



EXTRAÇÃO NÃO-DESTRUTIVA DE LIPÍDEOS DA MICROALGA *Botryococcus terribilis*

Vinícius F. Vieira*, Luisa F. Ríos Pinto, Gabriela F. Ferreira e Leonardo V. Fregolente.

Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas

Resumo

Com a crescente preocupação com os impactos ambientais decorrentes do uso de combustíveis fósseis, assim como os fortes incentivos ao aumento do uso de energias renováveis em muitos países, há boas perspectivas de expansão de fontes renováveis em todo o mundo. Neste cenário os combustíveis derivados de biomassa desempenham um papel fundamental [1], dessa forma destacam-se as microalgas que exibem algumas vantagens importantes sobre a biomassa derivada de plantas, como a não dependência de disponibilidade de terras (férteis), a possibilidade de crescer em águas residuais e, em geral apresentarem maior eficiência fotossintética [2]. Entretanto, o cultivo de microalgas em larga escala ainda não é viável economicamente devido principalmente às etapas pós-cultivo como colheita, secagem e extração de óleo.

Considerando o contexto exposto, nesse trabalho foi proposto o estudo de um método de extração de óleo contínuo e não destrutivo da microalga *Botryococcus terribilis*, por ser uma espécie conhecida pelo alto conteúdo de lipídeos e produção extracelular de óleo (triacilgliceróis, ácidos graxos livres, hidrocarbonetos, etc.), técnica com a qual, pretende-se eliminar as etapas de colheita e secagem da biomassa, diminuindo o custo do processo. Para tal, foram avaliadas algumas variáveis do processo, como tipo e concentração de solvente, tempo de extração e agitação. O cultivo foi realizado em regime autotrófico, a concentração de biomassa foi acompanhada periodicamente e o conteúdo de lipídeos determinado semanalmente após cada extração. Os resultados parciais mostraram que a extração de óleo com solventes, não destrutiva e contínua foi possível, e que para a microalga em questão, entre os solventes estudados, o de melhor desempenho foi do octano.

Palavras-Chave

Extração não destrutiva, Lipídeos, Hidrocarbonetos, Microalga, *Botryococcus terribilis*, Biocombustíveis.

Introdução

As microalgas são microrganismos unicelulares capazes de assimilar carbono, e com isso, formar lipídeos que podem ser usados para diferentes aplicações. Para seu cultivo, é necessário: água, fonte de carbono, luz solar, e nutrientes como potássio, fósforo e nitrogênio. Tais parâmetros podem ser ajustados de tal forma a aumentar a produtividade ou alterar o acúmulo de lipídeos. Como requerem uma área reduzida para o cultivo, não competem com a pecuária ou agricultura. Apesar do menor teor lipídico, comparado com grãos de plantas de maior porte, como palma e soja, as microalgas apresentam maior produtividade. Além disto, a composição de ácidos graxos das microalgas, em alguns casos, pode ser atrativa como para a produção de cadeias poli-insaturadas [3], de grande interesse para as indústrias de alimentos e farmacêutica.

Um dos principais desafios para a produção em larga escala de óleo de microalga são os altos custos associados à colheita e extração por solvente o que dificulta a competição com outros combustíveis, como o fósil [4]. O gênero *Botryococcus* possui características que as diferem das outras, como: alta produção de lipídeos e a produção lipídica extracelular. Essa última característica se deve às consecutivas divisões celulares, formando paredes celulares onde alguns hidrocarbonetos são estocados [5, 6].

Apesar de ser uma microalga com uma taxa de crescimento baixa, se comparada com outras como *Chlorella* sp., o seu diferencial de formar uma camada lipídica extracelular, na forma de hidrocarbonetos de cadeia longa, faz com que o seu uso seja estudado para uma extração não-destrutiva dos óleos das células, isto é, um cultivo contínuo da microalga sem a destruição da sua parede celular. Dado que, retira-se apenas a camada extracelular, fazendo com que a célula continue produzindo óleo. Dessa forma, elimina-se principalmente o gasto energético de etapas como: colheita e secagem, que inviabilizavam financeira e ecologicamente, o cultivo das microalgas [7].

A espécie *Botryococcus terribilis*, utilizada nesse projeto, possui todas as características do gênero *Botryococcus* necessárias para a extração não-destrutiva, e como é uma espécie pouco estudada, poucos dados são encontrados na literatura. Este projeto buscou contribuir com o avanço da pesquisa do cultivo de microalga, avaliando a extração de óleo extracelular com

solvente diretamente no cultivo visando a sua viabilidade econômica.

