Este trabalho buscou identificar a potencialidade de produção de biodiesel de *Chlorella sorokiniana* cultivada em fotobiorreatores expostos a condições ambientais. A produtividade de biomassa alcançou rendimento de 43,33 mg L⁻¹ dia⁻¹, teor de proteína de 50,44% e teor lipídico de 20,08%. O perfil de ácidos graxos apresentou C16:0 (39,68%), C16:1 (7,22%), C18:0 (5,49%), C18:1 (17,20%), C18:2 (15,97%) e C18:3 (11,03%) e influenciou na predição das propriedades do biodiesel, com índice de iodo de 81,95 g I₂ (100g)⁻¹, número de cetano 54,09 e ponto de entupimento de filtro à frio de 9,57°C. O tipo de biodiesel produzido por *Chlorella sorokiniana* cultivada em condições ambientais poderia ser utilizado como B100 em países tropicais.

Palavras-chave: microalga, ácidos graxos, propriedades do biodiesel, lipídios

3.1 Introdução

Microalgas podem ser utilizadas como matéria-prima para produção de vários combustíveis renováveis devido a sua composição de carboidratos, lipídios e proteínas. Pela habilidade de sintetizar ácidos graxos, é estudada para produção de biodiesel (1–4). *Chlorella* spp. é considerada uma microalga verde, unicelular e potencial candidata para produção de biocombustíveis, em especial biodiesel, devido as suas inerentes características de produção de biomassa e acumulação de lipídios, além de utilização de diversas fontes de nutrientes, como efluentes, e habilidade de suportar elevadas temperaturas (42 °C) (5–8). A biomassa de *Chlorella* sp. é considerada GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*), isso a caracteriza como fonte suplementar de alimentação sem causar riscos à saúde humana (9).

O crescimento das microalgas é diretamente afetado pelas condições de cultivo. Há muitos estudos para entender a fisiologia das espécies de microalgas e como alguns fatores e parâmetros podem influenciar no crescimento e composição da biomassa (10–13). Intensidade e incidência luminosa, temperatura, fontes de nitrogênio e carbono são

fatores que causam estresse celular e fazem-nas produzirem diferentes compostos de interesse, incluindo conteúdo lipídico (10,14).

A produtividade lipídica leva em consideração a concentração de lipídios na célula e a biomassa produzida, como um indicador de desempenho de potencial da matéria-prima para produção de biocombustível (3,15–17). Contudo, após a extração do conteúdo lipídico, a biomassa residual pode ser utilizada como fonte proteica para alimentação animal ou, após despolimerização de celulose e carboidrato, usada para processos fermentativos (18).

As vantagens de utilização da microalga para produção de biodiesel são o elevado conteúdo lipídico, habilidade de crescimento em águas salinas, doce e efluentes (4,8), no entanto, há ainda gargalos para um escalonamento deste processo como custos de cultivo, eficiência no processo de recuperação de biomassa e extração lipídica (3,19,20). A produção convencional de biodiesel começa com a extração lipídica seguida de transesterificação. Este processo deve ser econômico, energético e ambientalmente seguro (1,3,20,21).

As propriedades do biodiesel podem ser preditas através do perfil e composição de ácidos graxos do óleo matriz, pois relevantes propriedades do biodiesel estão diretamente dependentes desta composição (21). Todos estes fatores servem de subsídio para avaliar o potencial de produção de biodiesel a partir de lipídios extraídos de microalgas. As equações empíricas para avaliar as propriedades do biodiesel podem ser usadas em alguns casos, por exemplo, quando se é difícil obter uma amostra suficientemente grande de um biodiesel a partir de um óleo de matriz emergente para análises detalhadas, como é comumente para o biodiesel de algas (21).

O objetivo deste trabalho foi de avaliar o crescimento de *Chlorella sorokiniana* em meio sintético e ambiente externo; e avaliar a potencialidade para produção de biodiesel através do conteúdo lipídico, perfil e composição de ácidos graxos.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Preparação e tratamento da microalga

A microalga *Chlorella sorokiniana* CTT 7727 foi cultivada em meio Bold Basal (BBM) composto por 0,25 g NaNO₃, 0,075 g MgSO₄.7H₂O, 0,025 g NaCl, 0,075 g K₂HPO₄.3H₂O, 0,175 g KH₂PO₄, 0,025 g CaCl₂.2H₂O, 0,00882 g ZnSO₄.7H₂O, 0,00144 g MnCl₂.4H₂O, 0,0007 g MoO₃, 0,00157 g CuSO₄.5H₂O, 0,00049 g Co(NO₃)₂.6H₂O, 0,01142 g H₃BO₃, 0,05 g EDTA-Na₂, 0,031 g KOH e 1 µL H₂SO₄ por litro.

O inóculo foi mantido em cultivo axênico, em frasco Erlenmeyer de 1 L, em agitador orbital, com fotoperíodo de 12/12h claro/escuro, com temperatura de $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$, agitação de 200 rpm e 800 lux por 10 dias. Após este período, os inóculos foram transferidos para fotobiorreatores com volume útil de 18 L por 30 dias. Os fotobiorreatores estavam expostos a condições ambientais de temperatura e luminosidade. A temperatura média do período foi de $26,28 \pm 3,42^\circ\text{C}$ e iluminação de $580,02 \pm 87,18 \mu\text{moles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ com fotoperíodo de 12/12 h claro/escuro. A aeração foi provida por compressor externo. Os cultivos foram realizados em triplicatas. Os cultivos foram mantidos na Fazenda Marcante, no município de Dourados – MS (coordenadas geográficas: Latitude, Longitude -22.283988, -55.049292)

3.2.2 Análise de crescimento e composição da biomassa

O crescimento da microalga foi determinado pelo incremento da densidade celular avaliado por densidade ótica (DO) e biomassa seca. A absorvância foi mensurada em leitora de microplaca (Anthos modelo Zenyth 200rt Biochrom) com leituras no comprimento de onda de 670 nm a cada 5 dias. A fase exponencial de crescimento foi identificada pela região linear sob a curva de $\ln(\text{DO})$ versus tempo. O crescimento máximo específico (μ_{max}) foi determinado pela inclinação desta reta e o tempo de duplicação (TD) a relação entre $\ln(2)/\mu_{\text{max}}$. Foram avaliados a concentração e produtividade de biomassa, e a produtividade de lipídios.

A biomassa foi recuperada por sistema de floculação com cloreto férrico em concentração de 0,75g/L, com agitação manual por 1 min. e seguido por sedimentação com tempo de detenção de 10 min., após filtração. A biomassa foi liofilizada sendo armazenada a -4°C até sua utilização. As análises da biomassa seca foram realizadas de acordo com as metodologias da AOAC (22) para proteínas, cinzas e lipídios. O conteúdo lipídico foi determinado pelo método Bligh & Dyer (23), seguido por transesterificação com ácido sulfúrico em metanol. O teor de proteína foi determinado através do método micro-Kjeldahl, com fator de 6,25, cinzas por queima em mufla à 800°C e carboidratos por diferença de composição centesimal.

3.2.3 Perfil e composição de ácidos graxos

Em um tubo de vidro, os lipídios (0,1g) foram transesterificados por catálise ácida com 5 mL de 2% de ácido sulfúrico em Metanol a temperatura de 70°C por 1 h. Então, adicionou-se ao tubo 2 mL de hexano e 0,75 mL de água destilada ao tubo e agitou-se por

30 s em vortex. Após a formação de fases, a superior contendo os ácidos graxos e hexano foi transferida para GC *vial* e encaminhada para análise em cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chama (24,25).

A análise dos ácidos graxos foi realizada em cromatografo a gás equipado com auto-amostrador e detector de ionização por chama (FID). A coluna capilar utilizada para separar os ácidos graxos foi Zebron™ZB-FFAP polar (30 m × 0,32 mm × 0,25 µm *film thickness*; Phenomenex, Torrance, CA, USA). O gás de arraste Hélio correu a velocidade linear de 35 cm s⁻¹. A programação de temperatura para a separação foi: temperatura de forno inicial da coluna em 150°C, permanecendo por 3 min., rampa de aquecimento a 1,5°C min⁻¹ até 240°C e sustentado por 15 min. O injetor (amostragem de 2 µL cada e relação de 10:1) e detector operaram a temperatura constante de 250°C durante 78 min. Os compostos foram identificados e quantificados comparando os tempos de retenção e picos com os padrões *Marine Oil Test Mix* e FAME #13 (Restek Corp., Bellefonte, PA, USA) (26). Os ácidos graxos foram identificados e quantificados através de análise cromatográfica e as frações em massa foram normalizadas a porcentagem a partir do total de ácidos graxos.

3.2.4 Predição de propriedades do biodiesel

A composição de ácidos graxos foi detalhada e utilizada para determinar as características do biodiesel como grau de instauração (GI), número de cetano (NC), índice de iodo (II), índice de saponificação (IS), ponto de nuvem (PN), ponto de entupimento de filtro à frio (PEFF), poder calorífico (PC), viscosidade cinemática (V) e densidade (D). Todas estas propriedades de combustível foram calculadas por equações empíricas sendo que a precisão e a confiabilidade dessas equações já foram comprovadas (21,30,31). O Anexo A apresenta o detalhamento das equações.

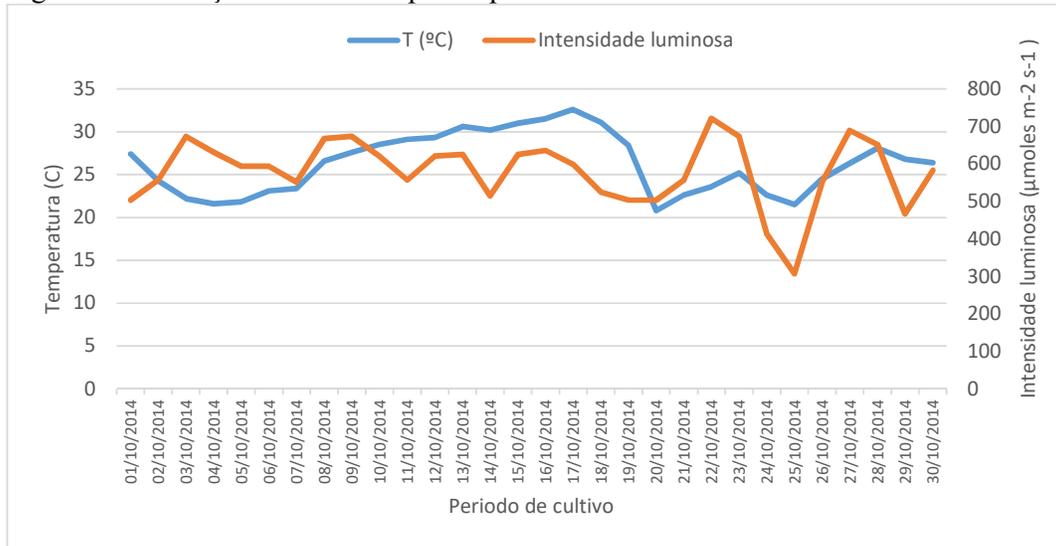
3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Crescimento e composição da biomassa

A Região da Grande Dourados – MS apresenta dois distintos períodos climáticos, um período de setembro a abril, com médias de temperaturas acima de 20°C e de maio a agosto, com temperaturas inferiores a 20°C e de fato, a média para o período de cultivo (outubro de 2014) foi de 26,28 ± 3,42°C e intensidade luminosa de 580,02 ± 87,18 µmoles m⁻² s⁻¹ com fotoperíodo de 12/12 h claro/escuro. Estes dados foram obtidos a partir da Estação Experimental da EMBRAPA – Agropecuária Oeste de Dourados-MS e a Figura

3.1 apresenta a variação de temperatura e intensidade luminosa medidas a cada 24 h, durante 30 dias, e as oscilações ao final do período não afetaram o cultivo visto que a microalga já se encontrava em fase exponencial final de crescimento.

Figura 3.1 Condições ambientais para o período de cultivo



As condições ambientais proveram suporte para cultivo de microalgas em fotobiorreatores no entanto, influenciaram no crescimento celular, produtividade da biomassa, produtividade de lipídios e composição da biomassa. A Tabela 3.1 apresenta os valores encontrados neste trabalho. A velocidade máxima de crescimento de $0,25\text{dia}^{-1}$ e o tempo de duplicação de 2,77 dia, indicam que esta microalga teve desenvolvimento com produtividade de biomassa e lipídios, alcançando $43,33\text{ mg L}^{-1}\text{ dia}^{-1}$ e $8,33\text{ mg L}^{-1}\text{ dia}^{-1}$, respectivamente. Estes valores estão distintos dos encontrados por outros autores (7,8) levando em consideração que as condições de cultivo e linhagens são diferentes, ainda sim as produtividades desta microalga garantiriam um sistema de cultivo em escala piloto. A composição da biomassa apresenta duas possibilidades de uso, pelo seu elevado teor proteico (50,44%); e o teor lipídico (20,07%).

Tabela 3.1 Crescimento, produtividade e composição de *Chlorella sorokiniana*

	μ_{max} (dia ⁻¹)	TD (dia)	Biomassa (mg L ⁻¹)	Produtividade de biomassa (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)	Produtividade de lipídios (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)
Crescimento	0,25 ± 0,001	2,77 ± 0,004	1.300 ± 127	43,33 ± 1,13	8,33 ± 0,35
Produtividade					
Composição da biomassa (% em base seca)		Proteína	Carboidratos	Lipídios	Cinzas
		50,44 ± 1,11	16,20 ± 0,32	20,07 ± 1,53	13,28 ± 0,95
Composição dos principais ácidos graxos (% do total de FAME)					
C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
39,68	7,22	5,49	17,20	15,97	11,03

μ_{max} : velocidade de crescimento; TD: tempo de duplicação; FAME: Ésteres metílicos de ácidos graxos; C16:0 Ácido palmítico; C16:1: ácido palmitoleico; C18:0: Ácido esteárico; C18:1: Ácido oleico; C18:2: Ácido linoleico; C18:3: Ácido α -linolênico

Em estudo realizado com *Chlorella sorokiniana* cultivada em meio BBM com fotoperíodo de 12/12h claro/escuro, iluminação de 100 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de 26°C por 10 dias, os valores encontrados de rendimento de biomassa e de lipídios foram de 92,5 e 25,64 mg L⁻¹, no entanto, o conteúdo lipídico apresentou-se elevado com 26,5% (8). Contudo, em outro estudo com diferentes linhagens de *Chlorella sorokiniana*, CS-01, UTEX 1230 e UTEX 2714, também cultivadas em meio BBM, com fotoperíodo contínuo, iluminação de 200 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de 26°C por 21 dias, a produtividade de biomassa encontrada foi de 16,31; 21,00 e 17,53 mg L⁻¹dia⁻¹ e o conteúdo lipídico de 30,25; 29,43; 27,96 %, respectivamente (7).

Com relação aos teores proteicos, nos estudos de Kobayashi et al. (7) e Junttila et al. (8), estes variaram de 45 a 50%. As variações em relação a crescimento e produtividade da biomassa de microalgas se devem principalmente a influência da intensidade luminosa sobre o sistema de cultivo, o teor proteico se manteve similar aos encontrados por estes autores, no entanto, o teor lipídico determinado foi ligeiramente afetado, mas, o conteúdo lipídico para o gênero *Chlorella* é de 20 a 30%, sendo altamente dependente das condições e parâmetros de cultivo (7,32–37).

