

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA E  
AMBIENTAL**

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPÍDEOS  
DA MICROALGA *Chlorella pyrenoidosa* VISANDO À  
PRODUÇÃO DE ÉSTERES GRAXOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Carolina Vieira Viêgas**

**Rio Grande, Maio de 2010**

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPÍDEOS  
DA MICROALGA *Chlorella pyrenoidosa* VISANDO À  
PRODUÇÃO DE ÉSTERES GRAXOS**

por

**Carolina Vieira Viêgas**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental, Linha de Pesquisa em Química Orgânica Tecnológica, da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química Tecnológica e Ambiental.

Orientador: Dr. Marcelo Gonçalves Montes D'Oca

Rio Grande, RS, Brasil  
2010

**Universidade Federal do Rio Grande – FURG**  
**Escola de Química e Alimentos**  
**Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPÍDEOS  
DA MICROALGA *Chlorella pyrenoidosa* VISANDO À  
PRODUÇÃO DE ÉSTERES GRAXOS**

elaborada por  
**Carolina Vieira Viêgas**

como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química  
Tecnológica e Ambiental

**Comissão Examinadora**

---

**Professor Dr. Marcelo G. Montes D'Oca (Presidente/ Orientador) FURG**

---

**Professor Dr. Paulo César V. Abreu (Membro) FURG**

---

**Professor Dr. Joaquín Ariel Morón-Villarreyes (Membro) FURG**

---

**Professor Dr. Luiz Pereira Ramos (UFPR)**

**Rio Grande, Maio de 2010.**

Eu sou descendente zulu  
sou um soldado de ogum.  
Um devoto dessa imensa legião de  
Jorge, eu sincretizado na fé, sou  
carregado de axé e protegido por um  
cavaleiro nobre.

Deus adiante paz e guia  
encomendo-me a Deus e a virgem  
Maria minha mãe os doze apóstolos  
meus irmãos. Andarei neste dia nesta  
noite com meu corpo cercado vigiado  
e protegido pelas as armas de São  
Jorge. São Jorge sentou praça na  
cavalaria, eu estou feliz porque eu  
também sou da sua companhia.  
Eu estou vestido com as roupas e as  
armas de Jorge. Para que meus  
inimigos tendo pés não me alcancem  
tendo mãos não me peguem não me  
toquem. Tendo olhos não me  
enxerguem E nem em pensamento  
eles possam ter para me fazerem mal.  
Armas de fogo o meu corpo não  
alcançará, facas e lanças se quebrem  
sem o meu corpo tocar. Cordas e  
correntes se arrebentem sem o meu  
corpo amarrar. Pois eu estou vestido  
com as roupas e as armas de Jorge.  
Jorge é da Capadócia.

Salve Jorge!

**Dedico este trabalho as três razões da minha vida:  
Antônio, Cláudia e Giulliane**

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior; para superar as dificuldades, mostrar os caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades;

Ao professor Marcelo Montes D'Oca, pela oportunidade de aprender com ele, pela amizade, troca constante de conhecimento, por ter acreditado no meu trabalho e pelas críticas e sugestões relevantes feitas durante a orientação. Tu és exemplo de profissionalismo e determinação;

Ao querido amigo, professor e co-orientador Joaquin Ariel pela ajuda nos momentos em que mais precisei sua participação foi fundamental para a realização deste trabalho. Por sua amizade e por emails que muitas vezes me fizeram rir;

Aos professores Paulo Beck e Rosilene Clementin;

Aos professores da Banca Examinadora pela disponibilidade de tempo e por terem aceitado o convite;

Aos professores do curso de Química Tecnológica e ambiental que de uma forma ou de outra me ajudaram na construção do meu conhecimento;

Aos meus alunos de iniciação científica Diogo Machado e Sabrina Faria pela seriedade na realização dos experimentos;

Aos colegas de laboratório que sempre estiveram ao meu lado para me ajudar, em especial: Fábio Magalhães, Carolina Hack, Caroline Montes D'Oca e Paula Haertel;