Objetivos

O objetivo deste projeto foi avaliar a possibilidade de extração não-destrutiva do óleo da microalga *Botryococcus terribilis*, através do uso de solventes, que permitam o cultivo contínuo da espécie.

Avaliar a possibilidade de extração, juntamente com a tolerância da microalga, com diferentes tipos de solventes (Hexano, Heptano, Octano).

Estudar diferentes variáveis (concentração de solvente, agitação, tempo) envolvidas na extração através de um planejamento de experimentos.

Materiais e Métodos

Cultivo

Nesse projeto utilizou-se a cepa da microalga *Botryococcus terribilis* (CCMA-UFSCar 481), a qual foi doada pela coleção de cultura de microalgas de água doce (CCMA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) [8]. O cultivo foi realizado no meio de cultivo sintético Chu-13, modificado nas concentrações, como fonte de nutrientes. A Tabela 1 mostra os sais presentes e as respectivas concentrações utilizadas.

Tabela 1. Nutrientes presentes no meio de cultivo. [9]

Nutrientes			
Sal	Concentração (g L ⁻¹)	Sal	Concentração (g L ⁻¹)
KNO ₃	0,4	H ₃ BO ₃	0,005722
K ₂ HPO ₄	0,08	MnSO ₄ .4H ₂ O	0,003078
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,000439
CaCl ₂ .6H ₂ O	0,16	CoSO ₄ .7H ₂ O	0,000198
Citrato de Fe	0,02	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,000157
Ácido cítrico	0,2	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,000228

Extração não destrutiva

A extração não destrutiva foi realizada após os cultivos atingirem um estado estacionário, na curva de crescimento, através da adição direta de solvente ao cultivo seguida de agitação por um tempo pré-determinado e posterior remoção do solvente, evaporação em estufa e quantificação do óleo extraído por gravimetria.

Repetiu-se esse procedimento de extração, por 3 vezes, realizado a cada 7 dias para avaliar a resistência das microalgas.

Todos os procedimentos nos quais há exposição do cultivo foram realizados em capela de fluxo laminar, para evitar que ocorra contaminação. A Figura 1 apresenta um esquema da metodologia e dos procedimentos adotados.

Escolha do solvente

Com a utilização de solventes para realizar a extração, é necessário avaliar a toxicidade para a microalga, uma vez que não se pode afetar negativamente o crescimento e/ou sobrevivência do cultivo.

Dessa forma, foi testada a tolerância da microalga à três tipos de solvente: hexano, heptano e octano. Seguindo o procedimento descrito, realizou-se a extração com os três solventes, em triplicata, sob as mesmas condições e baseando-se na concentração de lipídeos obtidos e a tolerância da microalga, escolheu-se o solvente para a fase seguinte, o planejamento fatorial.

Planejamento Experimental

Para estudar a influência das variáveis envolvidas no processo de extração, foi realizado um planejamento fatorial completo com 3 pontos centrais, em um total de 11 ensaios. A Tabela 2 apresenta os níveis/limites das variáveis estudadas, agitação (rpm), concentração de solvente (% volume de solvente/volume de cultivo), e tempo de extração (min). A variável resposta foi o conteúdo de óleo extraído. As células foram monitoradas pelo microscópio óptico e a biomassa pela leitura da absorbância no espectrofotômetro UV.

Tabela 2. Planejamento de experimentos.

Variável	Limite inferior (-1)	Ponto central (0)	Limite superior (+1)
Agitação (rpm)	100	150	200
Concentração de solvente (% v/v)	5	20	35
Tempo (min)	5	20	35

