

**UNIVERSIDADE DE SANTA CRUZ DO SUL  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA E FARMÁCIA  
CURSO DE FARMÁCIA**

Felipe Ziemann

**“COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE RUPTURA CELULAR E EXTRAÇÃO DE  
LIPÍDIOS DE BIOMASSA PERIFÍTICA”**

Santa Cruz do Sul

2017

Felipe Ziemann

**“COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE RUPTURA CELULAR E EXTRAÇÃO DE  
LIPÍDIOS DE BIOMASSA PERIFÍTICA”**

Trabalho de conclusão apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade de Santa Cruz do Sul para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof. Dra. Lisianne Brittes Benitez

Santa Cruz do Sul

2017

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>6</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>6</b>
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1</b>	<b>Microalgas .....</b>	<b>7</b>
<b>3.2</b>	<b>Conteúdo lipídico das microalgas .....</b>	<b>8</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Fatores que afetam a produção de lipídios nas microalgas .....</b>	<b>9</b>
<b>3.3</b>	<b>Consórcios microbianos envolvendo microalgas .....</b>	<b>11</b>
<b>3.4</b>	<b>Sistema Algal Turf Scrubber.....</b>	<b>11</b>
<b>3.5</b>	<b>Biorremediação .....</b>	<b>13</b>
<b>3.6</b>	<b>Métodos de ruptura celular e extração de lipídios .....</b>	<b>14</b>
<b>3.7</b>	<b>Bligh e Dyer.....</b>	<b>18</b>
<b>3.8</b>	<b>Irradiação por micro-ondas na ruptura celular de microalgas .....</b>	<b>18</b>
<b>3.8</b>	<b>Usos da fração lipídica das microalgas .....</b>	<b>19</b>
<b>3.8.1</b>	<b>Produção de biodiesel.....</b>	<b>19</b>
<b>3.8.2</b>	<b>Atividade antimicrobiana de lipídios de microalgas .....</b>	<b>20</b>
<b>3.8.3</b>	<b>Potencial alimentar e nutracêutico .....</b>	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>38</b>
	<b>ANEXO I.....</b>	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os métodos de extração de lipídios são processos puramente físicos, onde ocorre a passagem dos constituintes solúveis (lipídios) de uma matriz inerte para o solvente que se encontra em contato com a mesma, sendo estes lipídios facilmente recuperados posteriormente, sem a necessidade de empregar quaisquer reações químicas. Porém na prática é impossível empregar um único solvente para a extração de lipídios devido ao fato dos mesmos apresentarem uma extensa faixa de relativa hidrofobicidade (BRUM et al., 2009). Esta operação de transferência de massas, que ocorrem nestas técnicas de extração, tem a sua natureza precisa determinada por ambos os componentes do processo, a natureza dos solutos e as polaridades dos solventes (RANJAN; PATIL; MOHOLKAR, 2010).

O processo de extração de lipídios de células microalgais difere das culturas alimentares tradicionais na medida em que as paredes celulares das células de microalgas devem ser rompidas para liberar os compostos lipídicos, antes da extração propriamente dita. No entanto, a estrutura robusta da parede celular das microalgas limita a taxa de ruptura celular quando se utilizam métodos mecânicos normais, inibindo a dissolução dos lipídios e, conseqüentemente dificultando a extração lipídica (YU-AN et al., 2014).

Desta forma, a ruptura da parede celular das microalgas passa a representar a etapa chave para a extração e a recuperação de lipídios. A seleção dos solventes apropriados torna-se fundamental para o processo de extração, uma vez que compromete a estrutura desta parede celular assegurando a sua ruptura e, por conseguinte, a extração de lipídios (ARAÚJO et al., 2013).

Existe uma ampla gama de métodos de extração de lipídios e a escolha de cada método é baseada em eficiência, precisão, rentabilidade, facilidade de realização, alta capacidade de produção, robustez e, o mais importante, precisão e reprodutibilidade (VISWANATH et al., 2010). Porém, os procedimentos convencionais clássicos de extração de lipídios de microalgas têm grandes limitações devido ao processo demorado e intensiva mão-de-obra, dificultando o processamento de um grande número de amostras (RAWAT et al, 2013).

O emprego da tecnologia de micro-ondas apresenta como grande vantagem à capacidade de reduzir drasticamente o volume de solventes a ser utilizado, o que conseqüentemente acarreta em uma redução da geração de resíduos, tornando este sistema uma opção, para promover a ruptura celular, nos processos de extração de compostos orgânicos (TSUKUI; REZENDE et al., 2014).

Avanços significativos foram feitos para aumentar a geração de biomassa celular para fins de rendimentos lipídicos. No entanto, como parte do processo a jusante, a extração de lipídios continua a ser um desafio significativo para a produção comercial de óleos a base de microalgas (LI et al.,2014).

O presente estudo justifica-se porque pretende desenvolver um método que utiliza a irradiação por micro-ondas como uma forma de facilitar a ruptura da parede celular das microalgas presentes na biomassa com maior eficiência na extração de lipídios que o método utilizado como comparativo Bligh e Dyer (1959), envolvendo um tempo de processamento, mão-de-obra e gastos com solventes muito menores.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Comparar métodos de ultrassom e micro-ondas, na ruptura celular, e posterior extração de lipídios a partir da biomassa de um perifíton.

### **2.2 Objetivos específicos**

- ✓ Realizar um planejamento fatorial  $2^3$  com intuito de desenvolver um método de ruptura celular, com irradiação por micro-ondas, para extração de lipídios, variando a proporção de clorofórmio/metanol (1/2 e 2/1), quantidade de biomassa empregada no processo (300 mg e 500 mg) e o tempo de extração (5 e 15 minutos).
- ✓ Verificar o perfil lipídico e estimar o percentual de cada um dos ácidos graxos presentes nas amostras de lipídios extraídas da biomassa do perifíton em questão, de ambos os métodos de ruptura celular, por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS);
- ✓ Comparar o rendimento dos lipídios extraídos entre o método de ruptura celular com ultrassom (Bligh e Dyer adaptado) e o método desenvolvido com irradiação por micro-ondas;

### **3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

#### **3.1 Microalgas**

As microalgas estão presentes principalmente nos ambientes aquáticos, em reservatórios de água potável, lagoas de estabilização de resíduos, pesqueiros, represas, lagos e rios, sendo este grupo de microrganismos denominados de fitoplâncton e classificados como produtores primários de energia, representando a base da cadeia alimentar em ecossistemas aquáticos. Além disso, destacam-se como microrganismos que apresentam uma elevada eficácia na captura e incorporação do CO<sub>2</sub> atmosférico, pois possuem uma alta eficiência fotossintética, além de uma taxa de proliferação rápida, ampla adaptabilidade de tolerância a ambientes extremos e excelente desenvolvimento em cultivos intensivos (ANDRADE; FILHO, 2014).

São componentes de um grupo muito variado de organismos e seus lipídios refletem essa diversidade, apresentando teores de lipídios totais que variam de acordo com a espécie, os níveis de nutrientes, o tipo de cultivo utilizado na produção da biomassa e as condições experimentais nas quais foram avaliadas (CHISTI, 2007; KHAN et al., 2009; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Por estas razões, é aconselhável desenvolver estratégias de cultivo em duas fases, nas quais as microalgas são mantidas em condições ótimas de crescimento para gerar alta produtividade de biomassa e, em seguida estressadas para aumentar o conteúdo de produtos de alto valor agregado como, por exemplo, o conteúdo de lipídios (DE FRANCISCI et al., 2017).

De acordo com Tan e Lee (2016), a taxa de crescimento rápido também fornece uma vantagem competitiva em relação às espécies de algas contaminantes em culturas ao ar livre e requer menos espaço de cultura devido a uma maior densidade celular por área. Desta forma, a produção econômica de lipídios para uso comercial, idealmente, irá requerer microalgas que acumulam constitutivamente grandes quantidades de lipídios, independentemente das condições ambientais que impedem o crescimento.

Determinadas abordagens foram sugeridas para o uso da biomassa microalgal para a liquefação hidrotermal, bem como para a extração de compostos valiosos, o que poderia ampliar as oportunidades de mercado de produtos de microalgas e abrir novas possibilidades de acoplamento de produção de algas para biocombustíveis (BARREIRO et al., 2014).

### 3.2 Conteúdo lipídico das microalgas

Os lipídios de algas podem ser divididos, com base em suas características físico-químicas, em dois tipos principais: lipídios polares, como fosfolipídios e glicolipídios, e lipídios neutros/não polares, como mono, di e tri-acilglicerídeos e carotenoides (GREENWELL et al, 2010; SCHUHMANN; LIM; SCHENK, 2012). Os mesmos são constituídos principalmente por ácidos graxos insaturados (52-65%) tais como ácido palmitoleico (16:1), ácido oleico (18:1), ácido linoleico (18:2), e linolênico (18:3) e ácidos graxos saturados (18-42%) com maior porcentagem de ácido palmítico (16:0) e menor conteúdo de ácido esteárico (18:0) (GOUVEIA et al., 2009; KHAN et al., 2009; HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012). A Tabela 1 apresenta os principais ácidos graxos encontrados em diferentes espécies de microalgas.

Tabela 1: Principais ácidos graxos encontrados em diferentes espécies de microalgas:

Microalgas	Principais ácidos graxos	Referências
<i>Chlorella protothecoides</i>	Ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) e ácido alfa-linolênico (C18:3n3)	Ren et al. (2017)
<i>Scenedesmus</i> sp.	Ácido linolênico (C18:3), ácido hexadecatetraenóico (C16:4), ácido linoleico (C18:2), ácido oleico (C18:1) e ácido palmítico (C16:0)	Lorenzen et al. (2017)
<i>Heterochlorella luteoviridis</i>	Ácido palmítico (C16:0), ácido linoleico (C18: 2), ácido alfa-linolênico (C18: 3n3), ácido esteárico (C18: 0) e ácido oleico (C18: 1)	Jaeschke et al. (2017)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1) e ácido eicosapentaenóico (C20:5)	Wu et al. (2017)
<i>Nannochloropsis salina</i>	Ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido oleico (18:1), ácido linoleico (C18:2), ácido araquidônico (C20:4) e ácido eicosapentaenóico (C20:5)	Lee et al. (2014)
<i>Tetraselmis</i> sp.	Ácido palmítico (C16:0) e ácido esteárico (C18:0)	Teo e Idris (2014)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (16:1) e ácido eicosapentaenóico (C20:5)	Olmstead et al. (2013)



Os ácidos graxos normalmente encontrados nas microalgas variam em comprimento de cadeia, grau de insaturação e posição na molécula de glicerol. Conseqüentemente, a própria fração de triglicerídeos consiste em uma mistura complexa de diferentes tipos de moléculas (RÍOS et al., 2013).

Estes, por sua vez, acumulam-se principalmente no citoplasma sob a forma de corpos lipídicos, os quais funcionam não apenas como armazenamento de reserva de energia, mas também como fonte de ácidos graxos de cadeia longa para o aparelho fotossintético e membranas celulares, bem como para o armazenamento de carotenoides lipofílicos que servem como protetores eficientes contra o foto-dano causado por condições de alta intensidade de luz (VITOVA et al., 2015).

As rotas de síntese dos ácidos graxos e triglicerídeos nestes microrganismos compreendem as etapas de formação da acetil coenzima A (acetil-CoA), reação essa que ocorre no citoplasma, seguido do alongamento e insaturação da cadeia de carbono dos mesmos, os quais são dependentes, sobretudo dos sistemas enzimáticos acetil-CoA carboxilase e ácido graxo sintase, sendo o L- $\alpha$ -fosfoglicerol e a acetil-CoA os dois maiores precursores na biossíntese de triglicerídeos (HU et al. 2008).

As células das microalgas tendem a produzir lipídios em maior quantidade quando as mesmas são submetidas a condições de cultivo sob estresse, isto é, em condições de escassez de nitrogênio, que revertem o metabolismo de carboidratos e proteínas para lipídios (SURENDHIRAN et al., 2015).

