



Influência de métodos e solventes na extração de bio-óleo de *Nannochloropsis oculata*: avaliação experimental e estatística

Impact of methods and solvents on bio-oil extraction from Nannochloropsis oculata: experimental and statistical analysis

Nicholas Alexandre Berger Bento^{1,*}, Lyon Lopes Cosme², Marcelo Silveira Bachelos³,
Paulo Sérgio da Silva Porto³

¹ Aluno de Doutorado Programa de Pós-Graduação em Energia, Universidade Federal do Espírito Santo – Ufes, campus São Mateus, ES, Brasil

² Aluno de Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Espírito Santo – Ufes, campus São Mateus, ES, Brasil

³ Professor do Programa de Pós-Graduação em Energia, Universidade Federal do Espírito Santo – Ufes, campus São Mateus, ES, Brasil

*Autor para correspondência, E-mail: nicholas.berger@hotmail.com

Resumo: O aproveitamento de microalgas para produção de biocombustíveis tem despertado crescente interesse devido à sua alta produtividade, rápida taxa de crescimento e capacidade de fixação de CO₂. Dentre as etapas do processo, a extração de lipídios é considerada uma das mais críticas e onerosas, sendo amplamente dependente do solvente e do método empregado. Embora solventes apolares, como o hexano, e métodos assistidos, como o ultrassom, sejam comumente utilizados, ainda há divergências quanto à combinação mais eficiente para maximizar o rendimento da extração. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do solvente (hexano, diclorometano e mistura hexano+diclorometano) e do método de extração (agitação, ultrassom e agitação+ultrassom) sobre a eficiência de extração de bio-óleo da microalga *Nannochloropsis oculata*. Foram realizados nove experimentos em duplicata, e os resultados foram analisados por ANOVA fatorial (2-vias) e teste de Tukey HSD ($p < 0,05$). Os resultados demonstraram diferenças significativas entre os fatores avaliados, evidenciando uma interação expressiva entre solvente e método. O uso de hexano assistido por ultrassom (H+U) apresentou o maior rendimento médio de extração ($14,95\% \pm 0,41$), seguida de diclorometano + ultrassom ($10,06\% \pm 0,62$) e hexano + diclorometano em agitação + ultrassom ($9,87\% \pm 0,35$). O ultrassom mostrou-se determinante para o aumento da eficiência, independentemente do solvente. A ausência de efeito sinérgico na mistura H+D indica que a combinação de solventes não necessariamente resulta em ganhos de rendimento. Assim, a associação de hexano e ultrassom destacou-se como a condição mais eficiente para a extração de bio-óleo de *Nannochloropsis oculata*, representando uma alternativa promissora para processos sustentáveis de produção de biocombustíveis.

Palavras-chave: lipídios; solventes orgânicos; ultrassom; eficiência de processo; biocombustíveis.

Abstract: The use of microalgae for biofuel production has gained increasing interest because of their high productivity, rapid growth rate, and CO₂ fixation ability. Among the process steps, lipid extraction is considered one of the most critical and expensive, mainly depending on the solvent and method used. Although nonpolar solvents like hexane and assisted methods such as ultrasound are commonly employed, there is still debate about the most effective combination to maximize extraction yield. Therefore, this study aimed to evaluate how the solvent (hexane, dichloromethane, and a mixture of hexane + dichloromethane) and the extraction method (agitation, ultrasound, and agitation + ultrasound) influence the efficiency of bio-oil extraction from the microalga *Nannochloropsis oculata*. Nine experiments were conducted in

*duplicate, and the results were analyzed using two-way factorial ANOVA and Tukey's HSD test ($p < 0.05$). The findings revealed significant differences between the tested factors and showed a notable interaction between solvent and method. The combination of hexane + ultrasound (H+U) produced the highest average extraction yield ($14.95\% \pm 0.41$), followed by dichloromethane + ultrasound ($10.06\% \pm 0.62$), and hexane + dichloromethane with agitation + ultrasound ($9.87\% \pm 0.35$). Ultrasound consistently improved efficiency, regardless of the solvent used. The lack of a synergistic effect with the H+D mixture indicates that combining solvents does not necessarily increase yield. Overall, the combination of hexane and ultrasound proved to be the most effective condition for extracting bio-oil from *N. oculata*, offering a promising alternative for sustainable biofuel production.*

Keywords: lipids; organic solvents; ultrasound; process efficiency; biofuels.