O perfil de ácidos graxos mostrou a presença de C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2 e C18:3, os principais ácidos graxos encontrados no biodiesel (28). Em menores quantidades C14:0, C24:0 e C24:1 não excederam a 2% cada. Não foi observada a presença de ácidos graxos incomuns como C15:0, C17:0 e C23:0. A composição em saturados (SFA), monoinsaturados (MFA) e poli-insaturados (PUFA) foi de 48,0%; 24,64% e 27,00%, respectivamente.

O perfil e a composição de ácidos graxos de microalgas são extremamente variáveis e dependentes das condições de cultivo, porém, há a prevalência das cadeias

carbônicas de C16 a C18 (38–42), similar as plantas superiores (43). As cadeias carbônicas C14 e C24 tipicamente não excedem a 2% cada uma e cadeias longas como C20, C22 e C24 e cadeias curtas, abaixo de C14, não são abundantes em microalgas de água doce, especialmente do gênero *Chlorella* (41,44,45).

A biomassa produzida a partir deste sistema de cultivo demonstrou potencial para ser utilizada como fonte de alimento devido ao seu alto teor proteico; o conteúdo lipídico e a composição de ácidos graxos faz desta biomassa uma importante matéria-prima para a produção de biocombustível.

3.3.2 Recuperação da biomassa

A recuperação da biomassa deste sistema de cultivo foi realizada por floculação com cloreto férrico em uma concentração de 0,75 g L⁻¹. Este processo de colheita foi escolhido a partir de pré-testes de floculação e sedimentação da biomassa e demonstrou ser rápido e eficiente (floculação com agitação manual por 1 min. e sedimentação e 10 min., com 80% de eficiência). A utilização de cloreto férrico para recuperação de biomassa de microalgas não afeta a qualidade e a quantidade extraída de lipídios (46–50).

Ao final do cultivo, os 18 L de cultura foram recuperados. O rendimento teórico de biomassa é de 23,43 ± 1,08 g, no entanto com a eficiência de recuperação esperada de 80%, alcançaria 18,72 ± 1,44 g. A recuperação real da biomassa foi de 18,25 ± 1,40g, indicando uma perda menor de 3% em relação ao esperado.

O conteúdo lipídico de toda essa biomassa alcança 3,65 ± 0,12 g de lipídios por fotobiorreator, utilizando o método convencional Bligh & Dyer (23). Estes solventes têm alta toxicidade e carcinogenicidade e a busca por solventes de menor riscos ambientais e laborais é valiosa para a extração de lipídios de microalgas em larga escala. O melhor método de extração de lipídios é específico para cada microalga e geralmente parte de uma combinação de métodos de rompimento celular assistidos por solventes orgânicos.

3.3.3 Propriedades do biodiesel

O rendimento de conversão à biodiesel foi de 62,35 ± 3,12%, avaliado em microescala. Este rendimento pode ser considerado regular, no entanto, ainda são necessários estudos para aumentar essa eficiência de conversão, tendo como objetivo deste trabalho avaliar potencial do biodiesel produzido por *Chlorella sorokiniana* em termos de ácidos graxos, propriedades e atendimento a regulamentações.

As propriedades do biodiesel foram estimadas empiricamente neste estudo tais como grau de instauração, número de cetano, índice de saponificação, índice de iodo, fator de cadeia longa saturada, ponto de entupimento de filtro a frio, ponto de nuvem, poder calorífico, viscosidade e densidade e estão demonstradas na Tabela 3.2. Esta estimativa permite uma compreensiva avaliação da qualidade do biodiesel (21,31).

Para avaliar a qualidade do biodiesel produzido por *Chlorella sorokiniana*, comparou-se com outras matrizes, tanto de microalgas e óleos amplamente utilizados para produção de biodiesel como soja, palma e sebo bovino; a Tabela 3.2 apresenta as características desses biodieseis.

Tabela 3.2 Propriedades de diferentes biodieseis

Propriedades	CS (este estudo)	CV (54)	CP (55)	NO (56)	SD (56)	SB (30)	PB (31)	BT (30)
SFA (%)	48,03	52,15	22,79	39,4	18,1	15	44,7	25,2
MUFA (%)	24,64	37,51	19,23	49,6	17,4	24,7	46,4	33,4
PUFA (%)	27,00	10,33	36,19	9,6	64,5	60,3	8,9	41,1
GI	78,64	58,17	91,60	-	-	-	64,2	-
NC	54,09	61,83	54,57	57,9	37,1	51,7	61	49,2
IS (mg g ⁻¹)	208,06	199,37	163,37	203	195,7	-	-	-
II g I ₂ (100 g) ⁻¹	81,95	52,63	111,75	80,6	183,7	-	57	-
FCLS	8,29	1,57	4,93	3,7	3,8	-	7,7	-
PEFF* (°C)	9,57	-10,81	-0,99	-4,8	-4,6	-	10	-
PN (°C)	15,88	-	3,51	-	-	0	-	3
PC (MJ kg ⁻¹)	39,18	-	-	39,8	40,2	39,79	-	39,77
V (mm ² s ⁻¹)	3,65	-	-	4,2	3,6	4,10	4,5	4,29
D (g cm ⁻³)	0,87	-	-	0,9	0,9	0,881	-	0,877

CS: *Chlorella sorokiniana* (este estudo), CV: *Chlorella vulgaris*, CP: *Chlorella protothecoides*, NO: *Nannochloopsis oculata*, SD: *Scenedesmus dimorphos* SB: biodiesel de óleo soja, PB: biodiesel de óleo palma, BT: sebo bovino, SFA: ácidos graxos saturados (%), MUFA: ácidos graxos monoinsaturados (%), PUFA: ácidos graxos poli-insaturados (%), GI: grau de instauração, IS: índice de saponificação, II: índice de iodo, NC: número de cetano, FCLS: fator de cadeia longa saturada, PEFF: ponto de entupimento de filtro à frio, PN: ponto de nuvem, PC: poder calorífico, V: viscosidade cinemática, D: densidade. PEFF * temperatura varia de acordo com região e estação do ano.

O conteúdo lipídico e a composição de ácidos graxos devem ser levados em conta na produção e comercialização de biodiesel de microalgas (3,51–53). Os ácidos graxos palmítico, esteárico, oleico e linoleico são reconhecidos com o os principais ácidos graxos contidos no biodiesel (27). O comprimento da cadeia carbônica e o número de duplas ligações no perfil de ácidos graxos e a quantidade de cada um, apresentam influência nas propriedades do biocombustível (3,27).

Diversos autores estudaram de espécies de microalgas e demonstraram a especificidade de cada uma para a produção de lipídios e ácidos graxos, resultando em diferentes características do biodiesel (54–56). Estes dados refletem as características

intrínsecas de cada espécie e as condições de cultivo afetam diretamente a qualidade do biocombustível (54). Com relação ao biodiesel de oleaginosas e sebo bovino, a pequena variação no perfil e composição de ácidos graxos traz uma uniformização a essas matrizes, visto que essas são amplamente utilizadas na produção em larga escala de biodiesel.

A caracterização do biodiesel de *Chlorella sorokiniana* apresenta todos os parâmetros adequados a regulamentação EN 14124 e ANP 45/2015, a exceção do PEFF. Isto demonstra a possibilidade de usar o perfil e a composição de ácidos graxos aliadas as equações empíricas para ter um prognóstico de características específicas do biodiesel desta microalga.

O Índice de Iodo (II) é um parâmetro indicativo do grau de insaturação no combustível (56), quanto mais ácidos graxos insaturados, mais elevado será o índice de iodo e mais facilmente a oxidação pode ocorrer (57-59). O II do biodiesel de *Chlorella sorokiniana* apresentou-se extremamente diferente dos biodiesel de soja (30,31) e de outras espécies de microalgas (54). Este moderado II pode ser atribuído a porcentagem de ácidos graxos saturados, especialmente o palmítico.

O número de cetano demonstra a habilidade do combustível em queimar rapidamente após ser injetado, quanto maior seu valor, melhor a qualidade de ignição deste combustível e menor a formação de fumaça branca (60). Ambas as regulamentações europeia e brasileira, exigem número de cetano de 51. O grau de saturação, o comprimento da cadeia carbônica, o peso molecular dos ácidos graxos e número de duplas ligações afetam diretamente o número de cetano. O NC de *Chlorella sorokiniana* apresentou-se similar a *Chlorella protothecoides* e *Chlorella emersonii* (55), e *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Desmodesmus brasiliensis* (54) e estão de acordo com as regulamentações internacionais.

A temperatura do ponto de entupimento de filtro a frio é a temperatura no qual o combustível sofre cristalização ou solidificação suficiente para entupir o filtro de combustível (56), já o ponto de nuvem é a temperatura na qual o combustível inicia o processo de solidificação (55). Esses parâmetros indicam que o biodiesel necessita suportar baixas temperaturas sem perder a sua natureza líquida (56,57) e é específico para cada país, região e estação do ano como apresentado nas regulamentações EN 14124 e ANP 45/2015, dependendo das condições climáticas do local, como exemplo na Espanha, o PEFF varia no verão (0°C) e no inverno (-10°C); no Brasil, para a Região Sul essa temperatura vai de 5 a 14°C; nos estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul e Minas

Gerais, varia de 8 a 14°C; Goiás, Mato Grosso, Espírito Santo e Rio de Janeiro é de 10 a 14°C e nos demais estados de 19°C. O biodiesel de *Chlorella sorokiniana* poderia ser utilizado em todas as regiões do país como B100, exceto na Região Sul, podendo ser aplicado em formas de blends de biodiesel. Estes parâmetros foram afetados pela elevada porcentagem de C16:0 e C18:0.

O poder calorífico representa o montante de calor liberado durante a combustão de 1 g de combustível para produzir CO₂ e H₂O a temperatura inicial, esta propriedade é comumente utilizada para definir o conteúdo energético de um combustível e sua eficiência (27,30,58). O poder calorífico dos biodieséis de óleo de soja, milho e algodão apresentam valores entre 39 e 41 MJ Kg⁻¹ (30) e de algumas microalgas entre 36 a 39 MJ Kg⁻¹ (56). O poder calorífico encontrado para biodiesel de *Chlorella sorokiniana* está nesta faixa, confirmando sua potencialidade para ser utilizado.

A densidade e a viscosidade de um combustível afetam o consumo, quanto maior a densidade e a viscosidade, maior será a massa de combustível injetada, o que aumentará o consumo de combustível específico (52). A viscosidade de biodiesel de microalgas varia entre 3,4 e 4,1 mm² s⁻¹ e a densidade de 0,9 g cm⁻³ (56). Estes valores são concordantes com os que foram obtidos neste estudo e atendem as normas EN 14124 e ANP 45 cuja viscosidade é de 3,5 a 5 mm² s⁻¹ e 3,0 a 6,0 mm² s⁻¹ e a densidade é de 0,86 a 0,9 g cm⁻³ e 0,85 a 0,9 g cm⁻³, respectivamente.

As propriedades do biodiesel de *Chlorella sorokiniana* de são adequadas à ANP 45 para serem utilizadas no Brasil como B100 em determinadas regiões, no entanto, devido às possibilidades de cristalização e solidificação, não é adequado para uso na Europa ou EUA, contudo, esta situação poderia ser solucionada utilizando mistura de outros biodieséis ou diesel em diferentes proporções.

Adaptar os métodos de extração de lipídios de microalgas que atendam a questões econômico-ambientais beneficiaria a produção de biodiesel de microalgas. Este tipo de biodiesel poderia ser usado como uma mistura com outro biodiesel para aumentar essas propriedades.

3.4 Conclusão

O cultivo de *Chlorella sorokiniana* mostrou taxas de crescimento e produtividade de biomassa promissoras. A composição da biomassa indicou aplicações distintas, como o uso em fonte nutricional, devido ao alto teor de proteínas, e uso de lipídios como biocombustível.

A extração de lipídios pelo método convencional Bligh & Dyer atingiu 20% e sua composição de ácidos graxos, fez desta biomassa fonte em potencial para produção de biodiesel. Este biodiesel exibiu propriedades consistentes com a Regulamentação Brasileira ANP 45/2014 em termos de número de cetano, índice de iodo, ponto de entupimento a frio, viscosidade e densidade. O biodiesel produzido a partir de *Chlorella sorokiniana* pode ser usada em países tropicais como B100 ou misturas como B20.

Referências

1. MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010.
2. SCOTT, S. A. et al. Biodiesel from algae: challenges and prospects. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 277–286, 2010.
3. CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294–306, 2007.
4. SAVAGE, P. E.; HESTEKIN, J. A. A perspective on algae, the environment, and energy. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 32, n. 4, p. 877–883, 2013.
5. LI, Y. et al. Potential lipid accumulation and growth characteristic of the green alga *Chlorella* with combination cultivation mode of nitrogen (N) and phosphorus (P). **Bioresource Technology**, v. 174C, p. 24–32, 2014.
6. LI, T. et al. High productivity cultivation of a heat-resistant microalga *Chlorella sorokiniana* for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 60–7, 2013.
7. KOBAYASHI, N. et al. Characterization of three *Chlorella sorokiniana* strains in anaerobic digested effluent from cattle manure. **Bioresource Technology**, v. 150, p. 377–386, 2013.
8. JUNTILA, D. J.; BAUTISTA, M. A.; MONOTILLA, W. Biomass and lipid production of a local isolate *Chlorella sorokiniana* under mixotrophic growth conditions. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 395–8, 2015.
9. COSTA, J. A. V. et al. Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, p. 429–436, 2006.
10. CHEN, C.-Y. et al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. **Bioresource technology**, v. 102, n. 1, p. 71–81, 2011.

11. MAKAREVICIENE, V. et al. Cultivation of microalgae *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. as a potential biofuel feedstock. **Environmental Research, Engineering and Management**, v. 57, n. 3, p. 21–27, 2011.
12. MARKOU, G.; NERANTZIS, E. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1532–42, 2013.
13. DERNER, R. B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959–1967, 2006.
14. WANG, S.-K. et al. Scale-up cultivation of *Chlorella ellipsoidea* from indoor to outdoor in bubble column bioreactors. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 117–122, 2014.
15. LEE, J.-Y. et al. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 575–577, 2010.
16. SILVA, G. DE S. et al. Oil extraction of microalgae for biodiesel production. **Espaço Energia**, n. 21, p. 12–19, 2014.
17. HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 709–732, 2012.
18. ONCEL, S. S. Microalgae for a macroenergy world. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 26, p. 241–264, 2013.
19. BERGMANN, J. C. et al. Biodiesel production in Brazil and alternative biomass feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 21, p. 411–420, 2013.
20. LAM, M. K.; LEE, K. T. Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 673–690, 2012.
21. TALEBI, A. F.; TABATABAEI, M.; CHISTI, Y. a User-friendly software for predicting the properties of prospective biodiesel. **Biofuel Research Journal**, v. 2, n. 2, p. 55–57, 2014.
22. AOAC, Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 18. ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC International, 2005.
23. BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **The National Research Council of Canada**, v. 37, n. 8, 1959.
24. LIU, J. et al. Direct transesterification of fresh microalgal cells. **Bioresource Technology**, v. 176, p. 284–287, 2015.