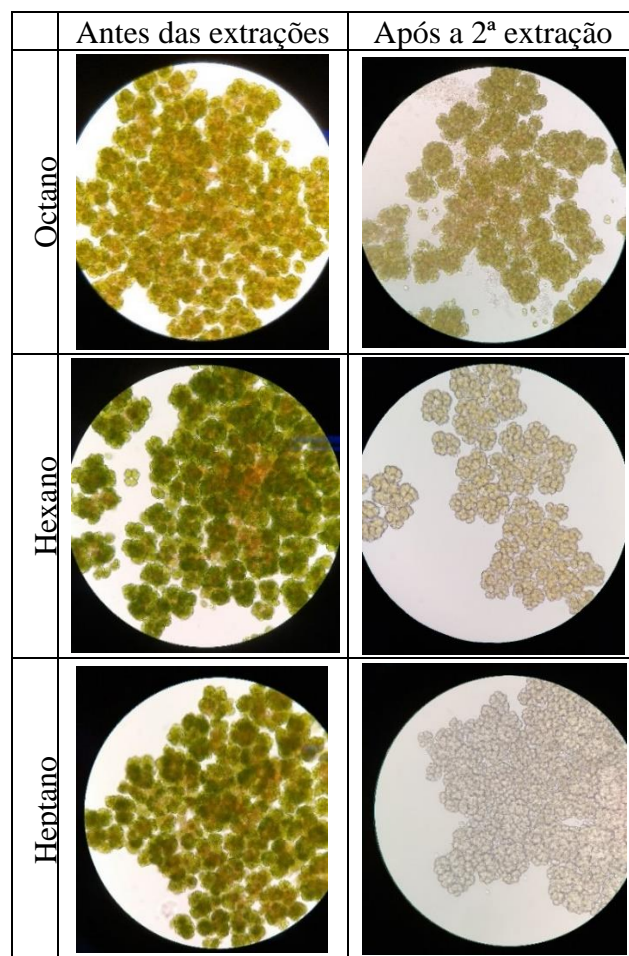
Resultados Parciais

Escolha do solvente

A Figura 2 mostra as microalgas observadas no microscópio, com uma lente x40, em dois diferentes momentos em um dos ciclos de extração realizados, para cada um dos respectivos solventes.

Para esse ciclo notou-se que após a segunda extração, para os solventes hexano e heptano, houve uma morte das células mais acentuada que para o octano. Observa-se as células com uma coloração acinzentada o que indica a morte.

Figura 2. Células durante os ciclos de extração.



A Tabela 3 apresenta as médias das massas de óleo obtidas nas extrações do ciclo apresentado. A partir desses resultados, definiu-se o octano

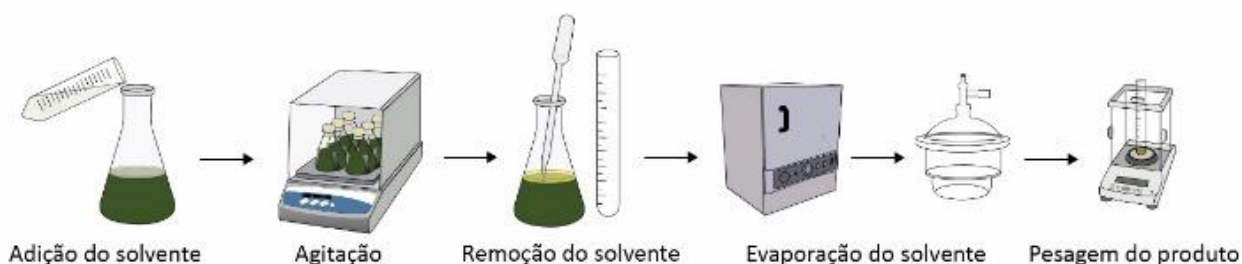


Figura 1. Esquema procedimentos da extração não destrutiva de lipídeos.

como o solvente que seria utilizado nas etapas seguintes, buscando garantir a extração e a continuidade do cultivo.

Tabela 3. Massas de óleo obtido a cada extração – escolha do solvente.

Solvente	Massa de óleo extraído (mg)		
	1ª extração	2ª extração	3ª extração
Octano	11,9 ± 2,5	38,3 ± 19,7	32,8 ± 10,3
Hexano	28,3 ± 8,4	24,2 ± 11,7	24,9 ± 10,9
Heptano	32,1 ± 11,4	50,4 ± 23,0	22,1 ± 7,7

Planejamento Experimental

Com o solvente definido, partiu-se para o planejamento fatorial. Na Tabela 4 está apresentada a matriz de planejamento dos experimentos.

Tabela 4. Matriz de planejamento.

Standard Run	Design: 2 ^{**} (3-0) design (Spreadsheet1)				
	CenterPt	Agitação (rpm)	Concentração de solvente % (v/v)	Tempo (min)	óleo
1	1	100,0000	5,00000	5,00000	
2	1	200,0000	5,00000	5,00000	
3	1	100,0000	35,00000	5,00000	
4	1	200,0000	35,00000	5,00000	
5	1	100,0000	5,00000	35,00000	
6	1	200,0000	5,00000	35,00000	
7	1	100,0000	35,00000	35,00000	
8	1	200,0000	35,00000	35,00000	
9 (C)	0	150,0000	20,00000	20,00000	
10 (C)	0	150,0000	20,00000	20,00000	
11 (C)	0	150,0000	20,00000	20,00000	

Até o momento foi possível realizar os experimentos dos pontos 1, 2, 3, 5, 6, 9 (C), e 10 (C), para os quais acompanhou-se as células antes e após cada uma das extrações.

