



ESTUDO DE DOIS DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO DA MICROALGA *Scenedesmus accuminatus* PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Camila Camargo Garcia¹; Júlia Greco Ferreira Braga¹; Kemely Bruna Zandonadi Ferriani Branco¹; Roberto Bianchini Derner²; Pedro Augusto Arroyo¹.

¹ Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Engenharia Química- camila-bio@live.com

² Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Aquicultura- roberto.derner@ufsc.br

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar dois métodos diferentes de extração de lipídios totais da microalga *Scenedesmus accuminatus*, visando à produção de biodiesel. Os métodos de extração testados foram o Bligh e Dyer e a extração sucessiva. Após a extração foi realizada a caracterização do óleo, determinando-se o índice de acidez e a composição em ácidos graxos. Verificou-se que a qualidade e a quantidade dos lipídios totais extraídos dependem diretamente da polaridade do solvente utilizado. Deste modo, a utilização de solventes polares leva a uma extração preferencial de pigmentos, glicolipídios e fosfolipídios, que podem influenciar de forma negativa a qualidade do biodiesel. Portanto, o método de extração sucessiva, que utiliza solventes apolares, se mostrou melhor, pois leva a uma maior extração de lipídeos neutros, que pode propiciar uma qualidade superior do extrato para utilização na produção de biodiesel, além de facilitar o processo de recuperação do solvente.

Palavras chave: *Scenedesmus accuminatus*, extração de óleo, composição em ácidos graxos, biodiesel.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de fontes alternativas de energia vem ampliar as opções da matriz energética mundial. Isto se deve a inúmeros fatores, dos quais se pode destacar a insegurança no suprimento de combustíveis fósseis, devido a conflitos bélicos e incertezas no volume das reservas (McGINN *et al.*, 2011). Como alternativa potencial, que foi incorporada na matriz energética mundial, durante os últimos anos, estão os biocombustíveis, que são produzidos a partir de um amplo leque de opções, tais como gordura animal, óleos vegetais e resíduos agroindustriais (CHISTI, 2013).

A partir deste cenário, também, vem sendo estudado o cultivo de microalgas como fonte matéria-prima alternativa, para a produção de biocombustíveis de terceira

geração (CHISTI, 2007; SANCHEZ-SILVA *et al.*, 2013). Esta matéria prima é utilizada em outras aplicações comerciais, tais como alimentação humana, produção de fármacos, cosméticos e alimentação animal (MORAIS e COSTA, 2008).

O uso de microalgas na produção de biocombustíveis deve-se a fatores tais como alta produtividade e composição química, que possui proteína (6-52%), carboidratos (5-23%) e lipídeos (7-23%) (SANCHEZ-SILVA *et al.*, 2013). A extração do material graxo da biomassa microalgal visa à obtenção, principalmente, de lipídeos, os quais podem ser classificados em lipídeos totais (pigmentos, fosfolipídeos, glicolipídeos e lipídeos neutros), brutos (lipídeos neutros e pigmentos) e neutros (triacilglicerídeos, ácidos graxos livres, hidrocarbonetos, esteróis, ésteres de esteróis e os álcoois



livres) [BRIAN et al., 2011]. Cabe ressaltar, a partir disso, que ainda há na literatura uma controvérsia em relação à classificação dos diferentes tipos de lipídeos.

Para a produção de biodiesel, o interesse maior está na extração dos lipídios neutros [WAHLEN et al., 2011]. Entretanto, a maioria dos estudos sobre a extração de óleo de microalga não especificam os lipídios extraídos, o que é de grande importância, uma vez que cada classe de lipídeo tem uma finalidade de aplicação diferente [BAUMGÄRTNER et al., 2013].

Para a extração dos lipídeos de interesse pode-se utilizar diferentes tipos de solventes, sendo estes orgânicos apolares, como o hexano e clorofórmio, ou polares, como o metanol, em diferentes métodos e condições de extração. Segundo Im et al. (2014), solventes com maior polaridade levam a um maior rendimento em lipídeos na extração da biomassa algal.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar dois métodos diferentes de extração de lipídios da biomassa de microalga *Scenedesmus accuminatus*, para a produção de biodiesel.