### **3.2.1 Fatores que afetam a produção de lipídios nas microalgas**

O estresse por nitrogênio geralmente apresenta efeitos desproporcionais sobre o crescimento e o teor de lipídios, com uma grande diferença entre as microalgas neste sentido, sendo necessário um intervalo amplo entre as espécies no que diz respeito à taxa de fornecimento de nitrogênio para a cultura. Sendo o mesmo realizado, com intuito de produzir uma biomassa com um alto teor de lipídios, a partir de organismos que combinam a capacidade de acumular lipídios em resposta ao estresse mínimo de azoto em concomitância com o seu crescimento. Desse modo, o cultivo em batelada se mostra mais eficaz do que os sistemas de cultivo semicontínuos com relação à otimização do crescimento e as compensações do conteúdo lipídico, mesmo para espécies que requerem um menor estresse de azoto (ADAMS et al., 2013).

Da mesma forma, a composição bioquímica pode variar consideravelmente em função da concentração de dióxido de carbono no meio ou até mesmo devido à espécie de microalga empregada como, por exemplo, em processos de mitigação de dióxido de carbono em fotobiorreatores, onde determinadas espécies (*Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. e *Spirulina platensis*) produzem mais proteínas ou lipídios, em condições de cultivo igualitárias com relação aos níveis de CO<sub>2</sub> (SINGH et al., 2016). Neste contexto, concentrações elevadas de dióxido de carbono também podem influenciar de forma diferente nos perfis de crescimento das microalgas sendo este fator associado às características de tolerância e adaptabilidade de cada espécie durante o processo de cultivo (KASSIM; MENG, 2017).

A desinfecção por radiação ultravioleta (UV), previamente ao cultivo e extração de lipídios, apresenta-se como uma alternativa para aumentar a produtividade da biomassa e do conteúdo lipídico. Esse tipo de pré-tratamento, em algas cultivadas em consórcio com outros microrganismos, não altera o perfil dos ácidos graxos, presentes nos lipídios extraídos. Além disso, o estresse imposto pela desinfecção por UV pode vir a contribuir para o aumento dos níveis lipídicos, que são metabólitos de estresse, e para a produção de uma biomassa mais limpa, facilitando posteriormente o processo de extração das substâncias de interesse (ASSEMANY et al., 2015).

Sakarika e Kornaros (2016) investigaram os efeitos do pH do meio de cultivo com relação ao crescimento e a cinética de acumulação de lipídios da microalga *Chlorella vulgaris*. Sendo que a maior produtividade lipídica foi observada em pH de 7,5, tendo este microrganismo crescido em uma faixa de pH de 5 a 8. Porém, não houve relação entre a composição de ácidos graxos e o pH do meio.

Da mesma forma, Talebi et al. (2015) buscaram modular a via bioquímica de síntese de lipídios na microalga *Dunaliella* sp. com a inclusão de inositol às culturas, molécula que atua como fator de crescimento em animais e microrganismos. A adição de tal substância melhorou a acumulação de lipídios em até 50%, demonstrando a importância dos estudos de modulação bioquímica, na esperança de encontrar estratégias mais eficientes e economicamente viáveis para a elaboração de sistemas de produção de biodiesel, a partir de lipídios de microalgas.

Segundo Wedre et al. (2014), a aplicação de estirpes oleaginosas de fungos e algas em águas residuais pode melhorar substancialmente o rendimento lipídico total, ao mesmo que a composição de ácidos graxos pode ser adaptada e otimizada através da co-cultura de diferentes algas e fungos sem a necessidade de modificação genética.

Outras abordagens para a indução da acumulação lipídica incluem temperatura, estresse de salinidade e metálico. Na prática, as estratégias de indução de lipídios também podem ser combinadas em um esforço para alcançar a otimização da produção dos mesmos (ZHU; LI; HILTUNEN, 2016).

### **3.3 Consórcios microbianos envolvendo microalgas**

Em sistemas de coexistência de microalgas e bactérias em águas residuais é possível observar a contribuição individual de cada uma na remoção de nutrientes, onde as microalgas desempenham um papel dominante na retirada de nitrogênio e fósforo, enquanto as bactérias removem a maior parte da matéria orgânica (HE et al., 2013).

Cho et al. (2015) avaliaram a concepção ecológica de um consórcio microalgal-bacteriano com relação ao aumento acumulativo da produtividade de biomassa e lipídios através da infestação seletiva da ficosfera de algas com bactérias promotoras do crescimento, obtendo sucesso em comprovar tal influência.

Segundo Muñoz et al. (2006) a biomassa de consórcios microbianos contendo microalgas e bactérias apresenta um bom desempenho na captação de cobre de águas residuais, devido à alta capacidade de bioabsorção das microalgas, indicando que as mesmas também podem ser aproveitadas para a remoção de metais pesados deste tipo de efluente.

Além disso, as biomassas provenientes de consórcios de microalgas de linhagens filamentosas e unicelulares cultivadas com águas residuais também se apresentam como uma promessa para o desenvolvimento de um potencial biofertilizante sustentável e de baixo custo (RENUKA et al., 2016).

Zhao et al. (2014) investigaram a viabilidade da utilização de consórcios de bactérias e microalgas para o tratamento de lixiviados de aterro, tendo como resultados uma eficiência de 95% na remoção do nitrogênio amoniacal e uma taxa máxima de fixação de carbono e produtividade de lipídica em proporções de 10% de lixiviados para 90% de águas residuais.

### **3.4 Sistema Algal Turf Scrubber**

O Algal Turf Scrubber (ATS) é um ecossistema controlado para o tratamento de águas residuais através do escoamento de efluentes sobre uma superfície inclinada que é coberta por um biofilme de perifíton (LIU et al., 2016). Este sistema representa uma tecnologia especialmente promissora que pode integrar com sucesso a fitorremediação com a geração de biomassa para propósitos de biocombustíveis (ADEY et al., 2011). Além disso, a biomassa derivada do ATS é fácil de separar da água tratada, sem aplicar processos de desidratação

caros e que consomem energia, como a centrifugação ou a filtragem sob pressão (LIU et al., 2016). A Figura 1 demonstra o Sistema Algal Turf Scrubber, localizado as margens do Lago Dourado.

**Figura 1 – Sistema Algal Turf Scrubber.**



O ATS é projetado para promover o tratamento biológico de águas residuais usando algas bentônicas, conduzindo a sua fotossíntese para níveis elevados e colhendo periodicamente a biomassa para remover os nutrientes assimilados e estimular a produção adicional (ADEY et al. 2013; SANDEFUR et al., 2011). A Figura 2 demonstra a visão geral do Lago Dourado, localizado no município de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, a uma altitude de 4 mil metros e a localização geográfica do mesmo com suas respectivas latitude e longitude.

**Figura 2 – Visão geral do Lago Dourado e localização geográfica.**



Fonte: Google Earth.

Em contraste com as monoculturas de microalgas planctônicas, a comunidade do sistema ATS consiste em uma policultura natural de muitas espécies de algas nativas, resultando em robustez e resiliência avançadas às flutuações ambientais e invasões parasitárias (LIU et al., 2016).

### **3.5 Biorremediação**

O cultivo de microalgas pode ser considerado uma ferramenta promissora para a recuperação parcial de nutrientes de águas residuais. Sendo que neste contexto a recuperação de nutrientes se traduz na produção de biomassa valiosa que poderia tornar o processo rentável (DE FRANCISCI et al., 2017).

O uso de processos de tratamento químico e físico para eliminar os nutrientes nas águas residuais pode ser eficiente, no entanto, eles são caros e consomem uma quantidade

significativa de energia (DRIRA et al., 2016). Como opção para este tipo de processo de tratamento de águas terciárias temos os sistemas baseados em algas, os quais são menos caros e ecologicamente benéficos (VANDAMME et al., 2012).

A relação entre a composição intracelular de nitrogênio e fosfato das microalgas e a capacidade de biorremediação de águas residuais é evidente e pode ser considerada durante a seleção das espécies mais adequadas para este fim, da mesma forma que a concentração da biomassa produzida durante este processo também pode vir a variar de acordo com as características dos efluentes (WHITTON et al., 2016).

No entanto, no tratamento prático dos efluentes, as composições químicas de diferentes fontes de águas residuais variam muito (ABDEL-RAOUF et al., 2012). Por exemplo, as águas residuais produzidas a partir de fazendas de animais são geralmente ricas em amônio e nitrogênio orgânico, enquanto as águas residuais municipais têm menos nitrogênio e fósforo, porém mais metais pesados que as águas residuais agrícolas (CAI et al., 2013).

Hultberg et al. (2016) observaram o elevado potencial das microalgas *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp. na redução das concentrações de fósforo e ortofosfato presentes em águas residuais municipais, e em até 90% as frações de amônio e nitrogênio total após 3 dias do cultivo das mesmas neste tipo de efluente.

Mahapatra, Chanakya e Ramachandra (2014) demonstraram o potencial de biorremediação de um consórcio de algas no tratamento de águas residuais. De acordo com os autores deste estudo a biorremediação através de consórcios de algas atende a múltiplos objetivos de desenvolvimento sustentável que ajudariam no tratamento de efluentes líquidos de lagos e lagoas alimentadas com esgoto, permitindo a descentralização do tratamento de águas municipais com posterior geração de energia através da biomassa produzida.

### **3.6 Métodos de ruptura celular e extração de lipídios**

O princípio de extração de lipídios de microalgas por solventes apolares orgânicos está embasado no conceito da química básica de polaridade: “semelhante dissolve semelhante”. Quando a microalga é exposta a um solvente orgânico neutro, como hexano ou clorofórmio, o solvente penetra através da parede celular no citoplasma e interage com os lipídios neutros através de forças de van der Waals para formar um complexo solvente-lipídio. Esse complexo orgânico solvente-lipídio é conduzido por um gradiente de concentração disperso através da parede celular e de um filme orgânico que envolve a célula. Conseqüentemente, os lipídios

neutros são extraídos para fora da célula, permanecendo dissolvidos no solvente orgânico apolar (ANDRADE; FILHO, 2014).

Ren et al. (2017) obtiveram êxito em promover um incremento da ruptura do material celular da microalga *Chlorella protothecoides*, e conseqüentemente o aumento da liberação de lipídios intracelulares, ao adicionar uma etapa de tratamento com água entre a primeira e segunda etapa de extração com solventes, de quatro métodos clássicos de extração de lipídios, sem alterar a composição dos ácidos graxos extraídos. Segundo os autores deste estudo ao ressuspender as células com água entre as etapas citadas acima ocorreria um aumento da polaridade da mistura de solventes nas extremidades das células, aumentando assim a eficácia da segunda fase de extração em todos os métodos avaliados.

Huang e Kim (2016) desenvolveram uma abordagem simples, eficiente e rápida para colheita e ruptura simultâneas de células de microalgas através do tratamento das mesmas com nanopartículas de óxido de níquel, atingindo uma eficiência na colheita de 98,75% após 1 minuto da adição das nanopartículas a pH 7 e uma elevada eficiência na extração dos lipídios depois de 96 horas de contato da biomassa com as nanopartículas de NiO, demonstrando o potencial deste tipo de material para extração de lipídios de microalgas sem a necessidade do emprego de solventes orgânicos.

Kim et al. (2015) também conseguiram desenvolver um processo simultâneo de colheita e extração de lipídios por meio do emprego de íons de ferro, na forma de  $\text{FeCl}_3$  e  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ , que agiram ao mesmo tempo como coagulantes da biomassa e reagentes de ruptura celular com base na reação do tipo Fenton.

Segundo Araújo et al. (2013) a etapa chave na extração e recuperação de lipídios de microalgas é a ruptura celular, de tal forma que a seleção dos solventes apropriados é fundamental para o processo de extração, uma vez que compromete a estrutura da parede celular assegurando a sua ruptura e, por conseguinte, a extração de lipídios. Sendo que dependendo do pré-tratamento aplicado na concentração de células da biomassa de microalgas, esta pode ser submetida à extração de lipídio na forma concentrada úmida ou em pó seco (ANDRADE; FILHO, 2014).