25. WAHLEN, B. D.; WILLIS, R. M.; SEEFELDT, L. C. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2724–30, 2011.
26. ASGHARPOUR, M.; RODGERS, B.; HESTEKIN, J. A. Eicosapentaenoic acid from *Porphyridium cruentum*: Increasing growth and productivity of microalgae for pharmaceutical products. **Energies**, v. 8, n. 9, p. 10487–10503, 2015.
27. KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 1059–1070, 2005.
28. KNOTHE, G. et al. **The Biodiesel Handbook**. AOCS Press, 2005. v. 2
29. SHEKH, A. Y. et al. Biomass and lipid enhancement in *Chlorella* sp. with emphasis on biodiesel quality assessment through detailed FAME signature. **Bioresource Technology**, v. 201, p. 276–286, 2015.
30. RAMÍREZ-VERDUZCO, L. F.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, J. E.; JARAMILLO-JACOB, A. D. R. Predicting cetane number, kinematic viscosity, density and higher heating value of biodiesel from its fatty acid methyl ester composition. **Fuel**, v. 91, n. 1, p. 102–111, 2012.
31. RAMOS, M. J. et al. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 261–8, 2009.
32. URSU, A. V. et al. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 134–139, 2014.
33. LI, T. et al. Regulation of starch and lipid accumulation in a microalga *Chlorella sorokiniana*. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 250–7, 2015.
34. MATOS, Â. P. et al. Teores de proteínas e lipídeos de *Chlorella* sp. cultivada em concentrado de dessalinização residual. **Ciência Rural**, v. 45, n. 2, p. 364–370, 2015.
35. FRUMENTO, D. et al. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in tubular photobioreactors: A lipid source for biodiesel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 120–125, 2013.
36. PIORRECK, M.; POHL, P. Formation of biomass, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids in green and blue-green algae during one growth phase. **Phytochemistry**, v. 23, n. 2, p. 217–223, 1984.
37. JI, Y. et al. Mixotrophic growth and biochemical analysis of *Chlorella vulgaris* cultivated with diluted monosodium glutamate wastewater. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 471–6, 2014.

38. STURM, B. S. M. et al. Controls of microalgal biomass and lipid production in municipal wastewater-fed bioreactors. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 31, n. 1, p. 10–16, 25 2012.
39. OH, S. H. et al. Lipid production in *Porphyridium cruentum* grown under different culture conditions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 108, n. 5, p. 429–34, 2009.
40. LIU, J.; VANORMELINGEN, P.; VYVERMAN, W. Fatty acid profiles of four filamentous green algae under varying culture conditions. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 1080–4, 2016.
41. PETKOV, G.; GARCIA, G. Which are fatty acids of the green alga *Chlorella*? **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 5, p. 281–285, 2007.
42. D'OCA, M. G. M. et al. Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 4, p. 1533–1538, 2011.
43. THOMPSON, G. A. Lipids and membrane function in green algae. **Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1302, n. 1, p. 17–45, 1996.
44. MAITY, J. P. et al. Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives – A mini review. **Energy**, v. 78, p. 104–113, 2014.
45. KANDA, H. et al. Lipids extracted from several species of natural blue-green microalgae by dimethyl ether: Extraction yield and properties. **Fuel**, v. 95, p. 88–92, 2012.
46. CHATSUNGNOEN, T.; CHISTI, Y. Harvesting microalgae by flocculation–sedimentation. **Algal Research**, v. 13, p. 271–283, 2016.
47. HARITH, Z. T. et al. Effect of different flocculants on the flocculation performance of microalgae, *Chaetoceros calcitrans*, cells. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 21, p. 5971–5978, 2009.
48. SALIM, S. et al. Harvesting of microalgae by bio-flocculation. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 5, p. 849–855, 2011.
49. BORGES, L. et al. Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 10, p. 4449–4454, 2011.
50. SOARES, A. T. et al. Comparative analysis of the fatty acid composition of microalgae obtained by different oil extraction methods and direct biomass transesterification. **BioEnergy Research**, v. 7, p. 1035–1044, 2014.

51. AHMAD, A. L. et al. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 1, p. 584–593, 2011.
52. PIYUSHI NAUTIYAL, K.A. SUBRAMANIAN, M. G. D. Production and characterization of biodiesel from algae. **Fuel Processing Technology**, v. 120, p. 79–88, 2014.
53. MENEZES, R. S. et al. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 10–15, 2013.
54. NASCIMENTO, I. A. et al. Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. **Bioenergy Research**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 2013.
55. TALEBI, A. F. et al. Fatty acids profiling: A selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. **Algal Research**, v. 2, n. 3, p. 258–267, 2013.
56. ISLAM, M. A. et al. Influence of fatty acid structure on fuel properties of algae derived biodiesel. **Procedia Engineering**, v. 56, p. 591–596, 2013.
57. CHUAH, L. F. et al. Influence of fatty acids content in non-edible oil for biodiesel properties. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 18, n. 2, p. 473–482, 2016.
58. KNOTHE, G. Analyzing biodiesel: Standards and other methods. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v. 83, p. 823–833, 2006.
59. MENEGAZZO, M. L. et al. Production of biodiesel via methyl and ethyl routes from Nile tilapia and hybrid Sorubim crude oils. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 3, n. 1, p. 150–154, 2015.
60. WANG, L. et al. Influence of fatty acid composition of woody biodiesel plants on the fuel properties. **Journal of Fuel Chemistry and Technology**, v. 40, n. 4, p. 397–404, 2012.
61. MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D. et al. Biodiesel production from wet microalgal biomass by direct transesterification. **Fuel**, v. 150, p. 14–20, 2015.

4 Artigo: Recuperação de biomassa de *Chlorella sorokiniana* através de diferentes floculantes

Resumo: As microalgas têm um alto potencial biotecnológico, no entanto, ainda apresentam um grande desafio na recuperação de sua biomassa com elevada eficiência, baixo custo e livres de contaminantes. O objetivo deste trabalho foi identificar o melhor sistema para floculação de *Chlorella sorokiniana*. Este trabalho avaliou a eficiência de recuperação da biomassa, comparando autofloculação, e os agentes químicos cloreto férrico, hidróxido de sódio, sulfato de alumínio e sulfato de zinco (todos em concentração de 0,25g L⁻¹). Após a escolha do melhor agente floculante, variou-se sua concentração para identificar a condição ótima através de agitação rápida seguida por sedimentação (0,25 a 1g L⁻¹). O sulfato de zinco não se apresentou como um floculante adequado para esta microalga, pois sua ação permitiu uma reduzida formação de flocos com eficiência menor de 40%. A autofloculação e o hidróxido de sódio proporcionaram eficiência regular (48,65%, 58,06%, respectivamente), podendo ser utilizados como primeiro passo para a recuperação de biomassa microalgal mas seu elevado volume de sedimentação pode proporcionar redispersão de flocos. O sulfato de alumínio exibiu resultados regulares (56,27%), no entanto, com longo tempo para que a floculação se tornasse eficiente. O cloreto férrico apresentou o melhor potencial para floculação e na análise de diferentes concentrações (0,25 a 1 g L⁻¹) demonstrou ser rápido e eficiente (80% de recuperação de biomassa em 10 min.) na concentração de 0,75 g L⁻¹. Os floculantes testados, a exceção do sulfato de zinco, podem ser utilizados como pré-tratamento para a recuperação da biomassa.

Palavras-chave: sais metálicos, floculação, microalgas

4.1 Introdução

Algumas espécies de microalgas estão sendo cultivadas comercialmente para produção de biomassa e têm sido utilizadas como matéria-prima e fonte de bioprodutos para aplicação em suplemento alimentar na piscicultura; na indústria de alimentos. Microalgas tais como *Chlorella* spp. e *Arthrospira* spp. são utilizadas para a adição em alimentos naturais ou alimentos saudáveis; *Dunaliella salina* para a obtenção de betacaroteno e *Haematococcus pluvialis*, astaxantina (1). O gênero *Chlorella* é considerado cosmopolita, constituída de células pequenas, unicelulares, com parede celular fina (1).

Para aproveitar o potencial das microalgas, são necessárias várias etapas após o seu cultivo, como colheita e secagem da biomassa. A dificuldade de separação da biomassa é agravada pela baixa concentração celular obtida nas culturas tradicionais, entre 0,1 e 3,0 g L⁻¹, pH do cultivo; fase de crescimento (2); tamanho microscópico das microalgas, entre 3 e 30 µm (3,4); carga superficial negativa, que previne ou inibe a

agregação das células; e a densidade semelhante a água, o que dificulta a sua sedimentação (5,6).

A colheita é o processo por onde as microalgas são separadas do seu meio através por etapas como centrifugação, filtração, floculação, seguido de secagem ou liofilização; e então a biomassa seca está apta para aproveitamento de bioprodutos (7–11). Este processo tem influência direta no custo e na qualidade dos produtos finais.

As etapas de filtração e sedimentação podem não ser satisfatórias, uma vez que são lentas, no entanto, podem ser aplicadas para microalgas de maior volume e tamanho celular (12,13). A etapa de flotação pode ser vista com bom potencial, porém as informações sobre sua viabilidade ainda são limitadas. A centrifugação é uma etapa de separação rápida, com alta demanda energética e possibilidade de rompimento celular pela ação da força gravitacional e de cisalhamento; a floculação é uma das técnicas que estão sendo mais utilizadas para a separação da biomassa de microalgas (2,4,8).

A floculação é uma técnica de colheita conveniente, pois permite a manipulação de grandes volumes de cultura, com baixos custos de energia (14). As células concentradas por floculação estão em melhor condição física do que aquelas recuperadas por centrifugação ou filtração, pois há a manutenção da integridade celular com a preservação dos metabolitos produzidos (14,15). A floculação ocorre quando as partículas menores se agregam em partículas maiores, através da interação dos flocculantes, e ao passar do tempo assentam, por sedimentação. Este processo tem sido amplamente utilizado na indústria para remover sólidos de suspensões tais como de tratamento de águas e efluentes (5,6,12,13).

Para a escolha do agente flocculante devem ser considerados seu grau de interferência no processamento e uso da biomassa obtida; a eficácia em baixa concentração e o seu custo. A compreensão dos mecanismos de floculação tem a intenção de uma utilização mais eficiente dos flocculantes através das interações entre o flocculante e as microalgas. Os mecanismos gerais para floculação de microalgas são semelhantes aos envolvidos na floculação para o tratamento de água (5,14,16). Em solução, células de microalgas são eletrostaticamente estabilizadas por cargas superficiais negativas na maioria dos níveis de pH. Para que a floculação ocorra, essas cargas têm que ser reduzidas ou neutralizadas, ocasionando a aglutinação das células, formando flocos que naturalmente sedimentam (5,14,16).

Na floculação induzida por sal metálico, uma alta dosagem de flocculante e um pH ácido podem ser necessários para alcançar um resultado satisfatório. Em alguns estudos

foi demonstrado que concentrações elevadas de flocculante podem resultar na contaminação da biomassa com alumínio ou ferro (2,17,18), porém alguns autores identificaram que esta contaminação dificilmente interfere os rendimentos de extração da fração lipídica e no perfil de ácidos graxos (14,19).

Diversos autores (14,18,20,21) ilustram que não há nenhum método simples e de baixo custo para ser utilizado em larga escala, e o desenvolvimento dos processos de separação da biomassa de microalgas e o aumento da eficiência são fundamentais para que seja alcançada a viabilidade econômica da produção de bioprodutos. A especificidade de cada microalga influencia diretamente no processo de recuperação da biomassa (6), tornando a busca por um sistema de recuperação com menor gasto energético e que atenda aos requisitos para o uso da biomassa com qualidade aceitável.

O objetivo deste trabalho foi determinar um método rápido, eficiente e de baixo custo para a recuperação de biomassa de *Chlorella sorokiniana* com base em etapas de floculação e sedimentação, através de agentes flocculantes como sulfato de zinco, hidróxido de sódio, cloreto férrico, sulfato de alumínio e autofloculação. Após a determinação do melhor flocculante, estudar em que concentração há o método em que há maior eficiência de separação de biomassa microalgal do meio.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Espécies e cultivo de microalga

A microalga *Chlorella sorokiniana* CTT 7727, foi cultivada em *Bold Basal Medium* (BBM), por 30 dias em fotobiorreatores de 9 L, com iluminação 12/12h claro/escuro e sistema de agitação e aeração vigorosa e ascendente de 3 L min⁻¹. A concentração final de biomassa seca do cultivo foi de 1,3 g L⁻¹ e pH de 10,2.

4.2.2 Sistema de floculação

O experimento de floculação foi realizado em tubos cilíndricos com volume de 1,0 L. Para a floculação utilizou-se cloreto férrico (Fe₃Cl), sulfato de alumínio (Al₂(SO₄)₃), sulfato de zinco (ZnSO₄) e hidróxido de sódio (NaOH) como agentes flocculantes a uma concentração de 0,25 g L⁻¹. Um tubo controle sem adição de flocculante foi avaliado (autofloculação). Após a adição do flocculante, promoveu-se uma agitação rápida e manual por 1 min. (22) e então sedimentação.

Um segundo experimento foi realizado com o flocculante que demonstrou a melhor eficiência de floculação em menor tempo, para determinar a concentração ótima de

floculação. As concentrações testadas foram de 0,25, 0,5, 0,75 e 1 g L⁻¹. Todos os experimentos foram conduzidos com o pH original da cultura.

4.2.3 Grau de floculação

O grau de floculação da suspensão celular foi observado por meio da determinação da relação entre a altura do sedimento ou espessado (He) e a altura da fase líquida (Hl). Essa relação He/Hl indica o volume de sedimentação (VS). Quanto maior for o volume de sedimentação (VS), maior é o grau de floculação da suspensão e mais facilmente é a sua redispersão (23).

Para determinar a altura do espessado (He) foram feitas marcações em cada tubo cilíndrico (provetas), em intervalos de 10 min. até completar 90 min. e após 24 h do início do experimento. O segundo experimento com o melhor flocculante, foi monitorado por 90 min. Estas marcações foram realizadas com base nos estudos de Morioka et al. (23) e Şirin et al. (24).

4.2.4 Avaliação de desempenho da floculação

A eficiência de floculação foi avaliada por comparação da densidade ótica OD₆₇₀ nm, na região superior do tubo cilíndrico, 4 cm abaixo da altura total. A absorbância foi mensurada em leitora de microplacas (Biochrom modelo Anthos Zenyth 200rt). A densidade ótica (OD) foi monitorada em intervalos de 10 até 90 min. e após 24 h do início do experimento.

A eficiência de floculação e clareamento do cultivo foi calculado conforme (25):

$$Eficiência (\%) = \frac{OD_i - OD_t}{OD_i} \times 100 \quad Eq.4.1$$

Onde OD_i é a densidade ótica no tempo zero (inicial) e OD_t é a densidade ótica no tempo t.

4.2.5 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística por meio de análise de variância e teste de Tukey, em nível de 5% de significância, para identificar diferenças entre as médias de cada tratamento.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Ação dos agentes floculantes

Os diferentes agentes floculantes agiram na floculação com alturas variadas de espessado (He) e eficiência, apresentando, ao decorrer e final da floculação, ainda uma coloração verde na fase líquida. A presença de coloração indica que há células de microalgas que não formaram flocos, ou seja, não participaram da reação. As causas da não formação de flocos se devem principalmente ao tipo, dose e concentração do agente floculante, decantação e pH. Estes fatores interferem ativamente na recuperação da biomassa (6,12,23).

Em estudo realizado com microalgas de água doce, o clareamento do meio ocorreu a partir de floculantes como sais metálicos e quitosana, entretanto, a influência do tipo e concentração da biomassa, afetou a eficiência de floculação através de observação visual do meio (12). A floculação para *Chlorella minutissima* com diversos sais metálicos (cloretados e sulfatados) em concentrações de 0 a 5 g L⁻¹ e tempo de sedimentação de 3 h apresenta nítido gradiente de coloração, com a formação de flocos e sua sedimentação (22).