2. METODOLOGIA

A cultura de *Scenedesmus accuminatus* foi desenvolvida em tanque do tipo raceway, com volume de 10000 L, empregando meio *Bold's Basal Medium - BBM* (25% da dosagem). O cultivo foi mantido com agitação constante pelo emprego de rotor de pás e borbulhamento de ar atmosférico, sob condições naturais de iluminação e temperatura. Ao alcançar 500 mg/L, passados 10 dias de cultivo, as células microalgais foram separadas por centrifugação (centrífuga industrial, a 6.000 g). A biomassa foi seca em estufa, com ventilação forçada, a 50 °C, por 24 horas.

2.1 Extração do óleo

2.1.1 Método 1 – Bligh e Dyer

O método de extração proposto por Bligh e Dyer [1959], adaptado por Chen et al. [2012], foi utilizado neste trabalho. Assim, foram utilizados 100 mg de biomassa seca e 5 mL de solução de clorofórmio e metanol, na proporção 1:2 (v:v), em um tubo de ensaio. Em seguida, o tubo foi aquecido a 65 °C, por 60 minutos. Logo após, as amostras foram centrifugadas a 948 rpm, por 5 minutos, e, então, recolheu-se o sobrenadante, que foi transferido para um tubo de ensaio com tampa. Esse processo foi repetido por três vezes.

Ao tubo contendo o sobrenadante, recolhido em todo processo de extração, foram adicionados clorofórmio e solução de cloreto de sódio a 1% até alcançar a proporção final de 1:1:0,9 de clorofórmio:metanol:solução de cloreto de sódio. Após a separação de fases da amostra, a fase contendo os lipídios foi cuidadosamente transferida para um novo tubo de ensaio, previamente pesado (Pi), e evaporado em estufa, a 60° C, até massa constante (Pf). A porcentagem de lipídios totais foi determinada pela diferença de massa entre Pi e Pf.

2.1.2 Método 2 – Extração Sucessiva

O método de extração sucessiva foi proposto por Baumgärtner et al. [2013]. Para a realização deste método foram utilizados 1 g de biomassa e 10 mL de hexano, em um tubo falcon. O tubo foi, então, aquecido em banho, sob agitação constante, por 30 minutos, a uma temperatura de 60 °C. Após esse período, a amostra foi centrifugada a 4000 rpm, por 5 minutos, e o sobrenadante foi recolhido em balão de fundo chato de massa previamente conhecida (P1). Ao tubo contendo o resíduo da biomassa foram adicionados mais 10 mL de hexano, sendo o tubo levado novamente ao banho, por mais 30 minutos, e, então, centrifugado. Todo o processo foi repetido



por seis vezes. Ao término da extração o solvente foi recuperado em um evaporador rotativo e o balão, contendo os lipídios, foi levado à estufa a 60 °C, até massa constante (P2). A determinação do teor de lipídios totais foi obtida a partir da diferença de massa entre P1 e P2.

2.2 Determinação de lipídios neutros.

Para determinar a quantidade real de lipídios neutros extraídos é necessário promover uma separação do extrato, obtendo-se, assim, apenas os lipídios neutros. A purificação dos lipídios pode ser realizada por processo de adsorção seletiva em coluna de leito fixo. Desta maneira, como alternativa, pode-se passar o extrato contendo os lipídios totais por uma coluna recheada com carvão ativado (BRIAN *et al.*, 2011).

Primeiramente, a matéria graxa obtida anteriormente foi diluída em n-hexano na proporção 1:50 ($m_{\text{biomassa seca}} : mL_{\text{n-hexano}}$) e o leito foi recheado com carvão ativado de osso animal granulado, cedido pela empresa Bonechar Carvão do Brasil LTDA. Utilizou-se uma coluna de vidro de aproximadamente 30 cm de altura, contendo 6 g de carvão ativado.

O solvente n-hexano, utilizado para eluir o extrato pela coluna, foi recuperado em um evaporador rotativo e os lipídeos neutros obtidos foram secos em estufa a 60 °C, para a completa remoção do solvente.