Lee et al. (2014) demonstraram que o tratamento com ácido hidrotérmico, especialmente quando se tira o máximo proveito dos traços distintos do ácido nítrico, pode ser uma opção plausível para extração de lipídios da biomassa oleaginosa. O ácido nítrico se mostrou um potente catalisador que permitiu a extração efetiva de lipídios da *Nannochloropsis salina* ao mesmo tempo em que controlou as propriedades dos lipídios extraídos.



Lorenzen et al. (2017) otimizaram um processo de extração de lipídios de microalgas por dióxido de carbono supercrítico. Tais frações lipídicas geradas das microalgas por este procedimento cumpriam todas as qualificações para serem empregadas como matéria-prima para formulações de produtos finais, particularmente em aplicações como biolubrificantes e nutracêuticos. Da mesma forma que a inserção de etapas de tratamento com radiação por micro-ondas foi capaz de ampliar a capacidade de extração de lipídios de microalgas de diferentes métodos de extração avaliados (TEO; IDRIS, 2014).

Paudel et al. (2015) avaliaram uma outra alternativa para extração de lipídios de microalgas através da utilização de metanol com CO<sub>2</sub> expandido e CO<sub>2</sub> líquido. De acordo com os autores este método de extração opera a uma temperatura mais baixa e é mais seletivo para ácidos graxos livres e lipídios neutros, além de utilizar menos solvente orgânico. De modo semelhante à extração de lipídios empregando CO<sub>2</sub> de baixa polaridade exibe uma maior seletividade para lipídios neutros.

Olmstead et al. (2013) desenvolveram um método para extração de lipídios da biomassa de microalgas utilizando hexano em baixas proporções de solvente e biomassa, a baixa temperatura (35°C). A utilização de hexano permitiu a recuperação preferencial dos lipídios neutros adequados para a produção de biodiesel e evitou dificuldades associadas à recuperação de solventes polares.

A extração de lipídios das células das microalgas baseada na oxidação a base de persulfato também se apresenta como uma opção, podendo o persulfato substituir o peróxido de hidrogênio por ser suficientemente potente para atingir o efeito desejado e ao mesmo tempo incomparavelmente mais barato (SEO et al., 2016).

Wu et al. (2017) observaram o efeito sinérgico de um passo de pré-tratamento alcalino e subsequente hidrólise enzimática de um método desenvolvida para promover a ruptura da parede celular e posteriormente a extração lipídica da microalga *Nannochloropsis* sp., sendo a protease, a enzima que apresentou um maior efeito hidrolítico dentre as avaliadas.

Outra alternativa para extração de lipídios de microalgas é a utilização de radiação ultrassônica, a qual representa um passo importante no desenvolvimento de novas tecnologias de extração sustentável com tempo e solventes reduzidos (JAESCHKE et al., 2017). O uso de ultrassom favorece a ruptura celular e aumenta o rendimento de lipídios extraídos tornando mais eficientes os métodos de extração que utilizam solventes orgânicos como o clorofórmio e o metanol (DOS SANTOS et al., 2014). A Tabela 2 apresenta os métodos de extração de lipídios com seus respectivos rendimentos em diferentes espécies de microalgas.



Tabela 2: Métodos de extração de lipídios com seus respectivos rendimentos em diferentes espécies de microalgas.

Microalgas	Método de extração de lipídios	Condições de disrupção celular	Rendimento (%)	Referências
<i>Chlorella protothecoides</i>	Acetona + H <sub>2</sub> O	Ultrassom	72,3	Ren et al. (2017)
	Clorofórmio/metanol + H <sub>2</sub> O		35,8	
	Clorofórmio/metanol/H <sub>2</sub> O + H <sub>2</sub> O		60,3	
	Diclorometano + H <sub>2</sub> O		60,9	
<i>Scenedesmus</i> sp.	Hexano	CO <sub>2</sub> supercrítico (a 20°C), 100 (CO <sub>2</sub> /biomassa)	8,3	Lorenzen et al. (2017)
<i>Heterochlorella luteoviridis</i>	Etanol a 75%	Ultrassom (intensidade 100%)	81	Jaeschke et al. (2017)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	–	Pré-tratamento alcalino (pH 10,5, 110°C, 4 h) seguido de lise enzimática (pH 4,0, 50°C, dosagem 200 IU/g, 30 min)	90	Wu et al. (2017)
<i>Chlorella vulgaris</i>	–	Nanopartículas de NiO	91,08	Huang e Kim (2016)
<i>Chlorella</i> sp.	–	Oxidação a base de persulfato	95	Seo et al. (2016)
<i>Botryococcus braunii</i>	CO <sub>2</sub> líquido Metanol com CO <sub>2</sub> expandido	–	23	Paudel et al. (2015)
			24	
<i>Chlorella</i> sp.	–	FeCl <sub>3</sub> Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	92,07 ± 0,47 92,47 ± 0,84 e 85,59 ± 0,33	Kim et al. (2015)
<i>Nannochloropsis salina</i>	–	HNO <sub>3</sub> hidrotérmico		Lee et al. (2014)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Isopropanol/Hexano	Irradiação por micro-ondas a 65°C	8,47%	Teo e Idris (2014)
<i>Tetraselmis</i> sp.	Metanol/Clorofórmio		8,19%	
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Hexano	Homogeneização de alta pressão	86	Olmstead et al. (2013)

### **3.7 Bligh e Dyer**

O método de extração desenvolvido por Bligh e Dyer (1959) encontra aceitação geral como procedimento padrão para recuperação de lipídios totais, sendo este método dependente de clorofórmio e metanol, para formar um sistema de solventes monofásicos, com o intuito de extrair e dissolver os lipídios. Um sistema bifásico é então produzido em um passo de purificação pela adição de água, levando à separação de compostos polares e não polares em uma fase superior (aquosa) e inferior (orgânica) respectivamente (AXELSSON; GENTILI, 2014). Este método pode ser empregado para a extração de lipídios de qualquer tipo de tecido contendo até 80% de água (IVERSON; LANG; COOPER, 2011).

A adição de cloreto de potássio no passo de separação pode modificar a distribuição de lipídios entre as duas fases e às vezes é considerada como uma substância que favorece a troca lipídica entre a fase aquosa e a fase orgânica. Supõe-se que este fenômeno ocorra devido à geração de cátions pelos sais (cloreto de potássio) que diminuíram a dissociação de lipídios por um efeito de ação em massa, que, portanto, deslocam os mesmos para a fase orgânica, mantendo os sais na fase aquosa (BREIL et al., 2017).

A utilização de uma mistura de metanol e clorofórmio (1:1) como solventes para extração de lipídios é a mais adequada devido ao seu custo reduzido e maior rendimento lipídico em comparação com, por exemplo, o n-hexano (LEE et al., 2010).

### **3.8 Irradiação por micro-ondas na ruptura celular de microalgas**

As micro-ondas revelam características de aquecimento uniforme e rápido, pouco consumo de solventes e curto tempo de extração (ENCINAR; GONZÁLEZ; REINARES, 2007). Esta tecnologia gera ondas de alta frequência, que destroem as células por meio da indução de choque, tornando este, um método eficiente para a disrupção das células de plantas contendo óleo (AMARO; GUEDES; MALCATA, 2011). Sendo assim este passo de tratamento com disrupção celular pode ter um impacto sobre a extratibilidade e o rendimento lipídico de microalgas (RANJAN; PATIL; MOHOLKAR, 2010). A Tabela 2 demonstra os rendimentos de lipídios extraídos de diferentes microalgas por meio de métodos de extração, empregando como método de disruptura celular, a irradiação por micro-ondas.

Tabela 2: Rendimentos de lipídios extraídos de diferentes espécies de microalgas empregando a irradiação por micro-ondas nos métodos de extração.

Microalga	Método de extração	Método de ruptura celular	Rendimento de lipídios extraídos (%)	Referências
<i>Chlorella</i> sp.			3,80	Drira et al., 2016
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Bligh e Dyer	Irradiação por micro-ondas	4,16	Teo e Idris (2014)
<i>Tetraselmis</i> sp.			7,5	Teo e Idris (2014)

### 3.8 Usos da fração lipídica das microalgas

#### 3.8.1 Produção de biodiesel

A biomassa de microalgas tornou-se cada vez mais importante como fonte alternativa de combustíveis renováveis, ganhando atenção devido à maior demanda de energia e ao aumento da população mundial ao longo de décadas (BARREIRO et al., 2014). Devido ao fato de ser possível obter uma maior produtividade de conteúdo lipídico destes microrganismos, em comparação com outras culturas energéticas à base de lipídios, esses organismos tornam-se atrativos para serem utilizados como matéria-prima para a produção de biodiesel (YEH; CHANG, 2012).

Uma grande diferença entre os ésteres metílicos de algas e dos ésteres metílicos de ácidos graxos derivados de óleos vegetais mais comuns é que alguns lipídios de algas contêm uma quantidade substancial de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa. Os ácidos graxos de cadeia poli-insaturados são melhores que os ésteres metílicos de ácidos graxos em termos de propriedades de combustível, incluindo o número de cetano, a estabilidade à oxidação e as propriedades de fluxo a frio (DAI; CHEN; CHEN, 2014).

Diante disto iniciou-se a utilização de óleos microalgais como matéria-prima para a produção de biodiesel, foi possível, submetendo estes óleos a processos de transesterificação assistida por micro-ondas, com o emprego de metanol e hidróxido de potássio como catalisadores destas reações (GÜLYURT; ÖZÇIMEN; İNAN, 2016).

Cheng et al. (2014) obtiveram em seu estudo um biodiesel de alta qualidade a partir da biomassa úmida da microalga *Nannochloropsis oceanica* através de um processo de cogeração de biodiesel e biocombustível, sendo a transesterificação dos óleos extraídos da mesma, realizada por irradiação de micro-ondas.

### 3.8.2 Atividade antimicrobiana de lipídios de microalgas

Najdenski et al. (2013) observaram em seu estudo que os lipídios da *Rhodella violacea* e *Scenedesmus obliquus* são capazes de inibir o crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Enquanto os ácidos graxos isolados da *Coelastrella* sp., *Rhodella violacea* e *Chlorella* sp. apresentam uma grande atividade inibitória contra *Staphylococcus aureus* e uma pequena atividade contra *Streptococcus pyogenes*.

Meizoso et al. (2010), por sua vez, atribuíram a atividade antimicrobiana da fase vermelha da microalga *Haematococcus pluvialis* aos ácidos graxos de cadeia curta presentes nos extratos obtidos da mesma, sendo que não houve nenhuma relação entre a temperatura aplicada durante o processo de extração e a atividade antimicrobiana do produto final. Guedes et al. (2011) demonstraram que o extrato da microalga *Scenedesmus obliquus* é capaz de inibir completamente o crescimento das bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas* sp. Da mesma forma que a atividade antimicrobiana do extrato intracelular da *Chlorella vulgaris* se mostrou eficaz contra *Staphylococcus aureus*, enquanto que o extrato intracelular da *Scenedesmus obliquus* B apresentou um caráter de inibição médio frente à *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, sendo os melhores desempenhos relatados atribuídos a uma alta produtividade de ácidos graxos de cadeia longa por parte destas microalgas.

Santoyo et al. (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana de diferentes extratos líquidos pressurizados obtidos da microalga *Haematococcus pluvialis* frente a vários microorganismos de importância para a indústria alimentícia (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*). Os resultados indicaram que a maioria dos extratos ativos, em termos de atividade antimicrobiana, foram aqueles obtidos a partir da fase vermelha da microalga, utilizando etanol como solvente de extração a temperaturas de 100°C e 150°C. Após a caracterização por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) os autores deduziram que o ácido butanoico e o lactato de metilo foram os principais compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos, perante as estirpes testadas.