1 Introdução

O aproveitamento energético de microalgas tem despertado crescente interesse devido ao seu rápido crescimento, alto teor lipídico e capacidade de fixação de CO₂, configurando-se como uma alternativa promissora às fontes fósseis. Entre as espécies estudadas, destaca-se a *Nannochloropsis oculata*, conhecida por apresentar elevada produtividade lipídica e perfil de ácidos graxos favorável para a produção de biodiesel (Wei e Huang, 2017; Martínez Macias et al., 2017).

A etapa de extração dos lipídios é considerada determinante para a eficiência global do processo, sendo influenciada por fatores como a natureza do solvente empregado e o método de extração, que impactam diretamente a seletividade, a pureza e o rendimento do bio-óleo. Diversos métodos de extração e conversão têm sido otimizados para maximizar o rendimento de biodiesel a partir de *N. oculata*. De acordo com Lima et al. (2018) e Dahmer et al. (2020) escolha do solvente é crucial. Misturas de metanol e clorofórmio (como no método de (Bligh e Dyer, 1959)) são amplamente utilizadas por proporcionarem alto rendimento lipídico, mas apresentam riscos ambientais e de saúde (Lima et al., 2018; Dahmer e Benitez, 2020). Solventes alternativos, como n-hexano, geralmente resultam em menor rendimento (Dahmer e Benitez, 2020). Outro fator importante é a etapa de ruptura celular, que é determinante para liberar lipídios intracelulares. Métodos como micro-ondas, ultrassom e laser aumentam significativamente o rendimento, reduzindo tempo e consumo de solventes (Lima et al., 2018). A eficiência global da extração de lipídios de microalgas é fortemente influenciada pelo tipo de solvente e método de ruptura celular. Métodos inovadores, como micro-ondas e solventes eutéticos, oferecem maior rendimento, seletividade e sustentabilidade, sendo promissores para aplicações industriais.

Entretanto, ainda existe uma escassez de informações relacionadas à comparação direta entre diferentes métodos e solventes. Assim, como à avaliação do efeito combinado dessas variáveis no rendimento da extração, de forma a buscar um processo viável. Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a eficiência da extração de bio-óleo da microalga *Nannochloropsis oculata*, empregando diferentes solventes (hexano, diclorometano e mistura) e métodos (agitação em shaker, ultrassom em baixa frequência e combinação), a fim de identificar condições mais promissoras. Esse estudo proporciona uma análise sistemática das variáveis combinadas e na aplicação de tratamento estatístico aos resultados, permitindo discutir tendências e diferenças significativas no processo de extração.

2 Metodologia

A microalga *Nannochloropsis oculata*, reconhecida por seu elevado teor lipídico e amplamente estudada para a produção de biocombustíveis foi utilizada nos experimentos. Como solventes de extração, empregaram-se n-hexano (H), diclorometano (D) e a mistura H+D (proporção 1:1 v/v). O processo de extração foi realizado utilizando um agitador do tipo *shaker* (150 rpm) e um banho de ultrassom (40 kHz), possibilitando a comparação entre diferentes métodos de intensificação de processo: agitação, ultrassom e combinação de ambos.

As massas de biomassa seca e de bio-óleo foram determinadas em balança analítica de alta precisão, garantindo a confiabilidade dos resultados. As amostras foram preparadas em frascos Erlenmeyer, utilizando pipetas e vidrarias laboratoriais padrão. Após a extração, os solventes foram removidos por evaporação controlada, garantindo a obtenção da fração lipídica pura para posterior análise.

Foram realizadas nove condições experimentais (tratamentos), cada uma em duplicata, totalizando 18 ensaios. A correspondência entre as condições está apresentada na Tabela 1. Para cada ensaio, registraram-se as massas de biomassa e de bio-óleo obtido, calculando-se o rendimento de extração (%).

Tabela 1. Distribuição dos experimentos.

Parâmetro	Hexano (H)	Diclorometano (D)	H + D
Agitação em shaker (A)	1	2	3
Ultrassom (U)	4	5	6
A + U	7	8	9

Além disso, os métodos avaliados foram:

- A (Apenas agitação em shaker) — tempo total 60 min, volume do solvente 50 mL.
- U (Apenas ultrassom) — tempo total 60 min, volume do solvente 50 mL.
- A + U (combinação) — agitação 30 min + ultrassom 30 min.
- H + D (Combinação) — 25 mL de H + 25 mL de D.

Os resultados, expressos como percentual de extração de bio-óleo, foram submetidos à análise estatística a fim de avaliar a influência dos fatores investigados. Consideraram-se como variáveis independentes o tipo de solvente (hexano, diclorometano e mistura H+D) e o método de extração (agitação em shaker, ultrassom e combinação de agitação + ultrassom), sendo o rendimento de bio-óleo a variável resposta.