À paciência da colega Juliana Lemões em ficar horas me ajudando nas ferramentas de Word;

À querida amiga Elisa Hennig, pela alegria constante, companheirismo e convivência pacífica e que apesar de estar longe contribuiu e muito para meu aprendizado;

À cumplicidade, do colega Rodrigo Duarte pelo companheirismo e momentos de descontração no Bar do Rosa Mística;

Às minhas duas grandes amigas que fiz no mestrado, Dani e Jacque pela intensa amizade, risadas, festas, pela rotina prazerosa vivida nestes dois anos de convívio diário. Pelas horas de estudo, pelo incentivo incessante e conselhos. Por muitas vezes vocês foram minha família;

À minha amada família pela força, incentivo constante, amor incondicional e que sempre entenderam minhas ausências, cujas raízes do amor vão além de qualquer limite;

Ao meu avô Antônio (*in memoriam*), grande incentivador de meus estudos;

À CAPEs e CNQq, pelo apoio financeiro;

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a minha formação pessoal e profissional, a vocês meus queridos amigos, que Deus os abençoe. Muito obrigada!

## RESUMO

**Título:** Extração e caracterização dos lipídeos da microalga *Chlorella pyrenoidosa* visando à produção de ésteres graxos

**Autor:** Carolina Vieira Viêgas

**Orientador:** Prof. Dr. Marcelo Gonçalves Montes D'Oca

A produção de biodiesel a partir do óleo de microalgas tem sido demonstrada na literatura usando rotas convencionais, que envolvem a extração dos lipídeos seguida pela sua conversão para ésteres graxos. A extração de lipídeos a partir da biomassa microalgal é uma etapa importante do processo global de produção de biodiesel. Este trabalho teve como objetivo determinar o teor de lipídeos da *Chlorella pyrenoidosa* bem como o perfil graxo dos diferentes extratos lipídicos.

Os métodos de extração utilizados envolveram o uso de ultrassom, agitação magnética e soxhlet na presença dos solventes: clorofórmio:metanol (2:1 v/v) (método de Bligh & Dyer), metanol, clorofórmio, etanol e hexano. Os melhores resultados foram obtidos a partir do método com agitação magnética utilizando clorofórmio:metanol 2:1 (v/v), onde foram extraídos em média de 20 % de lipídeos totais seguido de metanol (17 %), clorofórmio (10,5 %), etanol (7,8 %) e hexano (1,15 %). A presença dos ácidos graxos 14:0, 16:0, 18:1, 18:0, 18:2 e 18:3 foram confirmados pelas análises de cromatografia gasosa.

A partir das frações lipídicas extraídas foram realizadas as reações para obtenção dos ésteres graxos utilizando temperatura de 60°C por 4h na presença de 3% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em relação à massa de lipídeos. Os extratos lipídicos foram obtidos usando 100 g de biomassa seca. A partir das frações extraídas com clorofórmio:metanol 2:1 (v/v), metanol e etanol foram produzidos em média 6,40g, 8,98g, 6,98g de ésteres graxos, respectivamente.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA E AMBIENTAL

Dissertação de Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental, Rio Grande, Maio de 2010



## ABSTRACT

**Title: Extraction and characterization of the lipids from *Chlorella pyrenoidosa* for FAAEs production**

**Author: Carolina Vieira Viêgas**

**Advisor: Prof. Dr. Marcelo Gonçalves Montes D'Oca**

The production of biodiesel from microalgae oil has previously been demonstrated in the literature using conventional routes, which involves the extraction of the lipids from the microalgae biomass followed by its conversion to fatty esters. Extraction of lipids from the microalgal biomass is an important step in the overall process of biodiesel production. The present work aims to determine the *Chlorella pyrenoidosa* lipid percentual as well as its fatty acids profile.