### 3.8.3 Potencial alimentar e nutracêutico

Existe um enorme potencial para uma extensa variedade de espécies de microalgas a serem utilizadas na nutrição humana, como os ácidos graxos poli-insaturados, os quais

também proliferam em muitas espécies de algas, fornecendo ácidos graxos essenciais, necessários para a saúde cardiovascular, ocular e neurológica (KENT et al., 2015).

Os ácidos graxos de alto valor, como o ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA), ácido  $\gamma$ -linolênico (GLA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosa-hexaenoico (DHA) e outros ácidos graxos poli-insaturados obtidos a partir de células microalgais vem sendo utilizados como alimentos e nutracêuticos (YU-AN et al., 2014).

O óleo de microalgas com alto teor de DHA obtido da aquicultura tem sido usado como alternativa na indústria alimentar, devido às questões associadas ao DHA de fontes de frutos do mar, os quais carregam consigo o odor e o sabor desagradáveis dos peixes e a presença de poluentes orgânicos persistentes no óleo destes (RAWN et al., 2009).

#### **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

Os materiais e métodos, assim como os resultados, discussões e conclusões serão apresentados na forma de um artigo científico, o qual será submetido à revista *Journal of Microbiological Methods*, Qualis A2, da área de Engenharias I da CAPES.

# “COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE RUPTURA CELULAR E EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS DE BIOMASSA PERIFÍTICA”

Felipe Ziemann<sup>a</sup>, Lisianne Brittes Benitez<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Acadêmico do Curso de Farmácia da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC)

<sup>b</sup> Docente do Curso de Farmácia da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), Rio Grande do Sul, Brasil

## Resumo

As microalgas apresentam uma produtividade, em termos de biomassa extremamente alta, sendo algumas destas capazes de alcançar um conteúdo lipídico de 50% a 80%. Para melhorar o rendimento na extração de lipídios das células microalgais é necessário otimizar todos os parâmetros envolvidos, com relação aos solventes empregados e a ruptura da parede celular. Estudos anteriores demonstraram a eficiência do emprego da irradiação por micro-ondas em incrementar o rendimento de lipídios extraídos, por promover a rupturas destas células. O objetivo deste estudo foi desenvolver um método de disrupção celular com irradiação por micro-ondas a partir de uma amostra de biomassa de um perifíton e compará-lo ao método de ultrassom (Bligh & Dyer adaptado). O método de extração empregando a disrupção celular por micro-ondas apresentou um rendimento lipídico de 6,27%, com um menor tempo de extração (economia de 5 horas e 50 minutos) e um gasto menor com solventes (economia de 1 mL de metanol e 7 mL de clorofórmio) do que o método de extração utilizando o ultrassom, para promover a ruptura celular, o qual apresentou um rendimento de 9,17%. Com relação ao perfil lipídico, os métodos de extração testados, empregando a tecnologia de micro-ondas, para incrementar a ruptura celular, foram qualitativamente idênticos. O perfil lipídico do método de extração empregando a disrupção celular por ultrassom se mostrou diferente em relação ao método com micro-ondas, devido surgimento de outros dois ácidos graxos (C12:0 e C18:0 n-6 isômero). A análise das superfícies de resposta das variáveis avaliadas revelou que o tempo de extração de 15 minutos, o emprego de 300 mg de biomassa e a proporção de metanol/clorofórmio (2:1) promovem a obtenção de um rendimento de lipídios extraídos maior a partir da biomassa empregada neste estudo. Sendo assim, a extração de lipídios com a disrupção celular por micro-ondas pode vir a ser empregado como uma alternativa para substituir os métodos que utilizam a sonicação, como forma de promover a disrupção celular, devido à economia de tempo, mão-de-obra e gastos com solventes proporcionados pelo método desenvolvido neste estudo.

**Palavras-chave:** ruptura celular, irradiação por micro-ondas, microalgas, ácidos graxos.

## 1. Introdução

As microalgas apresentam uma produtividade, em termos de biomassa, extremamente alta (algumas cepas são capazes de reproduzir mais de três vezes por dia). Dentre estas,

existem microalgas selvagens capazes de alcançar um conteúdo lipídico de mais de 50%, enquanto outras espécies que foram geneticamente modificados ou sofreram algum tipo de estresse durante o crescimento podem ter um teor de lipídios superior a 80% da biomassa total (Ríos et al., 2013).

O mecanismo de extração deste conteúdo lipídico pode ocorrer por difusão através da parede celular quando a biomassa é suspensa em um solvente com alta afinidade pelo teor de lipídios e/ou pela ruptura física das paredes celulares, sendo que para melhorar a extração lipídica, todos esses parâmetros devem ser otimizados (Ranjan et al., 2010).

Entretanto a membrana plasmática destes organismos unicelulares é protegida por uma parede celular complexa (Arnold et al., 2015). As paredes celulares das microalgas exibem uma grande diversidade, variando em componentes moleculares, ligações intra e intermoleculares e a estrutura em geral (Work et al., 2013). Os constituintes mais comuns nas paredes celulares das microalgas são lipídios, celulose, proteínas, glicoproteínas e polissacarídeos. Os componentes fundamentais da parede celular incluem uma rede microfibrilar, na forma de um gel, dentro de uma matriz proteica (Yap et al., 2016).

O passo de extração de lipídios inclui a disrupção destas paredes celulares por métodos físico-químicos e biológicos e a posterior coleta dos lipídios por solventes. No entanto, as paredes celulares fortes e multicamadas de algumas espécies de microalgas inibem a entrada de solventes orgânicos convencionais nas células, como o hexano, diminuindo assim a eficiência de extração (Kim et al., 2016; Praveenkumar et al., 2015).

Muitos métodos de ruptura da parede celular, incluindo moagem com grânulos, homogeneização de alta pressão, cavitação hidrodinâmica, tratamento de campo eletrônico ultrassônico/micro-ondas/pulsado, explosão de vapor, bem como solventes, líquidos iônicos, choque osmótico, surfactantes, enzimas hidrolíticas e tratamento algicida, entre outros, foram experimentados com várias microalgas para maximização das eficiências de extração de lipídios (Lee et al., 2017).

O tratamento com ultrassom altera as estruturas celulares por dois mecanismos principais: a cavitação, seguida da propagação das ondas de choque. O último fenômeno forma fluxos de jatos no meio circundante, causando assim a ruptura celular por forças de cisalhamento de alta resistência (Gerde et al., 2012; Gunerken et al., 2015).

O tratamento com micro-ondas, por sua vez, é um método onde não há o contato direto com a amostra, sendo todos os reagentes alvos aquecidos simultaneamente. As principais vantagens do tratamento com irradiação por micro-ondas são o curto tempo de



processamento, alta eficiência de disrupção e um consumo de energia relativamente baixo (Cheng et al., 2013).

O tratamento com micro-ondas já foi utilizado para facilitar a extração de lipídios de microalgas verdes, empregando diferentes métodos de extração com solventes, sendo os maiores rendimentos, obtidos através da inserção de etapas de disrupção celular com irradiação por micro-ondas (Lee et al., 2010). Da mesma forma que a adição de etapas de tratamento, utilizando esta mesma de tecnologia, foi capaz de ampliar a capacidade de extração de lipídios de microalgas, utilizando diferentes métodos de extração (Teo e Idris, 2014).

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo desenvolver um método de disrupção celular por irradiação com micro-ondas para a extração de lipídios, comparando-o com um método de ruptura celular por ultrassom (Bligh e Dyer adaptado), a partir da biomassa de um perifíton.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Biomassa empregada**

A biomassa empregada neste estudo foi proveniente de um sistema de biorremediação (*Algal Turf Scrubber*), localizado as margens do Lago Dourado, no município de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul. As amostras utilizadas foram previamente secas em estufa, a uma temperatura de 50 °C até peso constante.

### **2.2 Otimização dos ensaios de extração de lipídios com disrupção celular por micro-ondas**

Partindo de um planejamento fatorial de 2<sup>3</sup>, conforme Filho (2017), buscou-se obter uma técnica mais eficaz para a extração de lipídios, empregando a irradiação por micro-ondas, como uma forma de incrementar a ruptura celular da biomassa utilizada neste estudo. Na etapa de disrupção celular foi empregado um equipamento de micro-ondas (CEM, Discover System) a uma temperatura de 65 °C e uma potência de 200 W. Após o transcorrer dos respectivos tempos de exposição à irradiação por micro-ondas, as amostras foram centrifugadas (3600 rpm) por 10 minutos, sendo as fases aquosas removidas, com a posterior filtração das fases orgânicas com o auxílio de papéis filtros. As amostras filtradas foram secas em estufa a 70 °C até peso constante. A Tabela 1 demonstra os níveis das variáveis utilizadas no processo de extração.

**Tabela 1**

Especificação dos níveis das variáveis empregadas no processo de extração.

Variáveis	Níveis	
	-1	+1
Biomassa (mg)	300	500
Tempo (min)	5	15
Proporção de Metanol/Clorofórmio	2:1	1:2

Cada um dos oito experimentos, previamente definidos a partir do planejamento fatorial  $2^3$  foi realizado em triplicata para a posterior determinação dos seus respectivos rendimentos por método gravimétrico, conforme a equação:

$$R = \frac{(F2 - F1). 100}{m}$$

Onde:

R = rendimento de lipídios totais extraídos (em % de biomassa seca);

F1 = massa do balão de fundo redondo vazio (mg);

F2 = massa do balão de fundo redondo + lipídios totais (mg);

m = massa da amostra de biomassa seca (mg);

### 2.3 Bligh e Dyer adaptado com ruptura celular por ultrassom

Inicialmente pesou-se 300 mg da biomassa em um tubo cônico ao qual foi adicionado 6 mL de  $\text{CHCl}_3$  e 3 mL de MeOH. Este tubo cônico passou então por um processo de ruptura por ultrassom, com banho de gelo, durante 45 minutos, permanecendo posteriormente em repouso por 4 horas sobre refrigeração (método original preconiza um tempo de refrigeração de 12 horas). Após o transcorrer deste tempo, o mesmo passou novamente por um processo de sonicação por 30 minutos, seguido de uma etapa de centrifugação a 3600 rpm por 10 minutos. A fase lipídica foi separada em outro recipiente, sendo adicionado a biomassa residual 1 mL de  $\text{CHCl}_3$  e 2 mL de MeOH. Este tubo cônico contendo a biomassa residual passou novamente por processos de sonicação e centrifugação, respectivamente, ambos por 15 minutos. A fase lipídica foi separada, sendo incorporada a fase orgânica removida anteriormente. A este recipiente contendo o somatório das fases lipídicas foi adicionado 4 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura e 2 mL de  $\text{CHCl}_3$ , passando o mesmo, em seguida, por

uma etapa de centrifugação por 10 minutos. Após o processo de centrifugação, transferiu-se a fase lipídica para um balão de fundo redondo, o qual foi seco posteriormente em estufa a 70 °C até peso constante.

O método de Bligh e Dyer (1959) adaptado com ruptura celular por ultrassom foi realizado em triplicata para determinação do rendimento de lipídios extraídos, por análise gravimétrica, conforme a equação empregada no método anterior, sendo este utilizado como referência na comparação com a técnica de ruptura celular com micro-ondas, desenvolvido neste estudo.

#### 2.4 Derivatização

As derivatizações das amostras de lipídios extraídos pelos métodos de Bligh e Dyer (1959) adaptado e pelo método desenvolvido neste projeto foram realizadas conforme os métodos da AOCS modificado por Gressler (2011) e adaptado para as condições do presente estudo.

Para a realização da técnica de derivatização foram empregadas as amostras de lipídios, contidas nos balões de fundo redondo de 25 mL, utilizados para a determinação dos rendimentos das frações lipídicas extraídas, sendo transferidos os conteúdos dos três balões para um único balão de fundo redondo de 50 mL com o auxílio de 6 mL de uma solução metanólica (hidróxido de sódio e metanol na proporção de 1:50).