Inicialmente, foram calculados médias e desvios-padrão para cada condição experimental, de modo a obter uma visão geral do comportamento dos dados. Em seguida, aplicou-se a análise de variância (ANOVA fatorial de duas vias), com nível de significância de 95% ($p < 0,05$), para avaliar os efeitos isolados de cada fator e sua interação. Quando identificadas diferenças significativas ($p < 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey HSD (*Honest Significant Difference*), a fim de determinar quais combinações apresentaram diferenças estatisticamente relevantes. As análises foram realizadas com os softwares Microsoft Excel® e Statistica®, e os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão.

3 Resultados e discussões

3.1 Análise experimental

Os valores médios e desvios-padrão dos percentuais de extração de bio-óleo obtidos para cada combinação de solvente e método de extração estão apresentados na Tabela 2. Observa-se ampla variação entre as condições testadas, demonstrando que tanto o tipo de solvente quanto o método de extração influenciam significativamente a eficiência do processo.

Tabela 2. Médias e desvios-padrão (% de extração).

Experimentos	Solvente	Método	Média
1	H	A	4,71 \pm 0,55
2	D	A	7,15 \pm 0,39
3	H + D	A	5,85 \pm 0,16
4	H	U	14,95 \pm 0,41
5	D	U	10,06 \pm 0,62
6	H + D	U	5,51 \pm 0,36
7	H	A + U	4,86 \pm 0,26
8	D	A + U	7,92 \pm 0,11
9	H + D	A + U	9,87 \pm 0,35

De modo geral, o hexano (H) apresentou o melhor desempenho global, especialmente quando combinado ao ultrassom (U), condição que resultou no maior rendimento médio de extração (14,95% \pm 0,41). Esse resultado corrobora com a literatura, que reconhece o hexano como um solvente apolar eficiente na extração de lipídios (Bligh and Dyer 1959). Em seguida, destacaram-se o diclorometano com ultrassom (D/U, 10,06% \pm 0,62) e a mistura de hexano + diclorometano com agitação associada ao ultrassom (H+D/A+U, 9,87% \pm 0,35). Os menores rendimentos foram observados nas combinações com hexano e mistura H+D sob agitação simples, que não ultrapassaram 5,85% (Tabela 2).

A análise de variância a dois fatores (ANOVA 2-vias), apresentada na Tabela 3, confirmou efeitos estatisticamente significativos para o método de extração ($F = 185,57$; $p < 0,05$) e quanto para o tipo de

solvente ($F = 19,46$; $p < 0,05$), além de uma interação altamente significativa entre ambos ($F = 191,00$; $p < 0,05$). Esses resultados indicam que a eficiência da extração de bio-óleo de *Nannochloropsis oculata* não depende apenas de um fator isolado, mas sim da interação entre solvente e método, reforçando a importância da avaliação desses parâmetros.

Tabela 3. ANOVA.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Método	55,75	2	27,87	185,57	4,83E-08	4,26
Solvente	5,85	2	2,92	19,46	0,0005	4,26
Interações	114,76	4	28,69	191,00	1,08E-08	3,63
Dentro	1,35	9	0,15			
Total	177,71	17				

O teste de Tukey HSD (Tabela 4) revelou diferenças significativas entre as combinações. A condição H+U destacou-se de forma expressiva, apresentando diferença estatística ($p < 0,05$) em relação às demais condições, confirmando-se como a mais eficiente. O diclorometano com ultrassom (D+U) apresentou rendimento intermediário, diferindo significativamente ($p < 0,05$) das combinações com hexano e mistura sob agitação, o que demonstra que o ultrassom também favorece esse solvente. A condição H+D/A+U exibiu desempenho elevado, estatisticamente semelhante ao de D+U ($p > 0,05$), mas inferior a H+U, o que indica comportamento aditivo, porém sem sinergia evidente.

Tabela 4. Teste de Tukey HSD.

Solvente	Método	1	2	3	4	5	6	7	8	9
H	A		0,0002	0,9999	0,0028	0,0002	0,0005	0,1957	0,5356	0,0002
H	U	0,0002		0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
H	A + U	0,9999	0,0002		0,0042	0,0002	0,0006	0,3129	0,7340	0,0002
D	A	0,0028	0,0002	0,0042		0,0008	0,5765	0,1152	0,0358	0,0013
D	U	0,0002	0,0002	0,0002	0,0008		0,0067	0,0002	0,0002	0,9997
D	A + U	0,0005	0,0002	0,0006	0,5765	0,0067		0,0083	0,0030	0,0123
H + D	A	0,1957	0,0002	0,3129	0,1152	0,0002	0,0083		0,9899	0,0002
H + D	U	0,5356	0,0002	0,7340	0,0358	0,0002	0,0030	0,9899		0,0002
H + D	A + U	0,0002	0,0002	0,0002	0,0013	0,9998	0,0123	0,0002	0,0002	

O hexano sob agitação simples (H+A) apresentou rendimento muito inferior ($4,71\% \pm 0,55$), demonstrando que a ausência de intensificação limita o contato entre o solvente e a biomassa. A ação do ultrassom, por outro lado, promove cavitação acústica, que rompe as paredes celulares e aumenta a difusão do solvente no interior das células (Lee et al. 2010). Esse efeito explica o aumento expressivo de rendimento observado entre H+A e H+U.