Analisando as imagens obtidas dessa etapa de extração com as imagens do estudo da escolha do solvente, nota-se que essas células apresentam cores menos vibrantes e menos amareladas, o que indicaria uma presença menor de óleo, congruente com os valores encontrados nessas extrações. Já comparando somente as amostras dessa etapa antes e depois de cada extração nota-se em diversos pontos, que logo após a extração, perde-se um pouco da coloração amarela, indicando a retirada do óleo. Destaca-se na Figura 3 as células do ponto experimental 3, antes e depois da extração, para as três extrações realizadas, exemplificando esses comportamentos. Não se observou a morte acentuada de células com as extrações em nenhum dos pontos.

A Tabela 5 apresenta as massas de óleo obtidas nas extrações de cada ponto realizado do planejamento.

Figura 3. Células durante as extrações do Ponto Experimental 3.

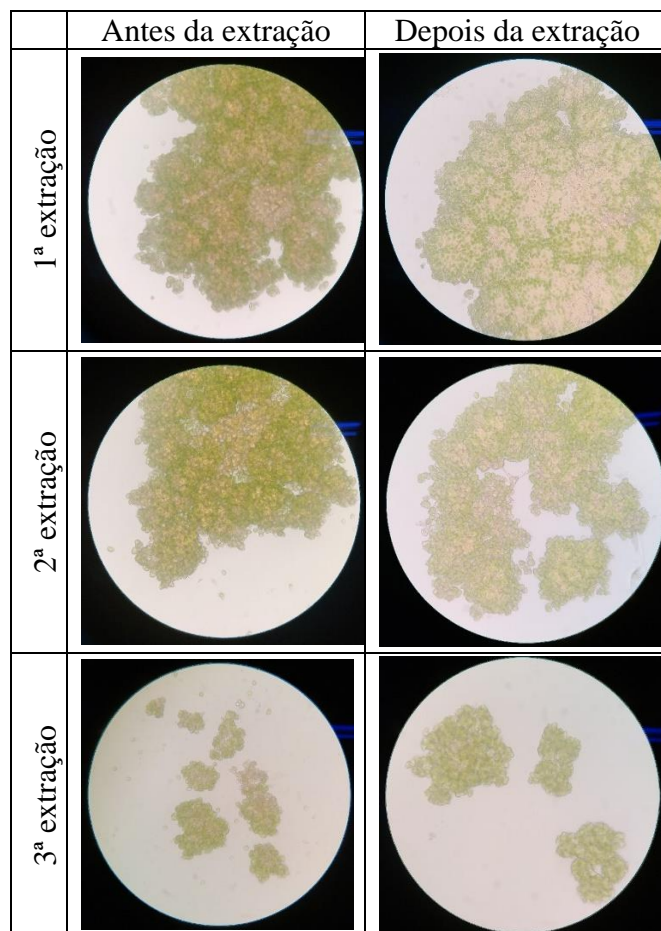


Tabela 5. Massas de óleo obtido a cada extração -planejamento experimental.

Pontos	Massa de óleo extraído (mg)		
	1ª extração	2ª extração	3ª extração
1	1,4	1,8	3,6
2	1,0	3,4	4,4
3	8,3	5,0	21,3
5	3,7	3,9	8,9
6	2,6	1,8	3,5
9 (C)	7,7	6,8	19,5
10 (C)	4,7	3,2	21,3

Além das imagens em microscópio, para todos os pontos, antes e depois de cada uma das extrações realizou-se a leitura de absorbância no espectrofotômetro UV, e a partir de uma curva de calibração pode-se obter os valores de concentração do cultivo, os quais são apresentados na Tabela 6.

Observando esses resultados nota-se, pequenas flutuações imediatamente após a extração, o que pode ser devido a variação das amostras, ou a variação de volume do cultivo. Já entre as extrações observa-se um crescimento no valor de concentração, na maioria dos pontos, o que pode indicar a continuidade do cultivo, com o aumento de biomassa.

Tabela 6. Valores de concentração durante as extrações.