Em seguida efetuou-se o aquecimento dos mesmos em sistemas de refluxo durante 20 minutos. Após este tempo adicionou-se 7 mL de uma solução de trifluoreto de boro-metanol (BF<sub>3</sub>/metanol), gota a gota, através dos condensadores destes sistemas, deixando em refluxo por mais 4 minutos. A seguir acrescentou-se via condensadores 5 mL de heptano, deixando as amostras em refluxo por mais 2 minutos.

Passado este tempo, os balões foram retirados dos sistemas de refluxo e deixados esfriar até alcançarem a temperatura ambiente, para que então ocorresse a transferência dos produtos do processo de derivatização para tubos de ensaio, aos quais se adicionou 2 mL de uma solução saturada de NaCl. Coletou-se, em seguida, a fase superior de cada uma das amostras contidas nos tubos de ensaio, transferindo-as para frascos de vidro. A estes frascos de vidro foram adicionados uma ponta de espátula de sulfato de sódio anidro, previamente ativado em estufa a 100 °C, durante uma hora. Por último diluiu-se 500 µL de cada um dos extratos obtidos com 500 µL de n-Hexano em *vials* para posterior análise cromatográfica.

## 2.5 Identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos

As análises para identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos presentes nos lipídios extraídos foram realizadas em um cromatógrafo gasoso equipado com Injetor Automático AOC5000. As amostras derivatizadas foram analisadas por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa pelo método AOCS (Ce 1c-89), modificado por AOCS (2008). As condições de aquecimento da coluna ZB-WAX (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) foram de 70 °C (0,1 min) aquecendo até 240 °C (4 °C min<sup>-1</sup>), permanecendo o aquecimento por 5 minutos e depois por mais 5 minutos a 250 °C. No detector de massas a temperatura da fonte de ionização e a temperatura de interface foram de 260 °C. O sistema de injeção foi utilizado no modo *split* (1:10) a 250 °C e o detector de massas foi mantido no modo *scan*. A mistura de padrões e amostras foi injetada em duplicata em alíquotas de 1 µL para identificação dos ésteres metílicos presentes. Estimaram-se a partir das áreas de cada um dos picos nos cromatogramas, as porcentagens de cada ácido graxo presente nos extratos analisados, sendo necessário para isso, excluir os demais picos que não representavam quaisquer ácidos graxos.

## 2.6 Análise dos dados

A análise dos rendimentos de lipídios extraídos pelos métodos empregados neste estudo foi realizada no programa Microsoft Excel® 2010, para a determinação das médias dos rendimentos de lipídios extraídos, bem como dos seus respectivos desvios padrões e coeficientes de variação.

Os principais efeitos entre as variáveis em estudo foram determinados por meio do teste *t*-Student, considerando os efeitos estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ , empregando o *software* Chemoface (versão 1.5). Este mesmo *software* foi utilizado para avaliar a relação entre as variáveis estudadas através da geração de diferentes gráficos de superfície de resposta.

## 3 Resultados e Discussões

### 3.1 Comparação dos métodos de extração de lipídios

Foi obtido um rendimento maior de lipídios extraídos no experimento 7 (6,27%), em comparação com os demais ensaios realizados, a partir do planejamento fatorial 2<sup>3</sup>, na otimização da extração de lipídios, empregando a disruptão por irradiação com micro-ondas (Tabela 2). Tal rendimento foi superior aos rendimentos de lipídios obtidos por Teo e Idris

(2014), 4,16%, e Drira et al. (2016), 3,8%, os quais empregaram diferentes variações do método extração de Bligh e Dyer, com o incremento da ruptura celular por micro-ondas, utilizando como amostras de biomassa, as microalgas *Nannochloropsis* sp. e *Chlorella* sp., respectivamente. Entretanto o rendimento encontrado no experimento 7 foi inferior ao rendimentos de lipídios extraídos, por variações do método de Bligh e Dyer com irradiação por micro-ondas, obtidos por Qv et al. (2014), 57,02%, Mandal et al. (2013), 11,7%, e Lee et al. (2010), 28,6%, empregando amostras de biomassa das microalgas *Dunaliella tertiolecta*, *Scenedesmus obliquus* e *Botryococcus* sp., respectivamente. O conteúdo lipídico presente nas microalgas tende a variar de acordo com a espécie, os níveis de nutrientes, o tipo de cultivo utilizado na produção da biomassa (Chisti, 2007; Khan et al., 2009; Mata; Martins; Caetano, 2010). Isto explica o porquê da variação dos rendimentos de lipídios extraídos pelos métodos citados acima.

O experimento realizado pelo método de Bligh e Dyer adaptado com etapas de ruptura celular por ultrassom apresentou um rendimento maior de lipídios extraídos (9,17 %) em comparação com o experimento 7 citado anteriormente (Tabela 2). Porém, para alcançar tal resultado, foram gastos 7 mL de clorofórmio, 1 mL de metanol e um tempo de 5 horas e 50 minutos a mais do que no experimento 7. Este tempo excessivo destinado aos procedimentos de extração de lipídios de microalgas por métodos convencionais, como o Bligh e Dyer adaptado, representa uma grande limitação deste tipo de técnica, o que dificulta o processamento de um grande número de amostras (Rawat et al., 2013).

**Tabela 2**

Experimentos de extração de lipídios realizados pelos métodos de Bligh e Dyer adaptado e com irradiação por micro-ondas, com seus respectivos rendimentos, desvios padrão e coeficientes de variação.

Método de ruptura celular	Experimento	Biomassa (mg)	Tempo de irradiação (min)	Proporção MeOH/CH <sub>2</sub> Cl (mL)	Média de rendimento (%), n=3	Desvio Padrão (DP)	Coefficiente de Variação (CV)
Irradiação por micro-ondas	1	300	5	1:2	5,66	0,55	9,75
	2	500	5	1:2	1,59	0,53	33,14
	3	300	5	2:1	5,35	0,68	12,64
	4	500	5	2:1	4,53	0,19	4,25
	5	300	15	1:2	4,29	1,21	28,18
	6	500	15	1:2	5,28	1,59	30,16
	7	300	15	2:1	6,27	0,93	14,89
	8	500	15	2:1	3,42	0,44	12,78
Ultrassom	1	300	-	1:2	9,17	0,24	2,63

### 3.2 Comparação do perfil lipídico entre os métodos de extração

Com relação ao perfil lipídico, o mesmo foi qualitativamente idêntico entre os experimentos empregando irradiação por micro-ondas. Porém, na análise do extrato obtido pela tecnologia de ultrassom foi possível observar a presença de outros dois ácidos graxos (C:12 e C18:0 n-6 isômero) a mais na amostra de biomassa em estudo (Tabela 2). Segundo Halim et al. (2011) a alteração das condições de extração altera o perfil de ácidos graxos obtidos, o que explica o porquê dos diferentes resultados encontrados em nosso estudo, a partir dos métodos de extração empregado. O mesmo foi descrito por Li et al. (2014) ao compararem diferentes métodos de extração de lipídios de microalgas, os quais perceberam haver uma variação na recuperação de lipídios, bem como sobre o perfil de ácidos graxos.

A análise da estimativa percentual de cada ácido graxo presente nos extratos avaliados, demonstrou haver uma variação nas quantidades destes, em todos os experimentos. Sendo o ácido palmítico, o ácido graxo que se apresentou em maior quantidade em todos os ensaios com irradiação por micro-ondas, bem como no método de Bligh e Dyer adaptado (Tabela 2). Segundo Carta et al. (2015), o ácido palmítico é o ácido graxo mais comum encontrado no corpo humano, representando 20-30% dos ácidos graxos totais em fosfolipídios de membrana e triacilgliceróis do tecido adiposo, sendo o mesmo responsável por exercer múltiplas funções biológicas fundamentais, nos níveis celular e tecidual. Isto indica a possibilidade de utilização dos óleos provenientes desta biomassa para a produção de suplementos alimentares.

A irradiação por micro-ondas produz um baixo porcentual de ésteres metílicos com mais de 19 carbonos em comparação com métodos convencionais de extração, o que permite a obtenção de um biodiesel de baixa viscosidade e, portanto, um produto de boa qualidade (Teo e Idris, 2014). Este fenômeno foi observado em parte, nos extratos obtidos neste estudo, onde os ácidos araquídico (C20:0) e behênico (C22:0) estavam presentes em percentuais baixos, variando entre 0,8% e 1,27%, em todos os experimentos de extração com disrupção por irradiação de micro-ondas, indicando a possibilidade de utilização dos óleos obtidos neste estudo, por meio do emprego desta tecnologia, para a produção de biodiesel.

**Tabela 3**

Perfil de ácidos graxos obtidos a partir dos extratos provenientes dos experimentos de extração de lipídios realizados, com suas respectivas estimativas de porcentagem para cada ácido graxo.

Ácidos graxos	Simbologia	Ex:1	Ex:2	Ex:3	Ex:4	Ex:5	Ex:6	Ex:7	Ex:8	B e D
		R (%)	R (%)	R (%)	R (%)	R (%)	R (%)	R (%)	R (%)	R (%)
Láurico	C:12	-	-	-	-	-	-	-	-	5,39
Mirístico	C14:0	11,22	12,32	10,68	10,54	7,52	10,37	9,89	11,27	12,68
Pentadecílico	C15:0	2,05	1,97	1,98	2,37	1,98	2,10	1,94	2,57	1,43
Palmítico	C16:0	41,47	45,31	40,34	37,52	59,65	37,71	38,32	40,24	33,56
Palmitoleico	C16:1 n-7	6,42	0,19	6,09	6,62	0,19	6,08	5,80	6,91	3,54
Margárico	C17:0	0,94	0,90	0,91	1,2	2,57	0,89	0,66	1,33	1,63
$\alpha$ -Linolênico*	C18:3 n-3	2,27	2,27	2,64	2,54	5,84	2,98	2,79	0,44	3,37
Estearico	C18:0	9,96	10,46	9,78	10,50	11,34	9,58	9,35	11,95	14,17
Oleico	C18:1 n-9	14,43	15,22	14,89	13,93	6,44	14,33	14,67	6,23	3,81
Linoleico*	C18:2 n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	7,28
$\alpha$ -Linolênico	C18:3 n-3	7,72	7,73	8,72	7,59	0,10	9,95	8,99	10,29	7,98
Araquídico	C20:0	0,80	0,80	0,83	1,09	0,86	0,79	0,81	1,15	0,80
Araquidônico	C20:4 n-6	4,06	4,25	4,74	4,81	1,51	7,39	5,86	6,36	1,07
Behênico	C22:0	0,92	0,86	1,03	1,27	2,00	0,81	0,91	1,27	3,30

\* = isômero

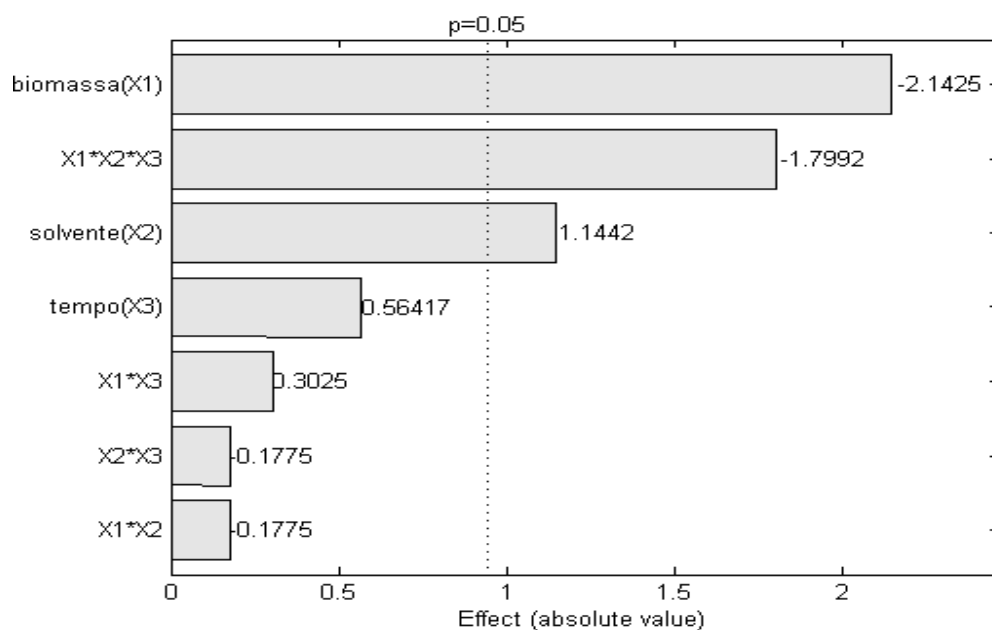
R = rendimento de lipídios extraídos da biomassa em estudo

Ex = experimento

B e D = Bligh e Dyer adaptado

### 3.3 Análise dos efeitos

As interações entre as variáveis, biomassa e solvente, biomassa e tempo, tempo e solvente, bem como a variável tempo de forma isolada, apresentaram-se como os efeitos estatisticamente significativos, sobre o rendimento de lipídios extraídos nos experimentos realizados com a inserção da irradiação por micro-ondas, no incremento da ruptura celular, da biomassa em questão, no nível de confiança de 95%, conforme a Fig. 1.