A densidade celular é um dos fatores determinantes para a floculação, assim como pH, tipo de agente floculante, sua concentração e as condições de processo de floculação em si. Neste estudo, com concentração celular moderada (1,3 g L⁻¹) os flocos foram formados, mas alcançou rendimentos regulares de floculação, indicando que outros fatores influenciaram na recuperação da biomassa, além da densidade celular, e principalmente o pH de início. Diversos autores (6,12,15) consideram que a concentração celular antes de realizar a floculação deve ser a maior possível, pois aumenta a frequência no encontro das células, favorecendo a formação de flocos, conseqüentemente a eficiência. O valor de 0,5 g L⁻¹ de concentração celular antes da separação é o mínimo requerido, sendo que em valores inferiores, a eficiência diminui (12).

A floculação com Al₂(SO₄)₃ e FeCl₃ são amplamente realizadas devido as características inerentes a estes compostos como baixo custo, disponibilidade de mercado, segurança e baixo impacto ambiental (20), porém em elevadas concentrações o reuso do efluente seria inadequado (4,17).

4.3.2 Grau de floculação dos diferentes floculantes

A marcação mostra, em dado tempo, onde se encontra a sedimentação e em qual tempo ocorreu a estagnação total da descida dos flocos. O volume de sedimentação não

retrata a eficiência da floculação, mas a capacidade da floculação através da altura do espessado e a fase límpida (12,15,24).

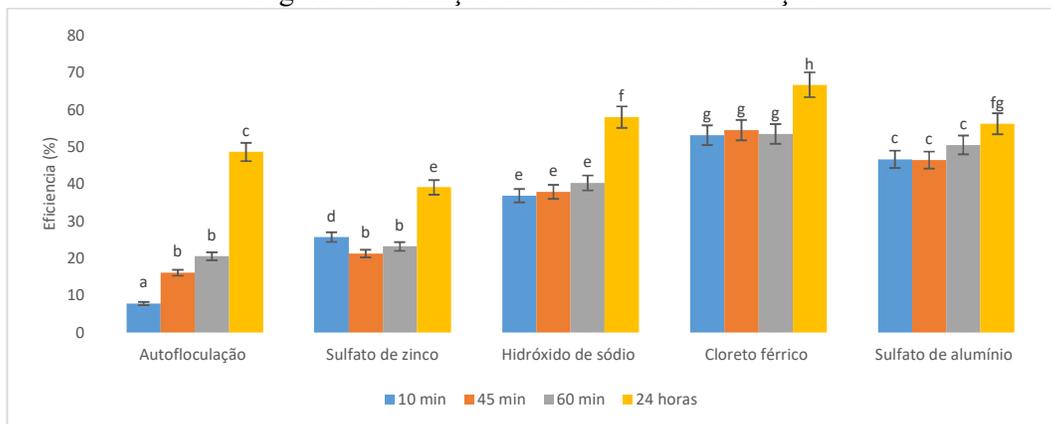
A marcação de descida estagnou no tempo 2 min. para a autofloculação. No ZnSO₄ e NaOH a estabilização ocorreu em 5 min., para o FeCl₃, o tempo para a estagnação foi de 45 min. e o Al₂(SO₄)₃ em 24 h, no entanto, sem alteração significativa no tempo de 85 min. até 24 h, porém para processos rápidos, o tempo de 60 min. indicou rendimentos regulares (entre 50 e 60%).

Quanto maior o volume de sedimentação (autofloculação – 0,93; ZnSO₄ – 0,91 e NaOH – 0,90) mais facilmente os flocos tendem a se redispersam no meio, quanto menor o volume de sedimentação, melhor a floculação se realizou (FeCl₃ – 0,09 e Al₂(SO₄)₃ – 0,06). O FeCl₃ e o Al₂(SO₄)₃ apresentaram os melhores desempenhos para a floculação além da possibilidade de redispersão dos flocos ser baixa, como verificado em outro estudo de floculação de *Chlorella* sp. cultivada em concentrado de dessalinização, utilizando a diferença de pH (8,5 a 11,0) e diferentes concentrações de cloreto de cálcio (0,6 a 3,4 g L⁻¹) que demonstrou, através do volume de sedimentação, uma variação de 0,044 a 0,147, sendo o processo de otimização da floculação com pH de 10 e concentração de cloreto de cálcio de 2,0 g L⁻¹ (23).

4.3.3 Recuperação e clareamento do meio

O monitoramento da densidade ótica através da formação da interface límpida retrata a diferença entre interface clarificada e espessado. A densidade ótica OD₆₇₀ mostra que os floculantes se comportaram de maneira diferentes, sendo que nos 10 min. iniciais a OD₆₇₀ caiu drasticamente para todos os floculantes, exceto para a autofloculação. Entre 60 min. e 24 h, a OD₆₇₀ teve uma queda menos acentuada do que aos 10 min., apresentando o tempo de detenção, influência no processo de sedimentação dos flocos e de células não agregadas. Vale destacar que houve a redispersão dos flocos quando se utilizou ZnSO₄, entre 10 e 60 min., os valores de OD₆₇₀ tiveram um crescimento, afetando o seu rendimento de floculação (Figura 4.1). Há diferença significativa entre todos os tempos quando realizada autofloculação. No entanto, não há diferença significativa, em todos os demais agentes floculantes, para os tempos de 10, 45 e 60 min. A diferença é significativa comparando tempo inicial e final (24 h) entre todos os métodos.

Figura 4.1 Variação da eficiência de floculação



Os floculantes analisados demonstraram potencial para serem utilizados como primeiro passo para a recuperação de biomassa microalgal, ou seja, um pré-tratamento, em especial o FeCl_3 , visto sua rapidez nos 10 min. iniciais (53,21%) sua floculação apresentou bons níveis de recuperação de células e clareamento do meio. E quando há tempo para a espera da sedimentação (24 h) e para redução de custos operacionais, os agentes NaOH e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (58,06 e 56,27% respectivamente) se mostraram adequados. No entanto a redispersão dos flocos para o NaOH deve ser levada em consideração quando da utilização deste floculante.

Os incrementos no rendimento da floculação comparados com os tempos iniciais, demonstram que a autofloculação e NaOH (40,84 e 21,18%) também tem potencial para serem utilizados como pré-tratamento para recuperação de biomassa. Contudo, para processos rápidos, o FeCl_3 se demonstra com menor incremento (0,31%) para 60 min.

Considerando os resultados obtidos para os tempos de 10 e 60 min. Sugere-se que para um processo em larga escala e até mesmo industrial, estes tempos trariam rendimentos satisfatórios ao processo de separação de água e biomassa microalgal. O FeCl_3 e $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ se mostram como adequados a esta separação, no entanto, o NaOH e a autofloculação, tem potencial para serem utilizados quando se há disponibilidade de tempo para realizar a sedimentação dos flocos. A concentração dos floculantes utilizada e o pH do meio revelou ser hábil como pré-tratamento para recuperação de biomassa.

Nota-se que a autofloculação, alcançou resultados regulares (quase 50% de eficiência). A autofloculação aconteceu, mesmo não tendo sido perceptível através das marcações de descida, o que foi demonstrado pela densidade óptica. Pelo elevado volume de sedimentação esta condição de autofloculação é facilmente redispersa. A

autofloculação para *Chlorella vulgaris* alcançou rendimentos entre 40-50% e considerável economia de energia (13). A autofloculação também pode ocorrer pela baixa atividade fotossintética e redução do suprimento de CO₂, tornando esta etapa economicamente viável, sendo necessário o estudo para cada espécie (7,23). A floculação de *Chlorella vulgaris* em pH entre 11,0 e 12,0 ocorreu naturalmente quando o suprimento de CO₂ foi interrompido, devido ao processo fotossintético e o pH elevado (6).

A floculação com ZnSO₄ não teve uma interação apropriada com as células, formando poucos flocos e com alto grau para redispersão no meio. No longo período de floculação observou-se que as células continuaram no meio, sendo este composto inibidor parcial da floculação e autofloculação, não alcançando 40% de eficiência. Em diversas concentrações de cloretos e sulfatos de zinco para floculação de *Chlorella minutissima* observou um comportamento com a formação de flocos, no entanto, aderidos a parede do tubo, tornando não confiável o monitoramento da densidade ótica e dos rendimentos de floculação (22).

Para a floculação com NaOH, os resultados foram regulares somente quando o tempo de detenção foi de 24 h. Resultados elevados de eficiência de floculação (95%) foram encontrados para *Chlorella vulgaris* através da elevação do pH em 11 e 12 em 60 min. (26), diferente da eficiência encontrada neste trabalho. Quando o aumento do pH foi seguido por adição de um floculante orgânico obteve-se sucesso de 80% em rendimento de colheita de microalgas (27). Estas diferenças retratam que o uso de NaOH para floculação pode ser um método simples, não tóxico para as células, porém deve ser testado para cada espécie de microalga. Outros autores (15,18,28) conseguiram performances altas, com mais de 90% de recuperação, com a utilização de pH levemente ácido.

O Al₂(SO₄)₃ alcançou resultados satisfatórios (56,27%) após 24 h de sedimentação, no entanto com diferença significativa de 60 min. a 24 h. A floculação com Al₂(SO₄)₃ tem alta eficiência quando ocorre em intervalo de pH entre 4,0 e 7,0 (29). Resultados acima de 80% foram alcançados com Al₂(SO₄)₃ para colheita de *P. tricornutum* quando o pH encontrava-se em 9, moderadamente básico (24). Quanto maior a concentração de Al₂(SO₄)₃, maior a eficiência de floculação para *S. limacinum*, com pH moderadamente básico entre 8 e 9 (17). Para *Chlorella minutissima* verificou rendimentos abaixo de 40% quando utilizada concentração de Al₂(SO₄)₃ de 0,25 g L⁻¹ e acima de 80% para concentrações deste agente em 0,5 a 1 g L⁻¹ (22).

A floculação com FeCl_3 se mostrou apropriada nos primeiros minutos e com o tempo de detenção em 24 h, apresentando resultados satisfatórios. A diferença significativa entre os rendimentos demonstra que o floculante continuou com seu efeito, ou seja, aglutinando as células de microalgas, fazendo com que sedimentassem, da mesma maneira que o $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$. A floculação de *Chlorella zofingiensis* foi afetada pela concentração microalgal do meio, concentração do FeCl_3 e pH, sendo a eficiência maior que 90% quando os parâmetros estavam em $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de concentração microalgal, concentração de 300 mg L^{-1} de FeCl_3 , e pH 6 (30). A floculação de *Chlorella* sp., alcançou resultados acima de 93% de eficiência com concentração de $0,122 \text{ g L}^{-1}$ e pH 6 (2).

Para estudo com diferentes microalgas, a concentração de floculante para a remoção de 95% das células aumentou linearmente com a concentração da biomassa no meio, no entanto, o $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ se apresentou como melhor floculante quando comparado ao FeCl_3 (20) para a maioria das espécies estudadas.

A não interferência de algum agente para aumento ou redução do pH, a concentração celular alta ($1,3 \text{ g L}^{-1}$) e a baixa concentração de floculante, tornaram razoáveis os rendimentos de floculação. A autofloculação e a floculação realizada com NaOH, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e FeCl_3 , podem influenciar a quantidade e qualidade de extração de lipídios (14,19,32–34) no entanto, a escolha do FeCl_3 como estudo em diversas concentrações busca encontrar a condição adequada de floculação sem afetar a extração lipídica com baixa possibilidade de alterações lipídicas (19).

A partir das análises apresentadas e rendimentos de floculação alcançados, tomase o FeCl_3 como melhor agente floculante para a recuperação da biomassa de *Chlorella sorokiniana* cultivada em *BBM*, com concentração celular de $1,3 \text{ g L}^{-1}$ e pH de 10,2 e com rendimentos satisfatórios com baixo tempo de detenção (10 min.).

4.3.4 Estudo de diferentes concentrações de FeCl_3 para floculação

As diferentes concentrações de FeCl_3 atuaram na floculação com bons rendimentos de espessado, entretanto, as concentrações de $0,25$ e $0,5 \text{ g L}^{-1}$ apresentaram, ao final da floculação, uma coloração verde, diferentemente das concentrações de $0,75$ e $1,0 \text{ g L}^{-1}$. Esta coloração indica que há células de microalgas que não formaram flocos e não participaram da reação com o agente floculante, mesmo após o tempo determinado da floculação e o não aumento do espessado. É nítida a concentração para o clareamento do meio nas concentrações de $0,75$ e $1,0 \text{ g L}^{-1}$. A concentração mais elevada tornou a fase

límpida com coloração levemente amarelada, típico para uso de elevadas concentrações de FeCl_3 (12,35).

4.3.5 Grau de floculação das concentrações de FeCl_3

O acompanhamento da descida dos flocos mostra o volume sedimentado num dado tempo e nos primeiros 10 min. há uma queda abrupta das marcações de descida. A marcação de descida estagnou no tempo de 35 min. para a concentração de 1 g L^{-1} , seguida de 45 min. para a concentração de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ e aos 55 min. para as demais concentrações. Os volumes de sedimentação não indicam que determinada concentração seja a mais eficiente, visto a coloração verde ao final, e sim a com menor possibilidade de dispersão dos flocos formados e sedimentados.

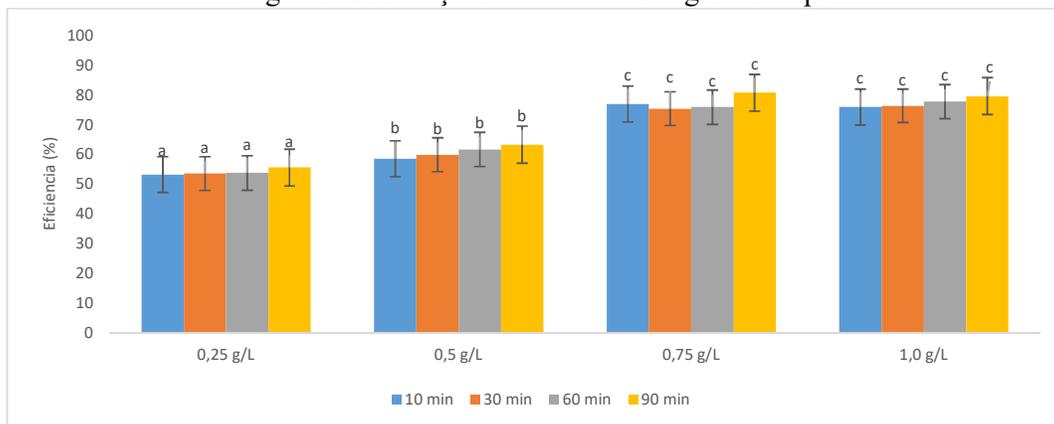
As concentrações mais baixas de FeCl_3 ($0,25$ e $0,5 \text{ g L}^{-1}$) apresentaram volume de sedimentação de $0,095$ e $1,412$ enquanto que as concentrações de $0,75$ e $1,0 \text{ g L}^{-1}$ estão em $0,165$ e $0,153$. A concentração de $0,75 \text{ g L}^{-1}$, mesmo com o maior volume de sedimentação, apresentou clareamento significativo do meio, através de observação visual, e baixa possibilidade de redispersão dos flocos, tornando a concentração de $0,75 \text{ g L}^{-1}$ adequada para floculação em escala piloto.

4.3.6 Recuperação e clareamento do meio

A densidade ótica OD_{670} mostra que os flocculantes se comportaram de maneira semelhante e que nos 10 min. iniciais, há uma queda exponencial para todas as concentrações (Figura 4.2). Esta queda era esperada para as maiores concentrações de FeCl_3 , pois a ação flocculante com uma dose maior, traria rendimentos maiores.