O diclorometano (D), embora mais polar, apresentou bom desempenho quando combinado ao ultrassom, mas rendimento inferior sob agitação simples ($7,15\% \pm 0,39$). Esse comportamento pode estar relacionado à sua maior capacidade de solubilização de lipídios polares e semipolares, porém com menor seletividade para os compostos apolares predominantes em *N. oculata*. O desempenho intermediário reforça que a polaridade do solvente deve ser compatível com a composição lipídica da biomassa (Ryckebosch et al., 2012).

A mistura hexano + diclorometano (H+D) não apresentou efeito sinérgico, visto que seus rendimentos ficaram próximos aos dos solventes puros, sem superá-los. Em particular, a condição H+D/A+U ($9,87\%$) mostrou-se eficiente, mas sem ganho estatístico relevante frente às combinações com ultrassom isolado.

Esse resultado sugere que a mistura apresenta comportamento aditivo, possivelmente devido ao equilíbrio entre polaridade intermediária e menor capacidade de penetração celular (Halim et al., 2012).

A interação significativa entre solvente e método (Tabela 3) evidencia que o desempenho de cada solvente depende diretamente do método de extração aplicado. Assim, enquanto o ultrassom se mostra determinante para o hexano, o diclorometano apresenta respostas mais consistentes entre os métodos. Isso reforça a necessidade de otimização conjunta, uma vez que o solvente mais eficiente sob uma condição pode não manter o mesmo desempenho sob outra.

Em síntese, o hexano associado ao ultrassom (H+U) foi a condição mais eficaz para extração de bio-óleo de *Nannochloropsis oculata*, apresentando rendimento significativamente superior às demais combinações. O diclorometano apresentou eficiência intermediária, enquanto a mistura H+D não demonstrou vantagem sinérgica. Esses resultados estão alinhados a estudos anteriores (Mercer e Armenta, 2011; Halim et al., 2012; Bligh e Dyer, 1959), os quais indicam que solventes apolares favorecem a extração de lipídios neutros, especialmente quando combinados a técnicas de intensificação, como o ultrassom.

3.2 Efeito da interação entre solvente e método de extração em relação a seletividade e eficiência na recuperação de óleo

A eficiência e seletividade da extração de lipídeos de biomassa microalgal dependem fortemente da combinação entre as propriedades físico-químicas dos solventes e o método de ruptura celular empregado. Solventes apolares como hexano, apresentam alta afinidade por lipídeos neutros (por exemplo, triacilgliceróis), mas baixa capacidade de penetrar células intactas. Por isso, sua eficiência aumenta significativamente quando combinados com métodos de ruptura celular, como ultrassom, que promove cavitação e facilita o acesso do solvente ao conteúdo intracelular (Wichaphian et al., 2023). Já solventes de polaridade moderada, como diclorometano ou misturas de clorofórmio/metanol, conseguem extrair tanto frações lipídicas polares quanto apolares, mesmo sob agitação simples, devido à maior capacidade de penetração e solvência (Zarrinmehr et al., 2022; Dahmer e Benitez, 2020). No entanto, essa menor seletividade pode resultar na coextração de compostos não lipídicos.

Misturas de solventes (por exemplo, hexano + diclorometano ou hexano + metanol) ampliam o espectro de lipídeos extraídos, mas podem apresentar limitações. O aumento da viscosidade e tensão superficial pode reduzir a eficiência da cavitação ultrassônica, limitando o efeito sinérgico esperado (Wichaphian et al., 2023). A escolha do método (ultrassom, micro-ondas ou agitação) impacta diretamente o rendimento e a seletividade, refletindo a interação significativa observada nas análises estatísticas.

A eficiência da extração lipídica de microalgas resulta, portanto, da interação entre solvente e método. É fundamental alinhar a polaridade do solvente, sua capacidade de penetração e o método de ruptura celular, para maximizar o rendimento e a seletividade dos lipídeos extraídos.