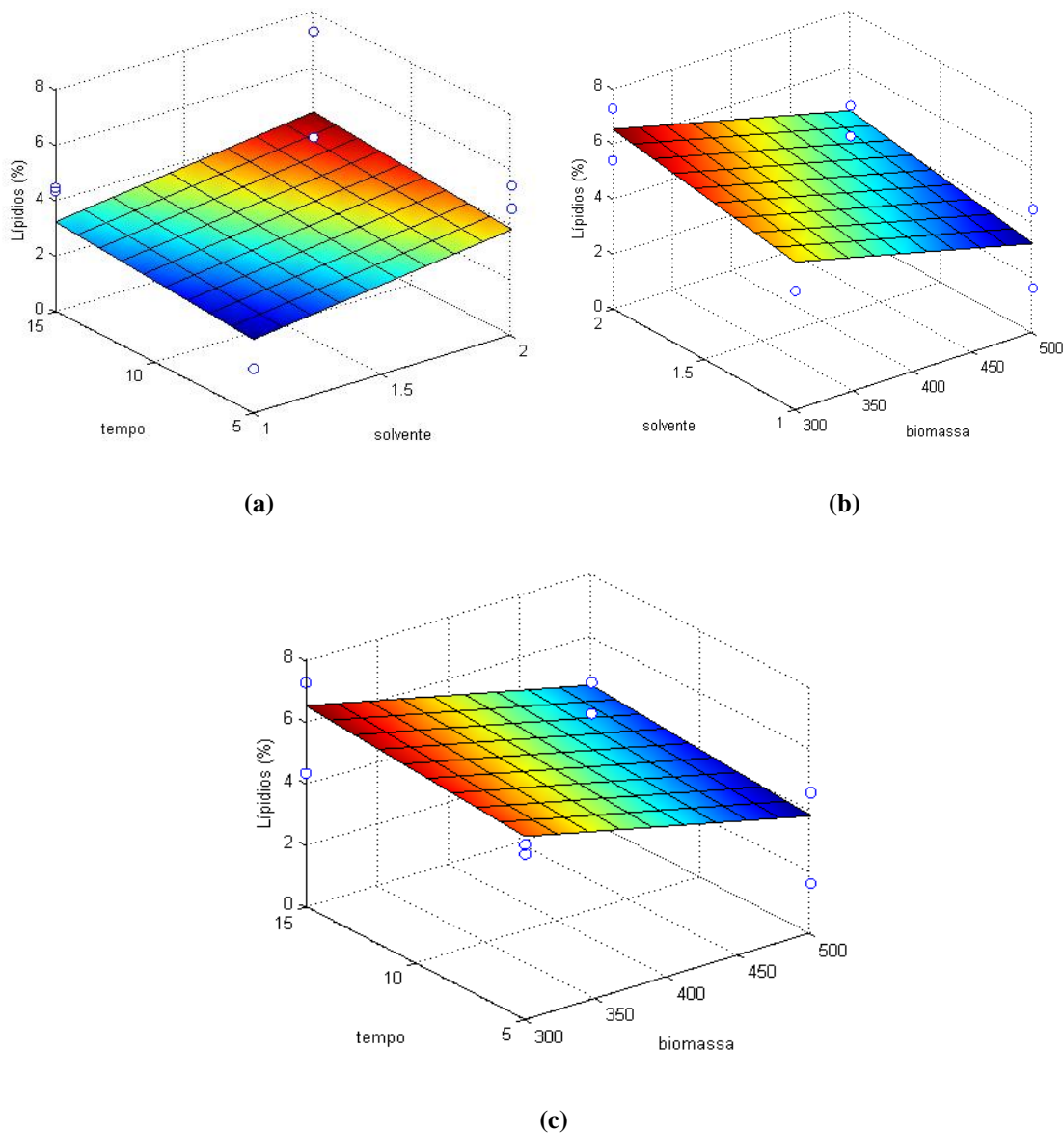


**Fig. 1.** Gráfico de Pareto dos efeitos entre as interações das variáveis empregadas e de forma isolada, sobre o rendimento de lipídios extraídos pelo método de extração com disruptura celular por irradiação de micro-ondas.

As interações entre a quantidade de biomassa, proporção dos solventes e o tempo de extração, sobre o rendimento de lipídios extraídos pelo método de extração com disruptura celular por micro-ondas, são demonstrados na forma de gráficos de superfície de resposta na fig.4. Por meio destes gráficos é possível observar uma melhor resposta, com relação ao rendimento de lipídios extraídos, nos experimentos que empregaram um tempo de extração maior (15 minutos), uma quantidade menor de biomassa (300 mg) e uma proporção maior de metanol. Uma hipótese para a obtenção de melhores resultados com a utilização de uma quantidade menor de biomassa poderia ser o fato desta, em maior quantidade, ter comprometido o sistema de agitação do equipamento de micro-ondas, diminuindo a superfície de contato dos solventes com a mesma, e consequentemente reduzindo a eficácia do processo de extração dos lipídios. Este mesmo fenômeno foi observado por Axelsson e Gentili. (2014), os quais ao compararem diferentes métodos de extração de lipídios de microalgas com a inserção de irradiação por microondas, incluindo o método de Bligh e Dyer, observaram uma redução dos rendimentos de lipídios extraídos, a medida em que as amostras de biomassa de microalgas eram empregadas em quantidades maiores. Os mesmos realizaram uma análise para determinação do limite de tamanho da amostra, para um sistema de extração por solventes, com um volume máximo de 10 mL (semelhante ao volume máximo do micro-ondas empregado em nosso estudo), a qual revelou que os mesmos poderiam extrair até 300 mg e 90 mg de biomassa úmida e seca, respectivamente, por vez, sem prejudicar o rendimento



de lipídios extraídos. Um tempo maior de extração (20 min) foi associado a um rendimento maior de lipídios extraídos (3,8%) no estudo realizado por Drira et al. (2016), os quais também empregaram uma variação do método de Bligh e Dyer, com a inserção de irradiação por micro-ondas, testando tempos de extração de 5 e 20 minutos. Smedes e Askland (1999), por sua vez, testaram várias proporções de clorofórmio e metanol, descritas pelo método de Bligh e Dyer, e sugeriram que o rendimento de lípidos poderia ser aumentado usando um teor maior de metanol, assim como ocorreu em nosso estudo.



**Fig. 4.** Gráficos de superfície de resposta sobre os efeitos das interações entre (a) o tempo de extração e proporção dos solventes; (b) proporção dos solventes e quantidade de biomassa; (c) tempo de extração e quantidade de biomassa sobre a porcentagem de lipídios extraídos pelo método de extração com disruptura celular por irradiação de micro-ondas.

## 4 Conclusões

Em nosso estudo obtivemos êxito em desenvolver um método de ruptura celular com irradiação de micro-ondas, como forma de incrementar a extração de lipídios, o qual apresentou um desempenho satisfatório, comparado ao método de ruptura celular por sonicação, uma vez que, em nossa técnica utilizamos menos da metade da quantidade de solventes empregados por este método, além de um tempo muito menor de extração. O perfil de ácidos graxos permaneceu qualitativamente inalterado em todos os experimentos nos quais utilizamos a irradiação por micro-ondas, sendo este perfil lipídico diferente no método de extração de Bligh e Dyer adaptado empregando o ultrassom, como forma de promover a ruptura celular da biomassa em estudo, devido ao surgimento de outros dois ácidos graxos (C:12 e C18:0 n-6 isômero). Na análise dos efeitos de resposta das diferentes variáveis empregadas no método de ruptura por irradiação de micro-ondas foi possível observar que os resultados mais satisfatórios foram obtidos utilizando um tempo de extração e proporção de metanol maiores, em concomitância com uma quantidade menor de biomassa. Sendo assim, a extração de lipídios com a ruptura celular por micro-ondas pode vir a ser empregado como uma alternativa para substituir os métodos que utilizam a sonicação, como forma de promover a ruptura celular, devido à economia de tempo, mão-de-obra e gastos com solventes proporcionados pelo método desenvolvido neste estudo.

## Referências

American Oil Chemists' Society, 2008. Official methods and recommended practices of the AOCS. 5. ed. Champaign: American Oil Chemists' Society.

Arnold, A.A., Genard, B., Zito, F., Tremblay, R., Warschawski, D.E., Marcotte, I., 2015. Identification of lipid and saccharide constituents of whole microalgal cells by <sup>13</sup>C solid-state NMR. *Biochim. Biophys. Acta*, 1848, 369-377. [10.1016/j.bbamem.2014.07.017](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.07.017)

Axelsson, M., Gentili, F., 2014. A Single-Step Method for Rapid Extraction of Total Lipids from Green Microalgae. *PLoS ONE*, 9 (2), e89643. [10.1371/journal.pone.0089643](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089643).

Bligh, E. G., Dyer, W. J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37 (8), 911-917. [10.1139/o59-099](https://doi.org/10.1139/o59-099).

Carta, G., Murru, E., Lisai, S., Sirigu, A., Piras, A., Collu, M., 2015. Dietary triacylglycerols with palmitic acid in the sn-2 position modulate levels of N-acyl ethanolamides in rat tissues. *PLoS ONE*, (10), e0120424. [10.1371/journal.pone.0120424](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120424).

Cheng, J., Sun, J., Huang, Y., Feng, J., Zhou, J., Cen, K., 2013. Dynamic microstructures and

fractal characterization of cell wall disruption for microwave irradiation-assisted lipid extraction from wet microalgae. *Bioresour. Technol.*, 150, 67-72.

[10.1016/j.biortech.2013.09.126](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.126)

Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.*, 25 (3), 294-306.

[10.1016/j.biotechadv.2007.02.001](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001).

Drira, N, Piras A., Rosa, A., Porcedda, S., Dhaouadi, H., 2016. Microalgae from domestic wastewater facility's high rate algal pond: Lipids extraction, characterization and biodiesel production. *Bioresour. Technol.*, 206, 239-244. [10.1016/j.biortech.2016.01.082](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.082).

Filho, E. R. P., 2017. Planejamento fatorial em química: Maximizando a obtenção de resultados. EdUFSCar, São Carlos., pp 12.

Gerde, J.A., Montalbo-Lombay, M., Yao, L., Grewell, D., Wang, T., 2012. Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. *Bioresour. Technol.*, 125, 175-181.

[10.1016/j.biortech.2012.08.110](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.110)

Gunerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M.H.M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K., Wijffels, R.H., 2015. Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnol. Adv.*, 33, 243-260.

[10.1016/j.biotechadv.2015.01.008](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.008)

Halim, R., Gladman, B., Danquah, M.K., Webley, P.A., 2011. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresour. Technol.*, 102 (1), 178-85.