Como verificado nas marcações de descida que aos 60 min. todas as concentrações já estavam estagnadas, o mesmo ocorre para a eficiência de recuperação da biomassa. No entanto, não há variação significativa a partir de 10 min. para todas as concentrações de flocculante (Figura 4.2). A diferença significativa se apresenta em 2 blocos distintos, sendo concentrações de $0,25 \text{ g L}^{-1}$ e $0,5 \text{ g L}^{-1}$ e concentrações de $0,75 \text{ g L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g L}^{-1}$.

Figura 4.2 Variação eficiência ao longo do tempo



A avaliação do rendimento em 10 min. demonstra que este tempo traria rendimentos regulares e bons ao processo de separação de água e biomassa microalgal e evitaram-se possíveis perdas por redispersão dos flocos. Os rendimentos alcançados durante os processos de floculação, indicam que aos 10 min. a recuperação da biomassa é tão capaz quanto aos 60 e 90 min. nas concentrações de 0,75 e 1,0 g L⁻¹. Para a concentração de 0,75 g L⁻¹, o incremento em 90 min. não foi um ganho relevante, podendo a floculação terminar ao tempo de 10 min. As demais concentrações demonstraram um potencial regular de floculação, como um pré-tratamento para a colheita de microalgas.

Os rendimentos alcançados neste estudo ainda estão levemente abaixo dos mencionados por outros autores, este rendimento deve-se principalmente ao pH do meio que apresentou-se acima de 10 (12,25,36). O gradiente de concentração de diversos sais sulfatados e cloretados, entre 0,1 a 1,5 g L⁻¹, identificou o FeCl₃ como sendo um dos mais adequados para floculação de *Chlorella minutissima* com rendimento próximos a 80% tendo como melhor concentração em 0,50 g L⁻¹ e 300 min. de tempo de detenção (22), no entanto alcançou-se mais de 90% para floculação de *Chlorella* sp. com concentração de 0,122 g L⁻¹ de FeCl₃, o que tornou a coloração do meio de verde para marrom claro (2), divergente ao verificado neste estudo quando a concentração utilizada foi de 1,0 g L⁻¹ para tornar a fase límpida levemente amarelada.

Em estudo da relação da concentração de FeCl₃, a concentração celular (0,05 a 1,5 g L⁻¹) e pH levemente baixo, demonstrou-se que há 3 distintos comportamentos de floculação, onde é ineficaz em concentrações baixas; alta eficiência de floculação (> 90%) em concentrações moderadas de FeCl₃; e em maior concentrações de FeCl₃ floculação novamente é ineficaz (30), corroborando com o encontrado neste trabalho, baixa

eficiência com reduzida concentração de floculante (0,25 e 0,5 g L⁻¹), eficiência satisfatória e sem diferença significativa com 0,75 e 1,0 g L⁻¹.

Em comparação com diferentes concentrações de Al₂(SO₄)₃ e FeCl₃ para floculação de 5 espécies de microalgas foi identificado que estes agentes agiram de maneira distinta para cada espécie, e que para *Chlorella vulgaris*, o melhor floculante apresentado foi FeCl₃, no entanto, quando o incremento da concentração de FeCl₃ for maior do que possa ser a adsorção e solubilidade dos íons de Fe³⁺ na suspensão de células, a coloração marrom-amarelo tende a apresentar-se (20), da mesma maneira como ocorrido quando se floculou com concentração de 1,0 g L⁻¹ neste trabalho.

A seleção do floculante depende diretamente do uso para a biomassa de microalgas, se o objetivo é produção de pigmentos, agentes floculantes a base de ferro não são aconselhados (22), no entanto, para extração de óleos e biodiesel, pode-se escolher floculantes que tenham eficiência satisfatória (acima de 80%) e relativamente baratos e com baixa toxicidade (2,6,12,14,15,20). Para o reuso do efluente, as concentrações elevadas de cloreto férrico não seriam indicadas.

4.4 Conclusão

A recuperação da biomassa de *Chlorella sorokiniana* foi alcançada utilizando um método de floculação simples, com eficiência satisfatória, de baixo custo, que não tenha potencial de contaminação da biomassa e que possa ser extrapolado para escala piloto. Estes fatores são fundamentais para alcançar a viabilidade para seu uso em escala industrial quando o foco é a produção de biocombustíveis.

A adição de um floculante tornou mais rápido o processo de floculação quando comparados a autofloculação. Dentre os floculantes analisados, mostraram promissores o NaOH, FeCl₃ e Al₂(SO₄)₃. O FeCl₃ foi escolhido para análises das concentrações devido a sua rapidez na floculação, rendimentos satisfatórios nos primeiros 10 min.

A performance de recuperação de biomassa microalgal avaliada com concentrações distintas de FeCl₃, demonstrou eficiência adequada para concentrações elevadas de microalgas (1,3 g L⁻¹), a rapidez com que a concentração de 0,75 g L⁻¹ de FeCl₃ realizou a floculação nos primeiros 10 min., com desempenho satisfatório. Este processo pode ser utilizado como pré-tratamento para a colheita de microalgas.

Referências

1. BECKER, W. Microalgae in Human and Animal Nutrition. In: **Handbook of**

- Microalgal Culture**. London: Blackwell Science, 2003. p. 312–351.
2. UDOM, I. et al. Harvesting microalgae grown on wastewater. **Bioresource Technology**, v. 139, p. 101–6, 2013.
 3. DERNER, R. B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959–1967, 2006.
 4. MOLINA, G. E.; MEDINA, R. A.; GIMENEZ, G. A. **Recovery of Algal PUFAs**. London: Taylor & Francis, editor. Chemicals from microalgae. 1999.
 5. BANERJEE, C. et al. Study of algal biomass harvesting using cationic guar gum from the natural plant source as flocculant. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 675–81, 2013.
 6. VANDAMME, D. et al. Flocculation of microalgae using cationic starch. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 4, p. 525–530, 2010.
 7. BENEMANN, J. Microalgae for biofuels and animal feeds. **Energies**, v. 6, n. 11, p. 5869–5886, 2013.
 8. CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294–306, 2007.
 9. CHOIX, F. J.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Enhanced accumulation of starch and total carbohydrates in alginate-immobilized *Chlorella* spp. induced by *Azospirillum brasilense*: I. Autotrophic conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, n. 5, p. 294–9, 2012.
 10. RAWAT, I. et al. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. **Applied Energy**, v. 103, p. 444–467, 2013.
 11. RODRIGUES, D. B. et al. Bioactive pigments from microalgae *Phormidium autumnale*. **Food Research International**, v. 77, p. 273–279, 2015.
 12. GRANADOS, M. R. et al. Evaluation of flocculants for the recovery of freshwater microalgae. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 102–110, 2012.
 13. SALIM, S.; VERMUË, M. H.; WIJFFELS, R. H. Ratio between autoflocculating and target microalgae affects the energy-efficient harvesting by bio-flocculation. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 49–55, 2012.
 14. BORGES, L. et al. Effect of harvesting processes on the lipid yield and fatty acid profile of the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. **Aquaculture Reports**, v. 4, p. 164–168, 2016.
 15. HARITH, Z. T. et al. Effect of different flocculants on the flocculation performance of microalgae, *Chaetoceros calcitrans*, cells. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 21, p. 5971–5978, 2009.

16. BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010.
17. GERDE, J. A. et al. Microalgae flocculation: Impact of flocculant type, algae species and cell concentration. **Algal Research**, v. 3, p. 30–35, 2014.
18. SALIM, S. et al. Harvesting of microalgae by bio-flocculation. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 5, p. 849–855, 2011.
19. CHATSUNGNOEN, T.; CHISTI, Y. Oil production by six microalgae: impact of flocculants and drying on oil recovery from the biomass. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 5, p. 2697–2705, 2016a.
20. CHATSUNGNOEN, T.; CHISTI, Y. Harvesting microalgae by flocculation–sedimentation. **Algal Research**, v. 13, p. 271–283, 2016b.
21. LIU, J. et al. Freshwater microalgae harvested via flocculation induced by pH decrease. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 98, 2013.
22. PAPAZI, A.; MAKRIDIS, P.; DIVANACH, P. Harvesting *Chlorella minutissima* using cell coagulants. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 3, p. 349–355, 2010.
23. MORIOKA, L. R. I. et al. Flocculação de *Chlorella* sp. produzida em concentrado de dessalinização e estudo de método de extração de lipídios intracelulares. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 44–49, 2014.
24. ŞIRIN, S. et al. Harvesting the microalgae *Phaeodactylum tricorutum* with polyaluminum chloride, aluminium sulphate, chitosan and alkalinity-induced flocculation. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 5, p. 1067–1080, 2012.
25. RASHID, N.; REHMAN, S. U.; HAN, J.-I. Rapid harvesting of freshwater microalgae using chitosan. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 7, p. 1107–1110, 2013.
26. RAS, M. et al. Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 200–206, 2011.
27. KNUCKEY, R. M. et al. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. **Aquacultural Engineering**, v. 35, n. 3, p. 300–313, 2006.
28. CHEN, C.-Y. et al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 71–81, 2011.

29. K. WANG, L.; HUNG, Y.-T.; K. SHAMMAS, N. Shamma NK, Wang LK. Ozonation. **Physicochemical Treatment Processes**. v. 3, p. 315-357, 2005.
30. WYATT, N. B. et al. Critical conditions for ferric chloride-induced flocculation of freshwater algae. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 2, p. 493–501, 2012.
31. COWARD, T.; LEE, J. G. M.; CALDWELL, G. S. Harvesting microalgae by CTAB-aided foam flotation increases lipid recovery and improves fatty acid methyl ester characteristics. **Biomass and Bioenergy**, v. 67, p. 354–362, 2014.
32. AHMAD, A. L. et al. Comparison of harvesting methods for microalgae *Chlorella* sp. and its potential use as a biodiesel feedstock. **Environmental Technology**, v. 35, n. 17, p. 2244–2253, 2014.
33. BORGES, L. et al. Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 10, p. 4449–4454, 2011.
34. TAHER, H. et al. Effective extraction of microalgae lipids from wet biomass for biodiesel production. **Biomass and Bioenergy**, v. 66, p. 159–167, 2014.
35. PATIL, V.; TRAN, K. Q.; GISELRØD, H. R. Towards sustainable production of biofuels from microalgae **International Journal of Molecular Sciences**. v. 9, 1188–1195, 2008.

5 Artigo: Composição de FAME obtidos por diferentes métodos de extração de lipídios de *Chlorella sorokiniana*

Resumo

Chlorella sorokiniana é uma microalga com elevada taxa de crescimento e produção de lipídios. Neste estudo, os lipídios foram extraídos utilizando método de rompimento celular com ultrassom ou agitação assistidos por diferentes solventes. Quando houve o aumento da polaridade dos solventes, o conteúdo lipídico aumentou. Mistura de solventes (clorofórmio:metanol 2:1 v v-1) alcançou rendimentos entre 13 e 16%, o metanol entre 9-15%, seguido pelo etanol entre 5-13%, e clorofórmio e hexano não atingiram 5%. A polaridade do solvente afetou o teor lipídico, no entanto, os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) apresentaram perfil semelhantes, sem diferenças significativas para C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 e C18:3. A *Chlorella sorokiniana* apresenta uma predominância de lipídios polares em sua composição, e estes podem ser extraídos utilizando etanol com rendimentos regulares. A produtividade de extração de lipídios, menor do que $5 \text{ mg mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$, demonstrou que os métodos utilizados podem não ser adequados quando se pretende aumentar a produção de biodiesel. As composições dos ácidos graxos têm potencial para serem utilizados como blendas de biodiesel, devido ao seu elevado teor de ácidos graxos saturados.

Palavras-chave: rompimento celular, extração de lipídios, produtividade, microalgas, FAME, biodiesel.

5.1 Introdução

As microalgas podem ser utilizadas em muitas aplicações biotecnológicas, como tratamento de efluentes, extração de biomoléculas de alto valor agregado para a indústria farmacêutica e alimentícia e biocombustíveis (1–3). Os produtos de alto valor agregado são os ácidos graxos, inclusive essenciais, proteínas, pigmentos e vitaminas (3,4). A fração lipídica extraída das microalgas pode ser utilizada em distintos processos energéticos como biocombustível (5–7). As vantagens da produção de microalgas são significantes como elevada produtividade em biomassa, rápido crescimento e alta taxa de acúmulo de lipídios comparado com outras oleaginosas energéticas (1,6,8). Apesar das vantagens das microalgas, ainda continuam como uma cultura de alto custo.

Diversos estudos têm reportado que a quantidade e qualidade dos lipídios nas microalgas podem ser diferentes de acordo com as condições e parâmetros de cultivo (temperatura, intensidade luminosa, modo de operação e tipo de fotobiorreator) e características do meio de cultivo como concentração de carbono, nitrogênio, fosfato, ferro e salinidade (9,10). Os lipídios das microalgas podem ser divididos em dois tipos: polares, como fosfolipídios e glicolipídios; e os neutros/apolares que são mono, di-, triglicerídeos (11–13). A eficiência de extração dos lipídios, é altamente dependente da polaridade do solvente orgânico ou das misturas de solventes utilizadas (2,14,15).

Quando comparado métodos de extração de lipídios utilizando técnicas de ultrassom, moinho de bolas, agitação, equipamento Soxhlet, micro-ondas, combinadas com solventes (15–19) há uma diferença significativa entre os métodos de extração e solventes utilizados nos rendimentos lipídicos (14,20–22). O perfil de ácidos graxos (FAME) pode apresentar alterações baseados no método de extração de lipídios (23). Como parte do processo, a extração de lipídios continua sendo um desafio comercial a produção de óleo a partir das microalgas, mesmo com uma gama de processos de extração, descritos na literatura (14,18,20,24,25).

Apesar da ampla literatura com diferentes solventes e métodos de extração, há poucos estudos, e nenhum com *Chlorella sorokiniana*, comparando o tipo de solvente com método de extração. A utilização de microalgas para produzir biodiesel não compromete a produção de alimentos e outros produtos derivados das culturas. No entanto, essa abordagem ainda não é comercializada devido aos altos custos dos processos associados à demanda de energia para secagem e aos processos de extração dos lipídios e sua transesterificação (6,26). É importante selecionar um sistema de alta qualidade e com um perfil de ácidos graxos adequado, pois esses fatores determinarão a viabilidade de produção e a qualidade do biodiesel (27). Um sistema de alta qualidade deve ser menos impactante ao meio ambiente, rápido, e a extração de lipídios deve ser eficiente e manter a qualidade FAME. A produtividade lipídica da biomassa de microalgas tem sido calculada como a concentração lipídica, ao final do cultivo por volume de cultivo, sendo um importante parâmetro de comparação entre microalgas (4,9,10). Para se comparar sistemas de extração de lipídios, esta produtividade poderia ser associada a entradas e saídas do método.

C. sorokiniana é um microrganismo unicelular, fotossintético que pertence ao filo *Chlorophyta* e utiliza fonte luminosa e dióxido de carbono para crescimento e energia, com alta eficiência e produção de biomassa (28,29). De acordo com a Divisão de Okuda

para classificação de parede celular, microalgas como *Chlorophyta* possuem parede celular celulósica (8,30), este tipo de parede influencia na extração das biomoléculas como lipídios e carboidratos.

Este trabalho tem como objetivo avaliar a extração de lipídios de *Chlorella sorokiniana* através de ultrassom e agitação, ambos assistidos por diferentes solventes; a produtividade dos sistemas e a influência no perfil e composição de ácidos graxos para a produção de biodiesel.