The survey was carried under different conditions seeking comparative assessment of three extraction methods: Soxhlet, magnetic stirring, and ultrasonication performed on five solvent systems: chloroform:methanol (Bligh and Dyer method), methanol, chloroform, ethanol, and hexane. As results, the method using chloroform:methanol (2:1 v/v) and magnetic stirring showed the highest lipid extraction (20% of total lipids) followed by methanol (17 %), chloroform (10.5 %), ethanol (7.8 %), and hexane (1.15 %) systems. The presence of 14:0, 16:0, 18:1, 18:0, 18:2 and 18:3 free fatty acids was confirmed by CG analyses.

In addition, the fatty esters production from several algal lipidic extracts was carried out using H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> acid as catalyst (3 % in relation to the mass of lipids) for 4 hours at 60 °C. The lipidic extracts were obtained using 100g of the dry biomass. The reactions produced 6.40g, 8.98g and 6.98g of the FAAEs from extracts obtained with chloroform:methanol (2:1 v/v), methanol and ethanol, respectively.

FEDERAL UNIVERSITY OF RIO GRANDE

GRADUATE PROGRAM IN TECHNOLOGICAL AND ENVIRONMENTAL CHEMISTRY

M.Sc. Dissertation Rio Grande, May de 2010

## LISTA DE ABREVIATURAS

AM - Agitação Magnética

AOCS - American Oil Chemists' Society

ASTM - American Society for Testing and Materials

BD - Biodiesel

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CENPES – Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguel de Mello

CG - Cromatografia Gasosa

ha – hectare

IA – Índice de Acidez

II – Índice de Iodo

IS – Índice de Saponificação

IV- Espectrometria de Infravermelho

I - Número Médio de Duplas Ligações

PUFAs - Polyunsaturated Fatty Acids

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

TG - Triacilgliceróis

US – Ultrassom

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Fotobiorreator utilizado no cultivo de microalgas .....	<b>6</b>
<b>Figura 2</b> – Sistema de cultivo de microalgas em lagoas abertas .....	<b>7</b>
<b>Figura 3</b> – Fotografia microscópica da <i>Chlorella pyrenoidosa</i> .....	<b>13</b>
<b>Figura 4</b> - Estrutura dos diferentes lipídeos encontrados nas microalgas .....	<b>15</b>
<b>Figura 5</b> – Tratamento estatístico para os resultados obtidos na extração dos lipídeos.. .....	<b>43</b>
<b>Figura 6</b> - Percentagem extraída de ácidos graxos no método de ultrassom US <sub>1</sub> .....	<b>46</b>
<b>Figura 7</b> - Percentagem extraída de ácidos graxos no método US <sub>3</sub> .....	<b>46</b>
<b>Figura 8</b> - Percentagem extraída de ácidos graxos no método AM <sub>1</sub> .....	<b>47</b>
<b>Figura 9</b> - Percentagem extraída de ácidos graxos no método AM <sub>3</sub> .....	<b>47</b>
<b>Figura 10</b> – Cromatograma dos ésteres metílicos da <i>Chlorella pyrenoidosa</i> utilizando o método AM <sub>1</sub> na presença de clorofórmio: metanol (2:1 v/v).. .....	<b>48</b>
<b>Figura 11</b> – Cromatograma dos ésteres metílicos da <i>Chlorella pyrenoidosa</i> utilizando o método AM <sub>1</sub> na presença de clorofórmio.....	<b>48</b>