Ponto	Concentração do cultivo (g/L)					
	1ª extração		2ª extração		3ª extração	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
1	1,223	1,243	1,288	1,307	1,581	1,582
2	1,201	1,253	1,404	1,466	1,444	1,666
3	1,168	1,251	1,207	1,171	1,606	1,676
5	1,236	1,239	1,166	1,271	1,395	1,325
6	1,142	1,143	1,346	1,323	1,554	1,389
9 (C)	1,306	1,253	1,290	1,307	1,463	1,436
10 (C)	1,123	1,042	1,351	1,194	1,332	1,352

Apesar de não haver todos os pontos para uma análise completa, pode-se observar de uma maneira menos rigorosa, a influência das variáveis comparando os resultados obtidos com a variação dos níveis. Dessa forma tem-se uma tendência ao aumento da quantidade de produto obtido com o aumento da concentração de solvente, destacando-se ao comparar os pontos 1 e 3. Porém nota-se também que a maior concentração não seja necessária visto que os pontos centrais obtiveram resultados bem próximos ao ponto superior.

Em relação as demais variáveis não se observa uma tendência muito clara, por exemplo na variável tempo, ao comparar os pontos 1 e 5. Nota-se um aumento da quantidade de produto somente com o aumento do tempo, entretanto comparando os pontos 2 e 6, há uma leve diminuição do produto com o aumento do tempo. E o mesmo ocorre para a variável agitação. O que pode indicar a existência de uma dependência entre as variáveis.

Conclusões

Mesmo sem todos os experimentos, observa-se que foi possível realizar a extração não destrutiva de óleo da *Botryococcus terribilis*, com o uso de solventes, e o que apresentou a menor toxicidade as células foi o Octano. Entretanto sem a finalização dos experimentos não se pode dizer quais variáveis são realmente determinantes, ou qual a eficácia dessa extração. O que foi possível observar é uma tendência a melhor extração com o aumento da concentração do solvente, que parece estabilizar-se após um valor. Portanto, a análise estatística seria necessária para verificar a faixa ideal considerando ambos, produto extraído e sobrevivência das células. Para as demais variáveis observou-se duas tendências opostas na faixa das variáveis o que pode indicar uma dependência entre elas.

Perspectiva de continuidade

Espera-se concluir os experimentos nos próximos meses para obter os resultados do planejamento completo, e realizar em sequência a análise estatística, para determinação das variáveis significativas e ponto ótimo da extração.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer o financiamento do CNPq junto com o programa PIBIC/UNICAMP pelo suporte à pesquisa nesse projeto e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Processo FAPESP No. 2015/20630-4.

Referências

1. Karthikeyan S, Periyasamy M, Prathima A (2020) Biodiesel from microalgae: Environmental aspects. Mater Today Proc. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.05.779>
2. Raheem A, Prinsen P, Vuppaladadiyam AK, et al (2018) A review on sustainable microalgae based biofuel and bioenergy production: Recent developments. J Clean Prod 181:42–59. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.125>
3. Thevenieau F, Nicaud J-M (2013) Microorganisms as sources of oils. OCL 20:D603. <https://doi.org/10.1051/ocl/2013034>
4. Jackson BA, Bahri PA, Moheimani NR (2020) Non-destructive extraction of lipids from *Botryococcus braunii* and its potential to reduce pond area and nutrient costs. Algal Res 47:101833. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101833>
5. Metzger P, Largeau C (2005) *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. Appl Microbiol Biotechnol 66:486–496. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1779-z>
6. Hirose M, Mukaida F, Okada S, Noguchi T (2013) Active Hydrocarbon Biosynthesis and Accumulation in a Green Alga, *Botryococcus braunii* (Race A). Eukaryot Cell 12:1132–1141. <https://doi.org/10.1128/EC.00088-13>
7. Moheimani NR, Cord-Ruwisch R, Raes E, Borowitzka MA (2013) Non-destructive oil extraction from *Botryococcus braunii* (Chlorophyta). J Appl Phycol 25:1653–1661. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0012-9>
8. Ferreira GF, Ríos Pinto LF, Carvalho PO, et al (2019) Biomass and lipid characterization of microalgae genera *Botryococcus*, *Chlorella*, and *Desmodesmus* aiming high-value fatty acid production. Biomass Convers Biorefinery. <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00566-3>
9. Chu SP (1942) The Influence of the Mineral Composition of the Medium on the Growth of Planktonic Algae: Part I. Methods and Culture Media. J Ecol 30:284–325. <https://doi.org/10.2307/2256574>