5.2 Materiais e métodos

5.2.1 Preparação e tratamento da microalga

A microalga *Chlorella sorokiniana* CTT 7727, foi cultivada em meio Bold Basal (BBM). Este meio é composto por 0,25 g NaNO₃, 0,075 g MgSO₄.7H₂O, 0,025 g NaCl, 0,075 g K₂HPO₄.3H₂O, 0,175 g KH₂PO₄, 0,025 g CaCl₂.2H₂O, 0,00882 g ZnSO₄.7H₂O, 0,00144 g MnCl₂.4H₂O, 0,0007 g MoO₃, 0,00157 g CuSO₄.5H₂O, 0,00049 g Co(NO₃)₂.6H₂O, 0,01142 g H₃BO₃, 0,05 g EDTA-Na₂, 0,031 g KOH e 1 µL H₂SO₄ por litro.

O cultivo foi mantido em fotobiorreatores de 18 L por 30 dias em ambiente externo com média de temperatura no período de 26,28 ± 3,42°C e intensidade luminosa de 580 µmolesm⁻² s⁻¹ com fotoperíodo de 12/12 h claro/escuro. A aeração foi proporcionada por um sistema de compressor, sendo ascendente e vigorosa. O crescimento da microalga foi determinado pelo incremento da densidade celular e biomassa seca a cada 5 dias. A taxa de crescimento, produtividade e biomassa foram de 0,250 dia⁻¹, 0,0433 g L⁻¹ dia⁻¹ e 1,3 g L⁻¹, respectivamente. A recuperação da biomassa foi realizada por floculação com FeCl₃ em concentração de 0,75 g L⁻¹ seguida por sedimentação de 10 min e então filtrada e liofilizada. A biomassa foi armazenada em freezer (-4°C) até sua utilização.

5.2.2 Extração lipídica utilizando agitação ou banho de ultrassom

Em um tubo de ensaio adicionou-se 0,5 g de biomassa seca de microalgas e 9 mL de solvente (hexano, clorofórmio, etanol, metanol e mistura de clorofórmio:metanol 2:1 (v v-1)) a temperatura ambiente. A extração de lipídios ocorreu sobre agitação magnética (400 rpm) ou banho de ultrassom (42 kHz de frequência) para diferentes intervalos de tempo (30, 60 e 120 min.). As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 min e então a fase orgânica foi recolhida cautelosamente e o solvente evaporado em estufa de

circulação a 60°C; os lipídios foram avaliados gravimetricamente. A biomassa resultante foi re-extraída pelo mesmo processo. A Tabela 5.2 apresenta a extração de maneira sumarizada.

Tabela 5. 1 Sistema de extração

Microalga	Extração	Nº de extração	Tempo Total (h)	Solvente	Volume de solvente total (mL)	Biomassa inicial (g)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Ultrassom	2	1	H/C/E/M/CM (2:1 v v-1)	18	0,5
			2			
			4			
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Agitação	2	1	H/C/E/M/CM (2:1 v v-1)	18	0,5
			2			
			4			

Clorofórmio (C), Metanol (M), Etanol (E), Hexano (H)

5.2.3 Transesterificação

Os lipídios foram transesterificados através de catálise ácida, conforme metodologia estudada por Liu et al (31) e Wahlen; Willis e Seefeldt (32), com 5 mL de uma solução de 2% de ácido sulfúrico em metanol a 70°C por 1 h. Então, 2 mL de hexano e 0,75 mL de água deionizada foram adicionadas ao tubo e agitados por 30 s em vortex. Após a formação das 2 fases, a fase superior, hexânica contendo os FAMES, foi coletada e a transferida para um GC *vial* e análise em cromatógrafo gasoso acoplado com detector de ionização por chama (31,32). A catálise ácida foi escolhida pois transesterifica e esterifica, convertendo os ácidos graxos e ácidos graxos livre em ésteres metílicos visto que em microalgas os lipídios são caracterizados por elevado conteúdo de ácidos graxos livres sendo preferível utilizar esta metodologia (33).

5.2.4 Perfil e composição de ácidos graxos

A análise dos ácidos graxos foi realizada em cromatógrafo a gás equipado com auto amostrador e detector de ionização por chama (FID). A coluna capilar utilizada para separar os ácidos graxos foi Zebron™ZB-FFAP polar (30 m × 0,32 mm × 0,25 µm *film thickness*; Phenomenex, Torrance, CA, USA). O gás de arraste hélio correu a velocidade linear de 35cm s⁻¹. A programação de temperatura para a separação foi: temperatura de forno inicial da coluna em 150°C, permanecendo por 3 min., rampa de aquecimento a 1,5°C min⁻¹ até 240°C e sustentado por 15 min. O injetor (amostragem de 2 µL cada e relação de 10:1) e detector operaram a temperatura constante de 250°C durante 78 min. Os compostos foram identificados e quantificados comparando os tempos de retenção e

picos com os padrões *Marine Oil Test Mix* e FAME #13 (Restek Corp., Bellefonte, PA, USA) (34).

5.2.5 Produtividade dos métodos de extração lipídica

A avaliação de quanto foi produzido de lipídios (saída) pelo que foi gasto em volume e tempo (entrada) representa a produtividade do sistema de extração. A Equação 5.1 mostra essa produtividade de lipídios, onde a massa de lipídios em mg, solvente em mL e tempo em horas.

$$\text{Produtividade de lipídios} = \frac{\text{saída}}{\text{entrada}} = \frac{\text{massa de lipídios}}{(\text{volume de solvente} \times \text{tempo})} \quad (\text{Eq. 5.1})$$

5.2.6 Análise estatística

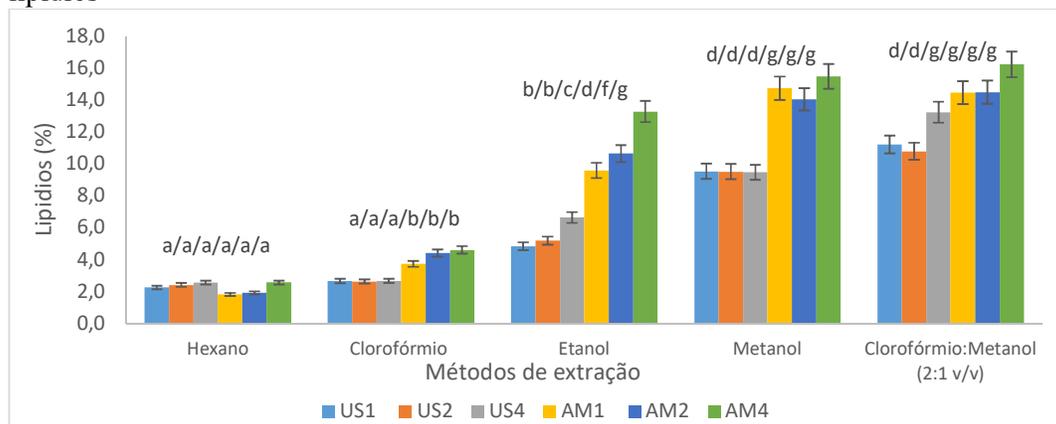
A diferença significativa entre métodos de extração, produtividade e composição de ácidos graxos foram determinadas utilizando ANOVA e testes de Tukey utilizando software estatístico SAS (Cary, NC).

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 O impacto da polaridade do solvente na extração lipídica

O conteúdo lipídico de microalgas, especificamente de *Chlorella*, tem sido reportado entre 20-30% em peso seco quando cultivada em condições controladas e suficiência de nutrientes (8,35–37). Neste estudo, a *Chlorella sorokiniana* cresceu em condições de suficiência de nutrientes, proporcionadas pelo meio BBM e o conteúdo lipídico foi de $20,07 \pm 1,53\%$. Em estudo com *Chlorella sorokiniana* cultivada em BBM, na presença de glicose e estresse de nitrogênio, o teor lipídico ficou entre 25 -30% (38). Esta diferença entre os rendimentos de lipídio se devem a intensidade luminosa e diferenças de temperatura (35,39–41). Quando os lipídios foram extraídos por diferentes métodos, combinando rompimento celular, solventes e tempos, os rendimentos, em todos os métodos e solventes apresentaram diferença e estão sumarizados na Figura 5.1.

Figura 5.1 Efeito do método de rompimento celular, solvente e tempo na extração de lipídios



Ultrassom (US) e Agitação (AM). Tempo total de extração: 1:1 h, 2: 2 h e 4:4 h.

Agitação promoveu melhor dispersão do solvente dentro das células quando comparada a cavitação formada pelo ultrassom. A seletividade dos solventes e o nível de convecção no meio mostrou ser influente na extração de lipídios. Para todos os grupos de solventes, exceto hexano, houve diferença significativa em ambos os métodos e para clorofórmio, utilizando ultrassom. No entanto quando o tempo de extração foi aumentado, somente para etanol, em ambos métodos de rompimento celular, e mistura de solvente com ultrassom apresentaram diferença significativa.

A utilização de uma mistura de solventes e agitação proporcionou o melhor desempenho de extração em lipídios totais, com uma variação entre 14 e 16%. O método utilizando mesma mistura assistindo o ultrassom, confirmou que este método é menos efetivo na extração de lipídios da *Chlorella sorokiniana* (11-13%), este efeito ocorreu para todos os solventes. Quando comparados a mistura de solventes e metanol, em ambos métodos, a diferença de desempenho de extração de lipídios totais alcançou 3,5%. Estes resultados mostram que a combinação de clorofórmio:metanol (2:1 v v⁻¹) e agitação, proporcionam um pequeno incremento na extração de lipídios e um médio incremento para ultrassom. A extração usando somente o metanol poderia ser adequada para liberar os lipídios deste tipo de microalga, contudo, esse solvente é considerado tóxicos e não renováveis.

Metanol é mais polar do que etanol e extraiu mais lipídios. Comparando agitação com metanol e etanol, uma significativa diferença foi notada, exceto para a extração com maior tempo (AM4). A utilização do etanol mostrou-se útil na extração de lipídios (13,27%) além do etanol ser renovável e menos tóxico que metanol.

Hexano e clorofórmio liberaram menos de 2,5 e 4,5% de lipídios em ambos métodos. Estes resultados indicam que o conteúdo neutro/apolar como triacilgliceróis, na amostra é baixo. O principal tipo de lipídios presente na biomassa de *Chlorella sorokiniana* é polar por natureza. Isto também foi observado em outras espécies de microalgas (20,42), onde obteve um incremento na extração de lipídios quando a polaridade do solvente aumentou. As polaridades dos solventes fizeram diferença em todas as extrações.

Nenhuma das extrações com ultrassom ou agitação, assistidos por solventes, alcançou o rendimento obtido pelo método convencional Bligh & Dyer para esta microalga ($20,07 \pm 1,53\%$). Isso demonstra mais uma vez a seletividade do solvente em liberar os lipídios intracelulares. O método convencional extrai todas as classes de lipídios da célula, no entanto para uma aplicação industrial, os custos de solvente e toxicidade seriam desvantajosos.

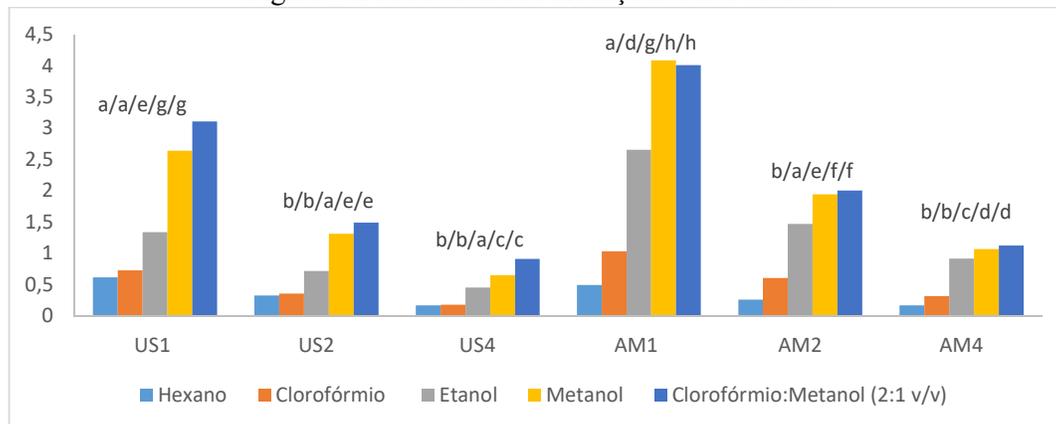
Usualmente, ao menos duas extrações têm sido reportadas como suficientes para extrair os lipídios das células (15,18,20,23,24). No entanto, alguns autores têm realizado 4 ou mais extrações (14,18) e esse processo envolve um aumento no uso de solvente e faz o processo ser demorado. O rendimento de lipídios está diretamente afetado pela escolha do solvente devido a classe de lipídios presente na biomassa de microalgas (18,19,23).

Diversos autores relatam diferentes métodos e solventes para a extração de lipídios de microalgas (19,20,43). EM um estudo com um pool de microalgas foram utilizados diferentes métodos de rompimento celular assistidos pela mistura de clorofórmio e metanol. O melhor resultado foi utilizando micro-ondas e o menos efetivo foi o ultrassom (19). Em outro estudo com diferentes métodos e solventes (convencional Bligh & Dyer, hexano e hexano:etanol 3:1) para extração de lipídios de *Tetraselmis* sp. foi observado significativa diferença entre todos os sistemas (15). Para a extração de lipídios com agitação e diferentes solventes de *Chlorella pyrenoidosa*, a mistura clorofórmio:metanol 2:1 ($v v^{-1}$) apresentou a melhor extração lipídica, seguida por metanol, etanol, clorofórmio e hexano, no entanto o perfil e composição de ácidos graxos, foi observado uma leve diferença para cada solvente (20). Todos esses resultados são similares aos encontrados neste estudo, onde a combinação de ultrassom e solventes (polar e apolar) demonstrou ser um método inadequado para a extração de lipídios desta microalga e os solventes polares demonstraram melhores resultados do que os apolares, com diferença significativa.

5.3.2 Produtividade de lipídios nos sistemas de extração

A produtividade dos métodos de extração de lipídios está apresentada na Figura 5.2. Um incremento no tempo de extração não garantiu um incremento significativo na produtividade lipídica, pelo contrário, levou a uma redução na produtividade. Neste estudo, a produtividade foi influenciada pelo número de extrações, onde, menos tempo e solvente induziriam a maior produtividade.

Figura 5.2 Produtividade alcançada neste estudo.



Ultrassom (US) e Agitação (AM). Tempo total de extração: 1:1 h, 2: 2 h e 4:4 h.

Para solventes polares e a mistura de solventes, as maiores produtividades foram com agitação e no menor tempo. O tempo reduzido traria menos custos operacionais e de suprimentos. Metanol e mistura de solventes apresentaram comportamento semelhante. Etanol mostrou diferença significativa comparado ao metanol e mistura de solventes no menor tempo. Para os solventes apolares não houve diferença significativa entre as condições para o mesmo método de rompimento celular. Nenhum dos sistemas alcançou mais de $4,5 \text{ mg mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, no entanto para o método convencional, a produtividade ultrapassou $25 \text{ mg mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

A produtividade alcançada neste estudo foi comparada com as extrações de diferentes autores. A Tabela 5.1 apresenta os rendimentos lipídicos e produtividade para diferentes gêneros de *Chlorella*.

Tabela 5. 2 Métodos de extração de lipídios para o gênero *Chlorella*.