4 Conclusões

Os resultados obtidos demonstram que a eficiência da extração de bio-óleo de *Nannochloropsis oculata* é fortemente influenciada pela interação entre o solvente e o método de extração. O hexano associado ao ultrassom (H+U) apresentou o maior rendimento médio (14,95%), evidenciando que a combinação entre solvente apolar e cavitação acústica é a mais adequada para promover a ruptura celular e maximizar a difusão dos lipídios para a fase solvente.

O diclorometano com ultrassom (D+U) e a mistura hexano + diclorometano sob agitação e ultrassom (H+D/A+U) apresentaram rendimentos intermediários, confirmando o papel positivo do ultrassom na eficiência global do processo. Já os métodos com agitação simples mostraram rendimentos substancialmente menores, ressaltando que a intensificação por ultrassom é essencial para a extração eficiente.

A análise estatística (ANOVA e Tukey HSD) confirmou efeitos significativos de solvente, do método e da interação entre ambos, demonstrando que a escolha do solvente mais eficiente depende diretamente da técnica empregada. A ausência de efeito sinérgico na mistura H+D reforça que a combinação de solventes de diferentes polaridades não garante maior eficiência, sendo fundamental compreender a afinidade específica entre solvente e composição lipídica da biomassa.

Em síntese, a condição hexano + ultrassom destacou-se como a mais promissora para a extração de bio-óleo de *N. oculata* nas condições estudadas, apresentando potencial para aplicação em processos de obtenção de lipídios destinados à produção de biocombustíveis. Futuras investigações devem considerar a

variação de parâmetros operacionais, como tempo de ultrassom, temperatura e razão de biomassa e solvente, para aprimorar o rendimento e avaliar a seletividade da extração em escala ampliada.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio do CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Referências bibliográficas

- Bligh EG e Dyer WJ (1959) ‘A rapid method of total lipid extraction and purification’, *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8):911–917, <https://doi.org/10.1139/O59-099>.
- Dahmer MN e Benitez LB (2020) ‘COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE RUPTURA CELULAR E EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS DE BIOMASSA PERIFÍTICA’, *Revista Jovens Pesquisadores*, 10(1):1–9, <https://doi.org/10.17058/RJP.V10I1.14932>.
- Halim R, Danquah MK e Webley PA (2012) ‘Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review’, *Biotechnology Advances*, 30(3):709–732, <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2012.01.001>.
- Lee JY, Yoo C, Jun SY, Ahn CY e Oh HM (2010) ‘Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae’, *Bioresource Technology*, 101(1):S75–S77, <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2009.03.058>.
- Lima KFF, Porto PS da S e Freitas RR de (2018) ‘Métodos de extração de bio-óleo a partir da microalga *Nannochloropsis oculata*: uma análise bibliométrica’, *Research, Society and Development*, 7(6):e976190–e976190, <https://doi.org/10.17648/RSD-V7I6.259>.
- Martínez Macías M del R, Sánchez Duarte RG, Meza Escalante ER, Ulloa Mercado RG e Saldívar Cabrales J (2017) ‘Síntesis de lípidos de la microalga *Nannochloropsis oculata* para su uso potencial en la producción de biodiésel’, *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 33(Special Issue 1):85–91, <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.ESP02.08>.
- Mercer P e Armenta RE (2011) ‘Developments in oil extraction from microalgae’, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(5):539–547, <https://doi.org/10.1002/EJLT.201000455>.
- Ryckebosch E, Muylaert K e Foubert I (2012) ‘Optimization of an Analytical Procedure for Extraction of Lipids from Microalgae’, *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 89(2):189–198, <https://doi.org/10.1007/S11746-011-1903-Z>.
- Wei L e Huang X (2017) ‘Long-duration effect of multi-factor stresses on the cellular biochemistry, oil-yielding performance and morphology of *Nannochloropsis oculata*’, *PLOS ONE*, 12(3):e0174646, <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0174646>.
- Wichaphian A, Sriket N, Sensupa S, Pekkoh J, Pathom-aree W, Chromkaew Y, Suwannarach N, Kumla J, Cheirsilp B e Srinuanpan S (2023) ‘Value-added green biorefinery co-products from ultrasonically assisted DES-pretreated *Chlorella* biomass’, *Ultrasonics Sonochemistry*, 100:106628, <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2023.106628>.
- Zarrinmehr MJ, Daneshvar E, Nigam S, Gopinath KP, Biswas JK, Kwon EE, Wang H, Farhadian O e Bhatnagar A (2022) ‘The effect of solvents polarity and extraction conditions on the microalgal lipids yield, fatty acids profile, and biodiesel properties’, *Bioresource Technology*, 344:126303, <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.126303>.