[10.1016/j.biortech.2010.06.136](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.136).

Khan, S. A., Hussain, R. M. Z., Prasad, S., Banerjee, U.C., 2009. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renew. Sust. Energy. Rev.*, 13 (9), 2361-2372.

[10.1016/j.rser.2009.04.005](https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.04.005).

Kim, D.Y., Vijayan, D., Praveenkumar, R., Han, J.I., Lee, K., Park, J.Y., Chang, W.S., Lee, J.S., Oh, Y.K., 2016a. Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*. *Bioresour. Technol.*, 199, 300-310.

[10.1016/j.biortech.2015.08.107](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.107)

Lee, S. Y., Cho, J. M., Chang, Y. K., Oh, Y.K., 2017. Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review. *Bioresour. Technol.*, 244, 1317-1328.

[10.1016/j.biortech.2017.06.038](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.038)

Lee, J.Y., Yoo, C., Jun, S.Y., Ahn, C.Y., Oh, H.M., 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresour. Technol.*, 101, 575-577. [10.1016/j.biortech.2009.03.058](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.058).

Li, Y., Naghdi, F. G., Garg, S., Adarme-Vega, T. C., Thurecht, K. J., Ghafor, W. A., Tannock, S., Schenk, P. M., 2014. A comparative study: the impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research. *Microb. Cell Fact.*, (13), 14-22.

[10.1186/1475-2859-13-14](https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-14).

Mandal, S., Patnaik, R., Singh, A.K., Mallick, N., 2013. Comparative assessment of various lipid extraction protocols and optimization of transesterification process for microalgal biodiesel production. *Environ. Technol.* (34). [10.1080/09593330.2013.827730](https://doi.org/10.1080/09593330.2013.827730).

Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew. Sust. Energy. Rev.*, 14, (1), 217-232. [10.1016/j.rser.2009.07.020](https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020)

Praveenkumar, R., Lee, K., Lee, J., Oh, Y.K. 2015. Breaking dormancy: an energy-efficient means of recovering astaxanthin from microalgae. *Green Chem.*, 17, 1226-1234. [10.1039/C4GC01413H](https://doi.org/10.1039/C4GC01413H)

Qv, X.Y., Zhou, Q.F, Jiang, J.G. J., 2014. Ultrasound-enhanced and microwave-assisted extraction of lipid from *Dunaliella tertiolecta* and Fatty acid profile analysis. *J. Sep. Sci.*, 37 (20), 2991-3000. [10.1002/jssc.201400458](https://doi.org/10.1002/jssc.201400458).

Ranjan, A., Patil, C., Moholkar, V.S., 2010. Mechanistic assessment of microalgal lipid extraction. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 49 (6), 2979–2985. [10.1021/ie9016557](https://doi.org/10.1021/ie9016557).

Ríos, S.D., Castañeda J., Torras, C., Farriol, X, Salvadó, J., 2013. Lipid extraction methods from microalgal biomass harvested by two different paths: Screening studies toward biodiesel production. *Bioresour. Technol*, 133, 378–388. [10.1016/j.biortech.2013.01.093](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.093).

Smedes, F., Askland, T. K., 1999. Revisiting the development of the Bligh and Dyer total lipid determination. *Mar. Poll. Bull.* (38), 193-201. [10.1016/S0025-326X\(98\)00170-2](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(98)00170-2)

Teo, C. L., Idris, A., 2014. Enhancing the various solvent extraction method via microwave irradiation for extraction of lipids from marine microalgae in biodiesel production. *Bioresour. Technol*, 171, 477-481. [10.1016/j.biortech.2014.08.024](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.024).

Work, V.H., Bentley, F.K., Scholz, M.J., D'Adamo, S., Gu, H., Vogler, B.W., Franks, D.T., Stanish, L.F., Jinkerson, R.E., Posewitz, M.C., 2013. Biocommodities from photosynthetic microorganisms. *Environ. Prog. Sustain.*, 32, 989-1001. [10.1002/ep.11849](https://doi.org/10.1002/ep.11849)

Yap, B.H., Crawford, S.A., Dagastine, R.R., Scales, P.J., Martin, G.J., 2016. Nitrogen deprivation of microalgae: effect on cell size, cell wall thickness, cell strength, and resistance to mechanical disruption. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 43, 1671-1680. [10.1007/s10295-016-1848-1](https://doi.org/10.1007/s10295-016-1848-1)

## 5 CONCLUSÃO

Conseguimos desenvolver uma técnica de ruptura celular com irradiação de micro-ondas, como forma de incrementar a extração de lipídios, com um desempenho satisfatório, comparado ao método de Bligh e Dyer adaptado empregando a ruptura por ultrassom, reduzindo tempo de extração e quantidade de solventes empregados. Com relação ao perfil de ácidos graxos, o mesmo permaneceu qualitativamente inalterado em todos os experimentos nos quais utilizamos a irradiação por micro-ondas, porém este perfil lipídico mostrou-se diferente no método de extração de Bligh e Dyer adaptado com etapas ruptura celular por sonicação, devido ao surgimento de outros dois ácidos graxos (C:12 e C18:0 n-6 isômero). Na análise dos efeitos das superfícies de resposta das diferentes variáveis empregadas no método de irradiação por micro-ondas foi possível observar a obtenção de rendimentos de lipídios extraídos maiores, utilizando um tempo de extração e proporção de metanol maiores em concomitância com uma quantidade menor de biomassa. Sendo assim, a extração de lipídios com a ruptura celular por micro-ondas pode vir a ser empregado como uma alternativa para substituir os métodos que utilizam a sonicação, como forma de promover a ruptura celular, devido à economia de tempo, mão-de-obra e gastos com solventes proporcionados pelo método desenvolvido neste estudo.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAOUF, N. et al. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 19, n. 3, p. 257-275, 2012.
- ADAMS, C. et al. Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content tradeoff in oleaginous green microalgae. *Bioresource Technology*, v. 131, p. 188-194, 2013.
- ADEY, W.H. et al. Algal turf scrubber (ATS) flowways on the Great Wicomico River, Chesapeake Bay: productivity, algal community structure, substrate and chemistry. *Journal of Phycology*, v. 49, n. 3, p. 489-501, 2013.
- ADEY, W.H. et al. Algal turf scrubbing: cleaning surface waters with solar energy while producing a biofuel. *Bioscience*, v. 61, p. 434-441, 2011.
- AMARO, H. M; GUEDES, A. C.; MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*, v. 88, n. 10, p. 3402-3410, 2011.
- ANDRADE, D. S.; FILHO, A. C. Microalgas de águas continentais: Potencialidades e desafios do cultivo. Londrina: Iapar, 2014.
- ARAÚJO, 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.
- ASSEMANY, P. P. et al. Biodiesel from wastewater: lipid production in high rate algal pond receiving disinfected effluent. *Water Science and Technology*, v. 71, n. 8, p. 1229-1234, 2015.
- AXELSSON, M.; GENTILI, F. A Single-Step Method for Rapid Extraction of Total Lipids from Green Microalgae. *Plos One*, v. 9, n. 2, p. e89643, 2014.
- BARREIRO, D. L. et al. Assessing microalgae biorefinery routes for the production of biofuels via hydrothermal liquefaction. *Bioresource technology*, v. 174, p. 256-265, 2014.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. 301 p.
- BICUDO, C. E. D. M.; MENEZES, M. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições. 2. Ed. São Carlos: Rima, 2006. 502 p.
- BLIGH, E. G; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.
- BREIL, C et al. “Bligh and Dyer” and Folch Methods for Solid-Liquid-Liquid Extraction of Lipids from Microorganisms. Comprehension of Solvation Mechanisms and towards Substitution with Alternative Solvents. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, p. 708, 2017.

BRUM, A. A. S. et al. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. *Química Nova*, v. 32, n. 4, p. 849-854, 2009.

CAI, T. et al. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable Sustainable Energy Rev.* v. 19, n. 0, p. 360-369, 2013.

CHENG, J. et al. Biodiesel production from lipids in wet microalgae with microwave irradiation and bio-crude production from algal residue through hydrothermal liquefaction. *Bioresource technology*, v. 151, p. 415-418, 2014.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

CHO, D. H. et al. Enhancing microalgal biomass productivity by engineering a microalgal–bacterial community. *Bioresource Technology*, v. 175, p. 578-585, 2015.

DAI, Y. M.; CHEN, K. T.; CHEN, C. C. Study of the microwave lipid extraction from microalgae for biodiesel production. *Chemical Engineering Journal*, v. 250, p. 267–273, 2014.

DE FRANCISCI, D. et al. Evaluation of microalgae production coupled with wastewater treatment. *Environmental Technology*, p. 1-40, 2017.

DOS SANTOS, R. R. et al. Comparison between several methods of total lipid extraction from *Chlorella vulgaris* biomass. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 22, p. 95-99, 2015.

DRIRA, N. et al. Microalgae from domestic wastewater facility's high rate algal pond: Lipids extraction, characterization and biodiesel production. *Bioresource Technology*, v. 206, p. 239-244, 2016.

ENCINAR, J. M.; GONZÁLEZ, J. F.; REINARES, A. R. Ethanolysis of used frying oil. Biodiesel preparation and characterization, *Fuel Processing Technology*, v. 88, p. 513–522, 2007.

GOUVEIA, L; OLIVEIRA, A. C.. Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 36, n. 2, p. 269-274, 2009.

GREENWELL, H.C. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *Journal of the Royal Society Interface*, v. 7, p. 703–726, 2010.

GRESSLER, P. D. Avaliação da eficiência de *Desmodesmus subspicatus* (R.Chodat) E. Hegewald e A. Schmidt (chlorophyceae) cultivada em Fotobiorreator tubular com efluente da ETE-unisc, visando biorremediação e obtenção de energia. Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul-Rio grande do Sul - [S.I.]. 2011.

GUEDES, A. C. et al. Microalgal and cyanobacterial cell extracts for use as natural antibacterial additives against food pathogens. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 46, n. 4, p. 862-870, 2011.

GÜLYURT, M. Ö.; ÖZÇİMEN, D.; İNAN, B. Biodiesel Production from *Chlorella protothecoides* Oil by Microwave-Assisted Transesterification. *International journal of molecular sciences*, v. 17, n. 4, p. 579, 2016.

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.

HE, P. J. et al. The combined effect of bacteria and *Chlorella vulgaris* on the treatment of municipal wastewaters. *Bioresource Technology*, v. 146, p. 562-568, 2013.

HU, Q. et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The plant journal*, v. 54, n. 4, p. 621-639, 2008.

HUANG, W. C.; KIM, J. D. Nickel oxide nanoparticle-based method for simultaneous harvesting and disruption of microalgal cells. *Bioresource Technology*, v. 218, p. 1290-1293, 2016.

HULTBERG, M. et al. Microalgal growth in municipal wastewater treated in an anaerobic moving bed biofilm reactor. *Bioresource Technology*, v. 207, p. 19-23, 2016.

IVERSON, S. J.; LANG, S. L.; COOPER, M. H. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids*, v. 36, n. 11, p. 1283–1290, 2011.

JAESCHKE, D. P. et al. Ultrasound as an alternative technology to extract carotenoids and lipids from *Heterochlorella luteoviridis*. *Bioresource Technology*, v. 224, p. 753-757, 2017.

KASSIM, M. A.; MENG, T. K. Carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) biofixation by microalgae and its potential for biorefinery and biofuel production. *Science of The Total Environment*, v. 584, p. 1121-1129, 2017.

KENT et al. Nutritional Evaluation of Australian Microalgae as Potential Human Health Supplements, *PloS One*, v.10, n. 2, 2015.

KHAN, S. A. et al. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 13, n. 9, p. 2361-2372, 2009.

KIM, D. Y. et al. An integrated process for microalgae harvesting and cell disruption by the use of ferric ions. *Bioresource Technology*, v. 191, p. 469-474, 2015.