Microalga	Sistema de extração	Número de extrações	Tempo total (h)	Solvente	Volume de solvente (mL)	Biomassa inicial (g)	Rendimento de lipídios (%)	Produtividade (mg mL ⁻¹ h ⁻¹)	Ref.
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Agitação	1	2	C:M (2:1)	6	1	20,2	16,83	(20)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Agitação	1	2	M	6	1	8,3	6,92	(20)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Agitação	1	2	E	6	1	7,2	6,00	(20)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Agitação	1	2	C	6	1	9,1	7,58	(20)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Agitação	1	2	H	6	1	1,7	1,42	(20)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Ultrassom	1	1	BeD	67,5	5	52,5	38,89	(24)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Ultrassom	1	0,5	M:D (1:2)	75	5	10,9	14,53	(24)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Ultrassom	1	0,5	C:M (2:1)	75	5	16,1	21,47	(24)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Ultrassom	1	1	H:I (3:2)	50	5	2,2	2,20	(24)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Soxhlet	1	8	A	110	5	1,8	0,10	(24)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Vórtex	3	0,05	C:M (1:1)	18	0,1	~24	26,67	(18)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Vórtex	3	0,05	C:M (2:1)	18	0,1	~13	14,44	(18)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Vórtex	3	0,05	D:E (1:1)	18	0,1	~10	11,11	(18)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Vórtex	3	0,05	H:I (3:2)	18	0,1	~18	20,00	(18)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Vórtex	3	0,05	A	18	0,1	~13	14,44	(18)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Vórtex	3	0,05	DE	18	0,1	~3,5	3,89	(18)
<i>Chlorella</i> sp.	Agitação	2	3,016	H	24	1	~3,2	0,44	(23)
<i>Chlorella</i> sp.	Agitação	2	3,016	H:E (4:1)	24	1	~4,3	0,59	(23)
<i>Chlorella</i> sp.	Agitação	2	3,016	C:M (2:1)	24	1	~6,7	0,93	(23)
<i>Chlorella</i> sp.	Agitação	2	3,016	BeD	24	1	~2,7	0,37	(23)
<i>Chlorella</i> sp.	Agitação	2	3,016	D:M (2:1)	24	1	~12	1,66	(23)

Clorofórmio (C), Metanol (M), Etanol (E), Hexano (H), Isopropanol (I), Dietileter (DE), Bligh & Dyer (BeD). Rendimentos de lipídios em termos de porcentagem em base seca. ~ dados aproximados, obtidos de figura/gráfico.

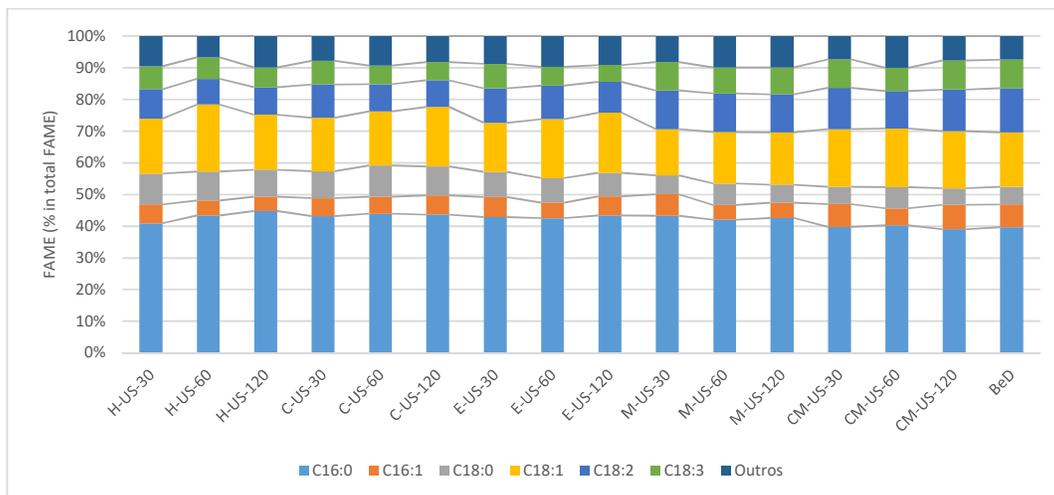
As extrações realizadas com 6 mL de solventes e 1 g de biomassa (20) deram melhores resultados com os encontrados neste estudo. Comparando o estudo de Oca et al. (20) e os dados deste estudo, volume e tempo foram 3 e 2 vezes mais e a biomassa 2 vezes menos, e a produtividade foi significativamente afetada. Quanto a produtividade de lipídios de *Chlorella* sp., extraídos por diferentes solventes por Soares et al. (23), os valores ficaram abaixo de $1 \text{ mg mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ exceto para a extração com diclorometano:metanol. Em comparação com hexano, esses dados são minimamente superiores aos deste trabalho. No entanto para a mistura de solventes, os dados deste estudo são moderadamente superiores as extrações por hexano e clorofórmio.

Alta produtividade (18,20,24) foi alcançada quando utilizado mistura de solvente (polar e apolar) ou volume de solvente e tempo de extração foram reduzidos. A produtividade pode ser um importante parâmetro para verificar a eficiência de produção de lipídios em um sistema de extração, levando em conta entradas e saídas do sistema.

5.3.3 Perfil e composição de ácidos graxos

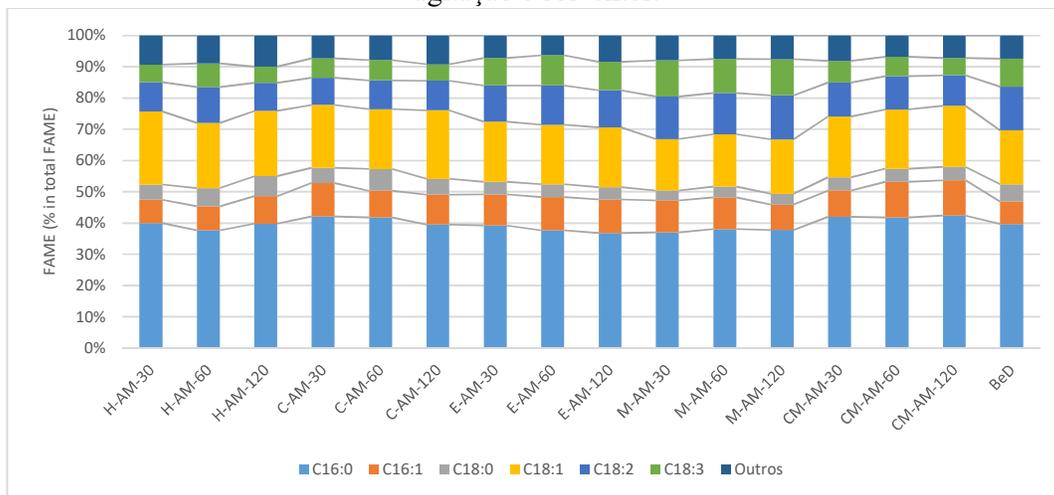
A composição de ácidos graxos desta microalga foi determinada através de análises cromatográficas. As frações em massa foram normalizadas de acordo com o total de ácidos graxos encontrados nas análises. Neste estudo, ácidos palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3) foram dominantes (Figura 4.4). Não foram encontrados ácidos graxos incomuns como C15:0, C17:0 e C23:0. Não houve diferença significativa de composição para o mesmo método e os diferentes solventes. A Figura 5.3 exibe a variação de cada ácido graxo nos sistemas de extração de lipídios utilizando ultrassom, em termos de porcentagem, e a linha mostra a oscilação, enquanto a Figura 5.4 mostra a comparação do perfil e composição de ácidos graxos obtidos pela extração por agitação e solventes.

Figura 5.3 Comparação do perfil e composição de ácidos graxos para extração por ultrassom e solventes.



Clorofórmio (C), Metanol (M), Etanol (E), Hexano (H); US: Ultrassom; AM: Agitação; Tempo total de extração: 1:1 h, 2: 2 h e 4:4 h; FAME: Ésteres metílicos de ácidos graxos; C16:0 Ácido palmítico; C16:1: ácido palmitoleico; C18:0: Ácido esteárico; C18:1: Ácido oleico; C18:2: Ácido linoleico; C18:3: Ácido α -linolênico

Figura 5.4 Comparação do perfil e composição de ácidos graxos para extração por agitação e solventes.



Clorofórmio (C), Metanol (M), Etanol (E), Hexano (H); US: Ultrassom; AM: Agitação; Tempo total de extração: 1:1 h, 2: 2 h e 4:4 h; FAME: Ésteres metílicos de ácidos graxos; C16:0 Ácido palmítico; C16:1: ácido palmitoleico; C18:0: Ácido esteárico; C18:1: Ácido oleico; C18:2: Ácido linoleico; C18:3: Ácido α -linolênico

Há a presença de grandes quantidades nos sistemas de extração por agitação (AM) de C16:0 variando entre 36,99-42,12%, C16:1 de 7,61-11,34%, C18:0 de 3,44-6,42%, C18:1 entre 16,69-21,91%, C18:2 de 8,99-13,59% e C18:3 de 5,31-11,52%. Nos sistemas de extração por ultrassom, as variações foram em C16:1 de 4,63-7,21%, C18:0 de 5,49-

9,69%, C18:1 de 15,45-18,92%, C18:2 de 8,47-12,97% e C18:3 de 5,74-9,03%. Os ácidos C14:0 e C24:0 estavam presentes em pequenas quantidades em todas as amostras, variando de 1,45 a 2,15% e 0,04 a 2,24%, respectivamente em ambos os sistemas (AM e US).

A diferença está relacionada ao método de rompimento celular. A agitação pode extrair mais lipídios e a composição de ácidos graxos foi levemente maior para C16:1, C18:1, C18:2 e C18:3, no entanto, não se observou diferença significativa entre os métodos em termos de composição de ácidos graxos.

O método convencional Bligh & Dyer mostrou o mesmo perfil de ácidos graxos, com menores diferenças em porcentagem de FAME. Neste estudo foi demonstrado que o perfil e quantificação mudaram, no entanto em porcentagens insignificantes para todos os sistemas. Esta mesma situação, baixa variação no perfil e composição de ácidos graxos, foi reportada para *Chlorella pyrenoidosa* e *Chlorella* sp. (20,44).

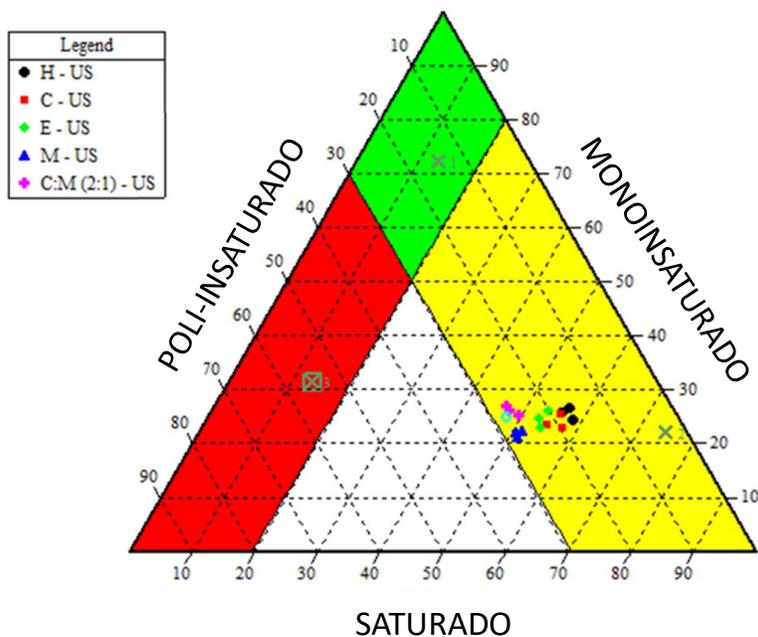
De acordo com a literatura, as porcentagens de C14:0 e C24:0, para microalgas de água doce, não excedem 2% cada (20,44). Os ácidos C16:2 e C16:3, em todos os métodos e solventes, apresentaram porcentagem menor de que 3%. Outros ácidos graxos estavam presentes em menores quantidades como C14:1, C14:2, C14:3, C20:0, C20:1, C22:0, C22:1, C24:0 e C24:1, mas não excederam a 10% no total. Ácidos graxos com longa cadeia carbônica como C20, C22 e C24 não são abundantes em microalgas de água doce como *Chlorella* (44–46). Os ácidos graxos mais comuns tem comprimento de cadeia entre C16 e C18 (41), similar aos das plantas superiores (12). As algas sintetizam ácidos graxos como blocos de construção para a formação dos vários tipos de lipídios na célula (41).

Tipicamente ácidos graxos saturados (SFA) e monoinsaturados (MUFA) são predominante em diversas microalgas estudadas (12,47). Neste estudo, ácidos graxos saturados tem maior proporção do que mono e poli-insaturados em todos os sistemas de extração. A composição em termos de ácidos graxos saturados, mono e poli-insaturados está demonstrada em gráfico ternário, nas Figuras 5.5 e 5.6. Este tipo de gráfico demonstra, simultaneamente, as três concentrações (SFA, MUFA e PUFA) que somam 100% e apresentam distintas regiões. A concentração adequada onde o as características do biodiesel tais como número de cetano, índice de iodo e ponto de entupimento de filtro a frio são satisfeitas está representada na área verde (#1). Esta área e caracterizada por uma elevada concentração de ácidos graxos monoinsaturados. A área que satisfaz os limites para número de cetano e índice de iodo está identificado na área amarela (#2) tendo um baixo conteúdo de poli-insaturados e elevado conteúdo de saturados. A área que satisfaz

apenas o ponto de entupimento de filtro a frio, a área em vermelho (#3), tendo baixo conteúdo de saturados.

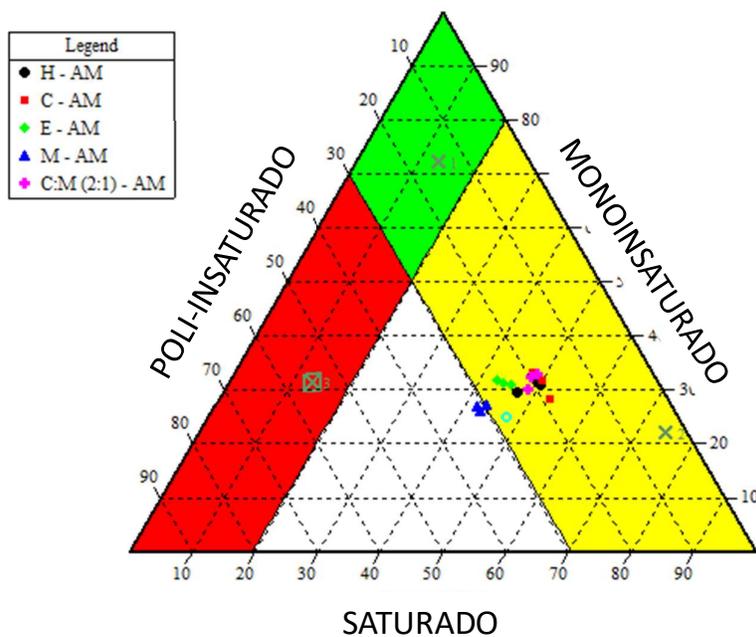
Todos os sistemas de extração de lipídios estão incluídos nesta área e bordas de área Os métodos de extração de lipídios garantiram um perfil e composição similar, porem é possível verificar a pequena variação entre os métodos de ultrassom e agitação. Diversos estudos com *Chlorella* tem demonstrados resultados diferentes em termos de composição de SFA, MUFA e PUFA (13,19,20,44).

Figura 5.5 Composição em gráfico ternário de saturados, mono- e poli-insaturados para extração por ultrassom



Clorofórmio (C), Metanol (M), Etanol (E), Hexano (H); US: Ultrassom; AM: Agitação; Tempo total de extração: 1:1 h, 2: 2 h e 4:4 h.