2.3 Caracterização do óleo

2.3.1 Índice de acidez

O índice de acidez do óleo (IA) de microalga foi definido como a quantidade em mg de hidróxido de potássio necessário para neutralizar os ácidos graxos livres em 1 grama de óleo, conforme proposto por Instituto Adolfo Lutz [1985]. Para aplicação deste método, inicialmente, foi pesada a amostra de óleo de microalga extraído conforme procedimento descrito anteriormente, em

um erlenmeyer, adicionando-se 25 mL de uma solução de éter:álcool, na proporção 2:1. Logo após, foram adicionadas duas gotas de fenolftaleína 1%. Realizou-se a titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L até coloração rósea. O índice de acidez foi determinado por meio da relação:

$$IA = \frac{V \times f \times 0,0561}{P_o} (mgKOH / g) [1]$$

sendo: V o volume de solução de NaOH 0,1 mol/L gasto na titulação em mL; f o fator de correção da solução NaOH 0,1 mol/L; e P_o a massa do óleo utilizada na análise, em g.

2.3.2 Determinação da composição em ácidos graxos

Para a análise da composição em ácidos graxos do óleo de microalga extraído foi, primeiramente, necessário realizar a derivatização da amostra (VISENTAINER *et al.*, 2012). Assim, a escolha do método de esterificação de lipídios (derivatização) de Hartmann e Lago [1973], descrita a baixo, foi a melhor opção, devido ao índice de acidez elevado do óleo da microalga. Para a aplicação do método, pesaram-se 30 mg de amostra de óleo, em um tubo de ensaio. Adicionaram-se 4 mL de solução 0,5 mol/L de NaOH em metanol. Fechou-se bem o tubo de ensaio, o qual foi aquecido em banho de água em ebulição, até dissolver os glóbulos de óleo e a solução tornar-se transparente. Esfriou-se o tubo de ensaio em água corrente e adicionaram-se 5 mL do reagente esterificante (metanol). O tubo foi novamente aquecido em banho, sendo adicionados 4 mL da solução saturada de cloreto de sódio. Agitou vigorosamente o tubo, por 30 segundos, e após adicionaram-se 5 mL do solvente (n-heptano). O tubo foi novamente agitado por mais 30 segundos. Deixou-se o tubo em repouso, por aproximadamente 90 minutos, na geladeira. O sobrenadante foi utilizado para análise da composição do



óleo por cromatografia em fase gasosa, utilizando-se um Cromatógrafo Varian, modelo CP-3800, com detector de ionização de chama (DIC), contendo uma coluna capilar específica para separação de ácidos graxos BP- X70 – SGE de 30 m x 0,25 mm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O índice de acidez obtido foi de 7,84 mg KOH/g, indicando que o melhor processo para produção de ésteres a partir desta matéria prima é a via ácida. De fato, segundo Sharma *et al.* [2008], a transesterificação de amostras com índice de acidez superior a 2,0 mg KOH/g deve ser realizada utilizando catalisadores ácidos, evitando, assim, pré-tratamentos para a diminuição da acidez.

Com a utilização do método 1 (Bligh e Dyer), o teor de lipídios totais obtidos foi de 19,76%, valor este inferior ao obtido por Chen *et al.* [2012], que foi de 34,34%.

O teor de lipídios totais obtido pela utilização do método 2 (extração sucessiva) foi de 14,35%. Este valor é superior ao obtido por Bäümgartner *et al.* [2013] e por Branco [2013], que obtiveram valores de 5,14% e 9,68%, respectivamente, para a microalga *Scenedesmus accuminatus*.

Acredita-se que a diferença no teor de lipídios totais encontrada ocorreu por variações no método de cultivo das microalgas. Também, a diferença no teor de lipídios totais extraídos pode ter ocorrido devido à característica dos solventes utilizados. Os solventes polares (metanol) e apolares (clorofórmio), como os utilizados no método 1, extraem da biomassa tanto os lipídios neutros, que são componentes ligados covalentemente, quanto os lipídios polares, que são componentes que estão ligados por forças eletrostáticas e pontes de hidrogênio.

O uso do solvente apolar (hexano), utilizado no método 2, extrai da biomassa apenas os componentes que fazem parte

da classe dos lipídios neutros, ou seja, os triacilglicerídeos, ácidos graxos livres, hidrocarbonetos, esteróis, os ésteres de esteróis e os álcoois livres [WAHLEN *et al.*, 2011].

De fato, a quantidade de lipídeos neutros obtidos com a utilização do método 2 (6,02 %) foi significativamente maior do que a obtida com a utilização do método 1 (3,44 %).

Logo, a eficiência de extração das diferentes classes de lipídios depende diretamente da polaridade do solvente utilizado.