LEE, I. et al. Hydrothermal nitric acid treatment for effectual lipid extraction from wet microalgae biomass. *Bioresource Technology*, v. 172, p. 138-142, 2014.

LEE, J.Y. et al. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 575–577, 2010.

LI et al. A comparative study: the impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research. *Microbial Cell Factories*, v. 13, p. 14-22, 2014.



LIU et al. Nutrient removal from horticultural wastewater by benthic filamentous algae *Klebsormidium* sp., *Stigeoclonium* spp. and their communities: From laboratory flask to outdoor Algal Turf Scrubber (ATS). *Water Research*, 2016.

LORENZEN, J. et al. Extraction of microalgae derived lipids with supercritical carbon dioxide in an industrial relevant pilot plant. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, p. 1-8, 2017.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. São Carlos: Rima, 2006. 606 p.

MAHAPATRA, D. M.; CHANAKYA, H. N.; RAMACHANDRA, T. V. Bioremediation and lipid synthesis through mixotrophic algal consortia in municipal wastewater. *Bioresource Technology*, v. 168, p. 142-150, 2014.

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.

MEIZOSO, I. R. et al. Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis* microalga. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 51, n. 2, p. 456-463, 2010.

MUÑOZ, R. et al. Sequential removal of heavy metals ions and organic pollutants using an algal-bacterial consortium. *Chemosphere*, v. 63, n. 6, p. 903-911, 2006.

NAJDENSKI, H. M. et al. Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 48, n. 7, p. 1533-1540, 2013.

OLMSTEAD, I. L. D. et al. Low solvent, low temperature method for extracting biodiesel lipids from concentrated microalgal biomass. *Bioresource Technology*, v. 148, p. 615-619, 2013.

PAUDEL, A. et al. Extraction of lipids from microalgae using CO<sub>2</sub>-expanded methanol and liquid CO<sub>2</sub>. *Bioresource Technology*, v. 184, p. 286-290, 2015.

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.

RAWAT, R. et al. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy*, v. 103, p. 444-467, 2013.

RAWN, D. F. K. et al. Persistent organic pollutants in fish oil supplements on the Canadian market: polychlorinated biphenyls and organochlorine insecticides. *Journal of Food Science* v. 74, p 14-23, 2009.

REN, X. et al. Current lipid extraction methods are significantly enhanced adding a water treatment step in *Chlorella protothecoides*. *Microbial Cell Factories*, v. 16, n. 1, p. 26, 2017.

RENUKA, N. et al. Exploring the efficacy of wastewater-grown microalgal biomass as a biofertilizer for wheat. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, n. 7, p. 6608-6620, 2016.

RÍOS, S. B. et al. Lipid extraction methods from microalgal biomass harvested by two different paths: Screening studies toward biodiesel production. *Bioresource Technology*, v. 133, p. 378–388, 2013.

SAKARIKA, M.; KORNAROS, M. Effect of pH on growth and lipid accumulation kinetics of the microalga *Chlorella vulgaris* grown heterotrophically under sulfur limitation. *Bioresource Technology*, v. 219, p. 694-701, 2016.

SANDEFUR, H. N. et al. Seasonal productivity of a periphytic algal community for biofuel feedstock generation and nutrient treatment. *Ecological Engineering*, v. 37, n. 10, p. 1476-1480, 2011.

SANTOYO, S. et al. Green processes based on the extraction with pressurized fluids to obtain potent antimicrobials from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *LWT-Food Science and Technology*, v. 42, n. 7, p. 1213-1218, 2009.

SCHUHMANN, H; LIM, D.Y.K.; SCHENK, P.M. Perspectives on metabolic engineering for increased lipid contents in microalgae. *Biofuels*, v. 3, p. 71–86, 2012.

SEO, Y. H. et al. Lipid extraction from microalgae cell using persulfate-based oxidation. *Bioresource Technology*, v. 200, p. 1073-1075, 2016.

SINGH, S. K. et al. Evaluation of promising algal strains for sustainable exploitation coupled with CO<sub>2</sub> fixation. *Environmental Technology*, v. 37, n. 5, p. 613-622, 2016.

SURENDRHIRAN, D. et al. Kinetic modeling of microalgal growth and lipid synthesis for biodiesel production. *3 Biotech*, v. 5, n. 5, p. 663-669, 2015.

TALEBI, A. F. et al. Biochemical modulation of lipid pathway in microalgae *Dunaliella* sp. for biodiesel production. *BioMed research international*, v. 2015, 2015.

TAN, K. W. M.; LEE, Y. K. The dilemma for lipid productivity in green microalgae: importance of substrate provision in improving oil yield without sacrificing growth. *Biotechnology for Biofuels*, v. 9, n. 1, p. 255, 2016.

TEO, C. L.; IDRIS, A. Enhancing the various solvent extraction method via microwave irradiation for extraction of lipids from marine microalgae in biodiesel production. *Bioresource Technology*, v. 171, p. 477-481, 2014.

TSUKUI, A.; REZENDE, C. M. Extração Assistida por Micro-ondas e Química Verde. *Revista Virtual de Química*, v. 6, n. 6, p. 1713-1725, 2014.

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.

VISWANATH, B. et al. The microalgae – a future source of Biodiesel, *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*, v. 4, p. 37–47, 2010.

VITOVA, M. et al. Accumulation of energy reserves in algae: from cell cycles to biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 6, p. 1204-1218, 2015.

WEDRE, D. et al. Co-cultivation of fungal and microalgal cells as an efficient system for harvesting microalgal cells, lipid production and wastewater treatment. *PloS One*, v. 9, n. 11, p. e113497, 2014.

WHITTON, R. et al. Influence of microalgal N and P composition on wastewater nutrient remediation. *Water Research*, v. 91, p. 371-378, 2016.

WU, C. et al. Aqueous enzymatic process for cell wall degradation and lipid extraction from *Nannochloropsis* sp. *Bioresource Technology*, v. 223, p. 312-316, 2017.

YEH, K. L.; CHANG, J. S. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresource technology*, v. 105, p. 120-127, 2012.

YU-AN, M. et al. Effects of ultrasonic and microwave pretreatments on lipid extraction of microalgae. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 37, n. 8, p. 1543-1552, 2014.

ZHAO, X. et al. Characterization of microalgae-bacteria consortium cultured in landfill leachate for carbon fixation and lipid production. *Bioresource Technology*, v. 156, p. 322-328, 2014.

ZHU, L. D.; LI, Z. H.; HILTUNEN, E. Strategies for Lipid Production Improvement in Microalgae as a Biodiesel Feedstock. *BioMed Research International*, v. 2016, 2016.

## **ANEXO I**

### **NORMAS DA REVISTA - Journal of Microbiological Methods**

#### **Requisitos de formatação**

Não há requisitos de formatação rigorosos, mas todos os manuscritos devem conter os elementos essenciais necessários para transmitir o seu manuscrito, por exemplo, Resumo, Palavras-chave, Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Conclusões, Arte e Tabelas com Legendas.

Se o seu artigo incluir quaisquer vídeos e / ou outro material suplementar, este deve ser incluído na sua apresentação inicial para fins de revisão pelos pares. Divida o artigo em seções claramente definidas.

#### **Figuras e tabelas incorporadas em texto**

Certifique-se de que as figuras e as tabelas incluídas no arquivo único sejam colocadas ao lado do texto relevante no manuscrito, e não na parte inferior ou superior do arquivo. A legenda correspondente deve ser colocada diretamente abaixo da figura ou tabela.

#### **Subdivisão - seções numeradas**

Divida seu artigo em seções claramente definidas e numeradas. As subseções devem ser numeradas 1.1 (então 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (o resumo não está incluído na numeração das seções). Use esta numeração também para referências cruzadas internas: não basta referir-se a 'o texto'. Qualquer subseção pode receber um breve título. Cada título deve aparecer em sua própria linha separada.

#### **Resultados**

Os resultados devem ser claros e concisos.

#### **Discussão**

Isso deve explorar o significado dos resultados do trabalho, não repeti-los. Uma seção combinada de resultados e discussão geralmente é apropriada. Evite extensas citações e discussões de literatura publicada.

#### **Conclusões**

As principais conclusões do estudo podem ser apresentadas em uma breve seção de Conclusões, que pode estar sozinha ou formar uma subseção de uma seção de Discussão ou Resultados e Discussão.

### **Resumo (manuscrito)**

Um resumo conciso e factual é obrigatório. O resumo deve indicar brevemente o objetivo da pesquisa, os principais resultados e as principais conclusões. Um resumo é frequentemente apresentado separadamente do artigo, por isso deve ser capaz de ficar sozinho. Por este motivo, as referências devem ser evitadas, mas, se necessário, cite o (s) autor (es) e ano (s). Além disso, as abreviaturas não-padrão ou incomum devem ser evitadas, mas, se essenciais, elas devem ser definidas em sua primeira menção no próprio resumo.

### **Palavras-chave**

Imediatamente após o resumo, forneça um máximo de 6 palavras-chave, usando a ortografia americana e evitando termos gerais e plurais e conceitos múltiplos (evite, por exemplo, 'e', 'de'). Seja poupador de abreviaturas: apenas abreviaturas firmemente estabelecidas no campo podem ser elegíveis. Essas palavras-chave serão usadas para fins de indexação.

### **Legendas das figuras**

Certifique-se de que cada ilustração tenha uma legenda. Uma legenda deve incluir um título breve (não na figura em si) e uma descrição da ilustração. Mantenha o texto nas ilustrações propriamente ditas, mas explique todos os símbolos e abreviaturas utilizados.

### **Referências**

#### **Citação no texto**

Certifique-se de que todas as referências citadas no texto também estão presentes na lista de referência (e vice-versa). Qualquer referência citada no resumo deve ser dada na íntegra. Resultados não publicados e comunicações pessoais não são recomendados na lista de referência, mas podem ser mencionados no texto. Se essas referências estiverem incluídas na lista de referência, elas devem seguir o estilo de referência padrão do jornal e devem incluir uma substituição da data de publicação com "Resultados não publicados" ou "Comunicação

pessoal". A citação de uma referência como "na imprensa" implica que o item foi aceito para publicação.

### **Formatação de referência**

Não há requisitos rigorosos na formatação de referência na submissão. As referências podem ser em qualquer estilo ou formato, desde que o estilo seja consistente. Quando aplicável, o (s) nome (s) do autor, título do diário / título do livro, título do capítulo / título do artigo, ano de publicação, número do volume / capítulo do livro e a paginação devem estar presentes. O uso do DOI é altamente encorajado. O estilo de referência usado pelo jornal será aplicado ao artigo aceito pela Elsevier na prova. Observe que os dados em falta serão destacados na fase de prova para o autor corrigir.

### **Estilo de referência**

*Texto:* Todas as citações no texto devem se referir a:

1. Autor único: o nome do autor (sem iniciais, a menos que haja ambiguidade) e o ano de publicação;
  2. Dois autores: os nomes dos autores e o ano de publicação;
  3. Três ou mais autores: primeiro nome do autor seguido por 'et al.' e o ano de publicação.
- As citações podem ser feitas diretamente (ou entre parênteses). Os grupos de referências devem ser listados primeiro alfabeticamente, então, cronologicamente. Exemplos: como demonstrado (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan e Jones, 1999). Kramer et al. (2010) mostraram recentemente ... "

*Lista:* As referências devem ser organizadas primeiro em ordem alfabética e depois ordenadas por ordem cronológica, se necessário. Mais de uma referência do (s) mesmo (s) autor (es) no mesmo ano deve ser identificada pelas letras 'a', 'b', 'c', etc., colocadas após o ano de publicação.

Referência a uma publicação de revista:

Van der Geer, J., Hanraads, JAJ, Lupton, RA, 2010. A arte de escrever um artigo científico. J. Sci. Comum. 163, 51-59.

Referência a um livro:

Tyssen, P., 1993. Hibridação com sondas de ácido nucleico. Em: Técnicas de laboratório em Bioquímica e Biologia Molecular, Vol. 24, Elsevier, Amsterdã, pp. 375-436.