Figura 5.6 Composição em gráfico ternário de saturados, mono- e poli-insaturados para extração por agitação



Clorofórmio (C), Metanol (M), Etanol (E), Hexano (H); US: Ultrassom; AM: Agitação; Tempo total de extração: 1:1 h, 2: 2 h e 4:4 h.

Além do teor de lipídios, o perfil e composição de FAMES devem ser levados em consideração para a comercialização de biodiesel de microalgas. Comumente, os ácidos palmítico, esteárico, oleico e linolênico foram reconhecidos como os ácidos graxos mais comuns contidos no biodiesel (27). O comprimento da cadeia de carbono e o número de ligações duplas, a quantidade de cada FAME e sua composição detalhada são algumas das principais propriedades que influenciam a qualidade do biodiesel (6,27).

Os ácidos graxos de cadeia saturada como C14:0, C16:0 e C18:0 são predispostos a solidificação a baixas temperaturas, mas isso não elimina a possibilidade de sua utilização para produção de biodiesel, no entanto, apenas os limita para uso em sua forma pura à países de clima tropical (7,27). O número de cetano, que é um indicador da eficiência de ignição e queima do combustível, tende a ser melhor com o incremento do grau de saturação do biodiesel (7,48,49). Esses tipos de ácidos graxos tem a vantagem de promover uma maior estabilidade a oxidação. A estabilidade a oxidação é maior na presença de cadeia de ácidos graxos insaturados.

Em estudo de como a composição de ácidos graxos em matérias-primas afetam as propriedades do biodiesel foi identificado que alguns parâmetros são críticos como número de cetano, índice de iodo e ponto de entupimento de filtro a frio, estes estão correlacionados ao grau de saturação e ao fator de comprimento de cadeia saturada (50). Um gráfico ternário, composto de saturados, mono- e poli-insaturados aliados a essas condições, apresenta diferentes regiões e a qualidade do biodiesel pode ser predita para a regulamentação EN14214 (50).

A presença dos métodos de extração de lipídios se encontrarem na área amarela, #2, indica que este biodiesel atende os parâmetros de número de cetano e índice de iodo. Estes resultados não excluem essas matérias primas para a produção de biodiesel. Ao invés disso, este tipo de biodiesel poderia ser utilizado como blendas em outros biodieseis para incrementar suas propriedades. Apesar das diferenças no rendimento lipídico total, o perfil FAME demonstrado é semelhante. Entretanto, a produtividade dos lipídios foi menor que a de outros autores (13,18,20,24).

5.4 Conclusão

Diversos fatores estão relacionados a composição de FAME na microalga. Esses fatores vão desde a forma de cultivo até os métodos de extração de lipídios. Os fatores

que afetam a extração de lipídios da biomassa de *Chlorella sorokiniana* foram estudados em detalhes. A Agitação, com todos os solventes e tempos, proporcionou melhores resultados do que o ultrassom.

Os diferentes solventes utilizados para extrair os lipídios de *Chlorella sorokiniana* apresentaram rendimentos diferentes. Foi observado que a mistura de solventes clorofórmio:metanol 2:1 (v v⁻¹) produziu os melhores resultados para a extração lipídica e o hexano os menores rendimentos. Estes resultados mostram que os lipídios nesta biomassa de microalgas são constituídos principalmente por lipídios polares. Este estudo sugere que o etanol poderia ser um bom solvente extrator de lipídios, no entanto, quando a produtividade foi calculada para todos os sistemas de solventes, notou-se que estes métodos (em termos de volume e tempo) foram ineficazes para a extração de lipídios. Este parâmetro afeta diretamente a aplicação em escala industrial.

Através da comparação dos métodos de extração, este estudo destaca o viés na recuperação de lipídios microalgal, demonstrada por pequenas diferenças nas análises do perfil FAME. Como consequência, diferentes métodos de extração lipídica de microalgas podem resultar em estimativas variadas dos bioprodutos. Ao todo, o perfil FAME é predominantemente, C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 e C18:3. Quando comparado com o método convencional Bligh & Dyer, o perfil FAME apresenta os mesmos ácidos graxos.

O etanol é apresentado como um solvente extrator adequado com rendimentos satisfatórios para a extração de lipídios e produção de biodiesel, dada sua composição em relação aos ácidos graxos, porém com baixa produtividade. O biodiesel produzido pelos diferentes métodos pode ser utilizado como blendas de biodiesel em países de clima frio ou como B100 em países de clima tropical.

Referências

1. BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae — A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010.
2. LAM, M. K.; LEE, K. T. Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 673–90, 2012.
3. MARKOU, G.; NERANTZIS, E. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1532–42, 2013.

4. PIORRECK, M.; POHL, P. Formation of biomass, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids in green and blue-green algae during one growth phase. **Phytochemistry**, v. 23, n. 2, p. 217–223, 1984.
5. MENEZES, R. S. et al. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 10–15, 2013.
6. CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294–306, 2007.
7. SILVA, G. DE S. et al. Oil extraction of microalgae for biodiesel production. **Espaço Energia**, n. 21, p. 12–19, 2014.
8. RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Culture Biotechnology and Applied Phycology. **Blackwell Science**, 2004.
9. HEREDIA-ARROYO, T. et al. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 5, p. 2245–2253, 2011.
10. FRUMENTO, D. et al. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in tubular photobioreactors: A lipid source for biodiesel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 120–125, 2013.
11. CHRISTIE, W. W. **Lipid Analysis** : Isolation , Separation , Identification and. p. 72–73, 2004.
12. THOMPSON, G. A. Lipids and membrane function in green algae. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1302, n. 1, p. 17–45, 1996.
13. RYCKEBOSCH, E.; BRUNEEL, C.; et al. Influence of extraction solvent system on extractability of lipid components from different microalgae species. **Algal Research**, v. 3, p. 36–43, 2014.
14. RYCKEBOSCH, E.; BERMÚDEZ, S. P. C.; et al. Influence of extraction solvent system on the extractability of lipid components from the biomass of *Nannochloropsis gaditana*. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 3, p. 1501–1510, 2014.
15. LI, Y. et al. A comparative study: the impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research. **Microbial cell factories**, v. 13, n. 1, p. 14, 2014.
16. ADAM, F. et al. “Solvent-free” ultrasound-assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: a green, clean and scalable process. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 457–65, 2012.
17. NATARAJAN, R. et al. Lipid releasing characteristics of microalgae species

- through continuous ultrasonication. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 7–11, 2014.
18. RYCKEBOSCH, E.; MUYLAERT, K.; FOUBERT, I. Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 2, p. 189–198, 2012.
 19. FLORENTINO DE SOUZA SILVA, A. P. et al. Comparison of pretreatment methods for total lipids extraction from mixed microalgae. **Renewable Energy**, v. 63, p. 762–766, 2014.
 20. D'OCA, M. G. M. et al. Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 4, p. 1533–1538, 2011.
 21. MORIOKA, L. R. I. et al. Flocculação de *Chlorella sp.* produzida em concentrado de dessalinização e estudo de método de extração de lipídios intracelulares. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 44–49, 2014.
 22. LEE, J.-Y. et al. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1 SUPPL., 2010.
 23. SOARES, A. T. et al. Comparative Analysis of the Fatty Acid Composition of Microalgae Obtained by Different Oil Extraction Methods and Direct Biomass Transesterification. **BioEnergy Research**, 2014.
 24. ARAUJO, G. S et al. Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: prospection of the optimal extraction method. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 20, n. 1, p. 95–8, 2013.
 25. HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. **Biotechnology Advances**, 2012.
 26. TAHER, H. et al. Effective extraction of microalgae lipids from wet biomass for biodiesel production. **Biomass and Bioenergy**, v. 66, p. 159–167, 2014.
 27. KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 1059– 1070, 2005.
 28. CHEN, C.-Y. et al. Enhancing microalgal oil/lipid production from *Chlorella sorokiniana* CY1 using deep-sea water supplemented cultivation medium. **Biochemical Engineering Journal**, v. 77, p. 74–81, 2013.
 29. LI, T. et al. High productivity cultivation of a heat-resistant microalga *Chlorella sorokiniana* for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 60–7, 2013.
 30. OKUDA, K. Structure and phylogeny of cell coverings. **Plant Research**, v. 115:283e8., 2002.

31. LIU, J. et al. Direct transesterification of fresh microalgal cells. **Bioresource Technology**, v. 176, p. 284–287, 2015.
32. WAHLEN, B. D.; WILLIS, R. M.; SEEFELDT, L. C. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2724–30, 2011.
33. EHIMEN, E. A.; SUN, Z. F.; CARRINGTON, C. G. Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids. **Fuel**, v. 89, n. 3, p. 677–684, 2010.
34. ASGHARPOUR, M.; RODGERS, B.; HESTEKIN, J. A. Eicosapentaenoic acid from *Porphyridium cruentum*: Increasing growth and productivity of microalgae for pharmaceutical products. **Energies**, v. 8, n. 9, p. 10487–10503, 2015.
35. NICHOLS, B. W. Light induced changes in the lipids of *Chlorella vulgaris*. **Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 106, n. 2, p. 274–279, 1965.
36. LIU, J. et al. Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: Assessment of algal oils for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 106–110, 2011.
37. BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. *In*: In Richmond, A. (Ed). **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. [s.l.] London: Blackwell Science, p. 312–351, 2004
38. JUNTILA, D. J.; BAUTISTA, M. A.; MONOTILLA, W. Biomass and lipid production of a local isolate *Chlorella sorokiniana* under mixotrophic growth conditions. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 395–8, 2015.
39. BREUER, G. et al. Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 1–9, 2013.
40. FERNANDES, B. D. et al. Light regime characterization in an airlift photobioreactor for production of microalgae with high starch content. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1–8, p. 218–226, 2010.
41. HU, Q. et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, v. 54, n. 4, p. 621–39, 2008.
42. HALIM, R. et al. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 178–85, 2011.
43. PRABAKARAN, P.; RAVINDRAN, A. D. A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 150–154, 2011.

44. PETKOV, G.; GARCIA, G. Which are fatty acids of the green alga *Chlorella*? **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 5, p. 281–285, 2007.
45. MAITY, J. P. et al. Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives – A mini review. **Energy**, v. 78, p. 104–113, 2014.
46. KANDA, H. et al. Lipids extracted from several species of natural blue-green microalgae by dimethyl ether: Extraction yield and properties. **Fuel**, v. 95, p. 88–92, 2012.
47. GUSCHINA, I. A.; HARWOOD, J. L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. **Progress in Lipid Research**, v. 45, n. 2, p. 160–86, 2006.
48. RAWAT, I. et al. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. **Applied Energy**, v. 103, p. 444–467, 2013.
49. SUPPES, G. J. **The Biodiesel Handbook**. [s.l.] Elsevier, 2010.
50. RAMOS, M. J. et al. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 261–8, 2009.

6 Considerações finais

Diversos fatores têm influência na extração de lipídios e produção de biodiesel de microalgas. Essa influência se inicia desde a seleção da espécie de microalga a ser cultivada, passando pelo seu cultivo e crescimento, colheita da biomassa e então a extração dos lipídios seguida da conversão a biodiesel. Estes processos não podem ser avaliados individualmente para constatar o potencial como biodiesel, mas no contexto econômico-ambiental de cada um pois, interagem entre si até a chegada do bioprodutos.

A *Chlorella sorokiniana* demonstrou potencial, ao ser cultivada em ambiente externo e colhida por floculação com FeCl_3 , para a produção de lipídios, e quando da análise de ácidos graxos, foi evidenciado que o biodiesel produzido a partir desta matriz apresenta capacidade de ser utilizado como B100 em países de clima tropical ou como blendas em países de clima temperado.

A extração de lipídios por diferentes métodos de rompimento celular assistida por solvente expôs o efeito que a rigidez parede celular e os tipos/classes de lipídios têm na biomassa de microalgas. A agitação foi mais eficiente em romper a parede celular e os lipídios de *Chlorella sorokiniana*, são polares por natureza, comprovados pelos rendimentos de extração de lipídios aumentarem com a incremento da polaridade dos solventes. O etanol atuou como um bom solvente extrator, mas quando avaliada a produtividade de extração lipídica, a mistura clorofórmio:metanol 2:1 (v v^{-1}) ainda é a mais vantajosa. O perfil e composição dos ácidos graxos extraídos pelos diferentes métodos, sofreu uma pequena variação, no entanto não foi significativa, mesmo em comparação com o método convencional. Os FAME produzidos mostraram-se como potencial para ser tornarem biodiesel, como B100 em países de clima tropical ou como blendas em países de clima temperado.

Anexo A – Equações para predição de propriedades do biodiesel

A partir da composição de ácidos graxos, é possível estimar importantes características do biodiesel como grau de insaturação (GI); Número de Cetano (CN); índice de iodo (II); índice de Saponificação (IS); ponto de nuvem (CP); ponto de obstrução do filtro frio (CFPP); poder calorífico (HHV); viscosidade cinemática (ν); e Densidade (ρ). As Equações 1 a 10 foram utilizadas na estimativa das várias propriedades a partir do perfil de éster metílico de ácidos graxos determinadas por Talebi; Tabatabaei e Chisti (2014); Ramirez-Verduzco; Rodriguez-Rodrigues e Jaramillo-Jacob (2012); Ramos et al., (2009).

O número de cetano (CN) foi calculado da seguinte forma:

$$CN = 46,3 + (5,458 / IS) - (0,225 \times II) \quad (\text{Eq. 1})$$

O índice de saponificação (IS) e o valor de iodo (II) para utilização na Equação 1 foram calculados utilizando as seguintes equações:

$$IS = \sum (560 \times Ni) / Mi \quad (\text{Eq. 2})$$

$$II = \sum (254 \times DN_i) / Mi \quad (\text{Eq. 3})$$

Nas equações acima D é o número de ligações duplas no éster graxo, Mi é a massa molecular do éster graxo e Ni é a percentagem do éster graxo particular na amostra de óleo.

O grau de insaturação (GI) foi calculado utilizando as quantidades de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e poli-insaturados (PUFA) presentes no óleo em% em peso; portanto:

$$GI = MUFA + (2 \times PUFA) \quad (\text{Eq. 4})$$

O fator saturado de cadeia longa (LCSF) e o ponto de obstrução do filtro frio (CFPP) foram estimados:

$$LCSF = (0,1 \times C16) + (0,5 \times C18) + (1 \times C20) + (1,5 \times C22) + (2 \times C24) \quad (\text{Eq. 5})$$

$$CFPP = (3,1417 \times LCSF) - 16,477 \quad (\text{Eq. 6})$$

O ponto de nuvem (CP) é baseado no conteúdo C16:0 (%) no perfil ácidos graxos foi calculado usando a equação:

$$CP = (0,526 \times C16) - 4,992 \quad (\text{Eq. 7})$$

A viscosidade cinemática (ν , mm² / s) a 40 °C foi estimada da seguinte forma:

$$\ln(\nu) = \sum Ni (-12,503 + (2,496 \times \ln Mwi) - 0,178 \times Di) \quad (\text{Eq. 8})$$

A densidade (ρ , g / cm³) do biodiesel a 20 °C foi estimada pela equação:

$$P = \sum Ni (0,8463 + (4,9 / Mwi) + 0,0118 \times Di) \quad (\text{Eq. 9})$$

O maior valor de aquecimento (HHV) do biodiesel foi estimado:

$$\text{HHV} = \sum N_i (46,19 - (1794 / M_{wi}) - 0,21 \times D_i) \quad (\text{Eq. 10})$$

Onde M_{wi} é o peso molecular de um ácido graxo, N_i é a porcentagem do dado ácido graxo no biodiesel e D_i é o número de duplas ligações no determinado ácido graxo para as equações 8, 9 e 10.