A tabela 1 apresenta a composição em ácidos graxos obtida utilizando os dois métodos de extração de lipídeos.

Tabela 1- Composição em ácidos graxos obtida por cromatografia em fase gasosa.

Ácido Graxo	Método 1	Método 2
C8:0	0,00	0,63
C10:0	1,26	1,34
C11:0	0,53	0,00
C14:0	0,88	0,57
C15:0	0,55	0,00
C15:1	1,77	0,00
C16:0	14,26	11,36
C16:1	1,60	1,088
C17:0	0,66	0,00
C17:1	0,76	4,25
C18:0	1,29	0,74
C18:1	9,09	9,25
C18:2	4,49	5,21
C18:3	57,23	56,07
C20:0	0,00	2,11
C20:1	2,29	0,00
C20:3	0,00	2,29
C21:0	1,16	1,62
C20:4	0,55	0,00
C20:3	0,00	0,77
C22:1	0,00	2,64
C24:0	0,99	0,00
C24:1	0,57	0,00



A partir das composições apresentadas na tabela 1, pode-se verificar que houve predominância de ácidos graxos insaturados com a utilização dos dois métodos de extração, entre os quais o C18:3 (ácido linolênico) se destacou.

Os dois métodos extraíram, em maiores proporções, os mesmos ácidos graxos, quais sejam: C18:3; C18:1; e C16:0. Assim, na extração com o método 1 obtiveram-se os seguintes teores: C18:3 (57,23); C18:1 (9,09%); e C16:0 (14,26%). Na extração com o método 2 obtiveram-se os seguintes teores: C18:3 (56,07%), C18:1 (9,25%) e C16:0 (11,36%). Também, pode-se notar que os ácidos graxos menores do C16 são predominantemente saturados, sendo de ~5% para o método 1 e de ~2,5% para o método 2. Por outro lado, o teor de ácidos graxos com cadeia longa (>C20) foi maior para o método 2 (~9,4%), com predominância de poli-insaturados (5,7%) e ~3,7% de saturados, em relação ao método 1 (~5,6%), com ~2,2% de saturados e ~2,9% de monoinsaturados.

Na tabela 2, de maneira geral, pode-se observar que a maior parte dos ácidos graxos presentes no óleo da microalga *Scenedesmus accuminatus* é de insaturados (~80%), com ampla predominância de poli-insaturados (~63%).

Tabela 2- Composição em ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados.

Ácidos graxos	Composição (%)	
	Método 1	Método 2
Saturados	21,60	18,39
Monoinsaturados	16,10	17,24
Poli-insaturados	62,30	64,37

Baumgärtner *et al.* [2013] obtiveram os seguintes resultados para a mesma microalga: 33,18% de ácidos graxos saturados, 26,22% de monoinsaturados e 40,60% de poli-insaturados. Branco [2013] obteve 33,62% de ácidos graxos

saturados, 43,93% monoinsaturados e 22,45% de poli-insaturados, enquanto que Nascimento *et al.* [2013] obtiveram 70,83% de ácidos graxos saturados, 21,71% de monoinsaturados e 7,46% de poli-insaturados. Assim, os valores apresentados na tabela 2 são diferentes dos encontrados na literatura. Acredita-se que essa diferença de composição se deva ao fato das microalgas serem cultivadas em condições diferentes.

Segundo Nascimento *et al.* [2013], a composição em ácidos graxos e o conteúdo lipídico estão relacionados diretamente com a qualidade do biodiesel. A insaturação dos ácidos graxos influencia as características e qualidade do biodiesel, tais como número de cetano, saponificação, viscosidade e ponto de entupimento de filtro a frio. Deste modo, o alto teor de ácidos graxos poli-insaturados obtidos para a microalga *Scenedesmus accuminatus* traz grandes vantagens para a propriedade ponto de entupimento do filtro a frio, devido ao ponto de fusão dos ácidos graxos saturados ser maior que dos ácidos graxos poli-insaturados. Com isso, o biodiesel rico em ácidos graxos saturados, quando resfriados são os primeiros a precipitar tornando esse biodiesel inadequado para regiões de clima frio [NASCIMENTO *et al.*, 2013]. Isto não ocorreria com o biodiesel produzido a partir do óleo de microalga.

Entretanto, a presença de ácidos graxos poli-insaturados pode reduzir a estabilidade oxidativa, gerando uma redução no tempo de armazenamento em tanques. A presença de ácidos graxos menores que C11 afeta positivamente a viscosidade e a contra ponto negativamente o ponto de fulgor. Por outro lado, a presença de ácidos graxos de cadeia longa, maiores que C20, melhora o ponto de fulgor e afeta negativamente a viscosidade.

Ramos *et al.* [2009] afirmam que a composição em ácidos graxos encontrados nas microalgas *Scenedesmus accuminatus* é semelhante



aos principais ácidos graxos encontrados na matéria prima clássica óleo de soja predominantemente utilizada no Brasil para a produção de biodiesel. Desta forma, o presente estudo mostra que é possível extrair óleo de microalga *Scenedesmus accuminatus*, com potencial para ser aplicado à produção de biodiesel, atendendo às normas vigentes no país. Além disso, a utilização de um único tipo de solvente, conforme ocorre na extração sucessiva, além de levar a uma composição em ácido graxos atrativa, torna mais fácil a recuperação do mesmo, reduzindo os custos de produção.

4. CONCLUSÕES

O teor de lipídios totais extraídos a partir do método Bligh e Dyer foi superior ao obtido a partir do método de extração sucessiva. Isto ocorre devido aos solventes utilizados neste método extraírem uma quantidade maior de pigmentos, fosfolipídios e glicolipídios. No entanto, o método de extração sucessiva se mostra melhor, quando o objetivo principal é a produção de biodiesel, pois leva a um teor de lipídeos neutros (óleo) muito mais alto. Também, a análise da composição em ácidos graxos mostrou que o óleo de microalga pode levar a características e propriedades que podem atender as normas vigentes no Brasil, indicando que esta é uma matéria prima alternativa com grande potencial de aplicação na produção de biocombustível.

5. AGRADECIMENTOS

À Capes e ao CNPq pelo apoio financeiro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAUMGÄRTNER, T. R. S.; BURAK, J. A. M.; ZANIN, G. M.; BAUMGÄRTNER, D.; SÉBASTIEN, N. Y.; ARROYO, P. A. Different methods for extracting oil from

the microalga *Scenedesmus accuminatus* for biodiesel production. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**. 2013. v. 10, p. 441 – 445.

BLIGH E G., DYER W J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.** 1959, v. 37, p. 911 - 917.

BRANCO, K. B. Z. F. **Estudo da transesterificação *in situ* da microalga *Scenedesmus sp.* visando à síntese de ésteres para produção de biodiesel.** 2013, 76 f. Dissertação (Mestrado em engenharia química) - Programa de pós graduação em Engenharia Química. Universidade Estadual de Maringá. Maringá, PR.

BRIAN, J. G. The economics of producing biodiesel from algae. **Renewable Energy**, 2011, v. 36, p. 158-162.

CHEN, L.; LIU, T.; ZHANG, W.; CHEN, X.; WANG, J. Biodiesel production from algae oil high in free fatty acids by two-step catalytic conversion. **Bioresource Technology**. 2012. v. 111, p. 208 – 214.

CHISTI, Y. et. al. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology advances**, 2007. v. 25, n. 3, p. 294 – 306, 2007.

HARTMANN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practices**, 1973, v. 22. p. 475 - 477.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos**, 3. ed. Sao Paulo: IMESP, 1985. p. 245-246.



LOBÔ, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. Biodiesel: Parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**. 2009 v. 32, n. 6, p. 1596 – 1608.

MORAIS, G. M.; COSTA, J. A. V. Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas em dióxido de carbono. **Ciências Agrotecnológicas**, Lavras. v. 32, n. 4, p. 1245 – 1251. jul./ago. 2008.

NASCIMENTO, I. A., MARQUES, S. S. I., CABANELAS, I.T. D., PEREIRA, S. A., DRUZIAN, J. I., SOUZA, C. O., VICH, D. V., CARVALHO, G. C., NASCIMENTO, M. A. 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, mar. 2013.

RAMOS, M. J., FERNÁNDEZ, C. M., CASAS, A., RODRÍGUEZ, L., PÉREZ, A. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 261-268, jan. 2009.

SHARMA, Y. C., SINGH, B., UPADHYAY, S. N. Advancements in development and characterization of biodiesel: A review. **Fuel**, 2008, v. 87, n. 12, p. 2355-2373.

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**, 2011, v.102, p. 2724–2730.