<b>Figura 12</b> – Cromatograma dos ésteres metílicos da <i>Chlorella pyrenoidosa</i> utilizando o método AM <sub>1</sub> na presença de metanol .....	<b>49</b>
<b>Figura 13</b> – Cromatograma dos ésteres metílicos da <i>Chlorella pyrenoidosa</i> utilizando o método AM <sub>1</sub> na presença de etanol. ....	<b>49</b>
<b>Figura 14</b> – Cromatograma dos ésteres metílicos da <i>Chlorella pyrenoidosa</i> utilizando o método AM <sub>1</sub> na presença de hexano .....	<b>50</b>
<b>Figura 15</b> – Cromatograma dos ésteres metílicos da <i>Chlorella pyrenoidosa</i> utilizando o método AM <sub>3</sub> na presença de hexano. ....	<b>50</b>
<b>Figura 16</b> – Produtos obtidos: Lipídeos (1), Biodiesel Bruto (2) e Biodiesel purificado (3).....	<b>57</b>
<b>Figura 17</b> – Massa de lipídeos e quantidade em gramas de ésteres graxos obtidos. ....	<b>59</b>
<b>Figura 18</b> – Espectro de IV dos ésteres etílicos de microalgas.....	<b>60</b>
<b>Figura 19</b> – Espectro de IV dos ésteres metílicos de microalgas.....	<b>60</b>
<b>Figura 20</b> – Espectro de ressonância magnética de <sup>13</sup> C do biodiesel metílico de <i>Chlorella pyrenoidosa</i> .....	<b>61</b>
<b>Figura 21</b> - Espectro de ressonância magnética nuclear <sup>1</sup> H do biodiesel metílico de <i>Chlorella pyrenoidosa</i> .....	<b>62</b>

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1</b> - Reações envolvidas na biossíntese de Triacilgliceróis em microalgas.....	<b>23</b>
<b>Esquema 2</b> - Seqüência de procedimentos utilizados para extração dos lipídeos. ....	<b>41</b>
<b>Esquema 3</b> - Fluxograma do processo utilizado para obtenção dos ésteres graxos a partir de microalgas.....	<b>57</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Efeito das diferentes culturas no perfil graxo das microalgas .....	<b>5</b>
<b>Tabela 2</b> – Comparação da produtividade de óleo entre microalgas e oleaginosas convencionais .....	<b>8</b>
<b>Tabela 3</b> – Produtividade de algumas espécies de microalgas .....	<b>11</b>
<b>Tabela 4</b> – Classificação científica da espécie <i>Chlorella pyrenoidosa</i> .....	<b>12</b>
<b>Tabela 5</b> – Teor lipídico de microalgas .....	<b>15</b>
<b>Tabela 6</b> – Composição (%) dos lipídeos das microalgas .....	<b>16</b>
<b>Tabela 7</b> – Procedimento de extração e rendimento de extração de algumas microalgas .....	<b>19</b>
<b>Tabela 8</b> – Composição da fração lipídica das microalgas de acordo com o solvente extrator.....	<b>19</b>
<b>Tabela 9</b> – Momento dipolar e constante dielétrica de alguns solventes.....	<b>20</b>
<b>Tabela 10</b> – Ácidos graxos da <i>Chlorella pyrenoidosa</i> sob diferentes formas de cultivo.....	<b>25</b>
<b>Tabela 11</b> – Comparação das propriedades do diesel com o biodiesel de microalgas e com o padrão ATSM .....	<b>29</b>

<b>Tabela 12</b> – Volumes de álcool e catalisador utilizado nas reações de obtenção de FAAEs.....	<b>38</b>
<b>Tabela 13</b> – Métodos e solventes utilizados para extração dos lipídeos .....	<b>40</b>
<b>Tabela 14</b> – Teor lipídico da <i>Chlorella pyrenoidosa</i> utilizando os diferentes métodos e solventes.....	<b>42</b>
<b>Tabela 15</b> – Perfil graxo dos lipídeos da <i>Chlorella pyrenoidosa</i> obtido a partir de difentes métodos de extração e solventes .....	<b>52</b>
<b>Tabela 16</b> – Caracterização oleoquímica de alguns óleos e gorduras .....	<b>54</b>
<b>Tabela 17</b> – Índices oleoquímicos calculados para os lipídeos da <i>Chlorella pyrenoidosa</i> extraídos com o método US <sub>1</sub> .....	<b>55</b>
<b>Tabela 18</b> – Rendimentos de extração dos lipídeos da <i>Chlorella pyrenoidosa</i> .....	<b>56</b>
<b>Tabela 19</b> – Rendimentos de biodiesel metílico e etílico de microalgas obtido a partir da extração da fração lipídica com método AM <sub>3</sub> . .....	<b>58</b>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>3</b>
2.1	Microalgas.....	3
2.2	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> .....	12
2.3	Composição da fração lipídica de microalgas .....	13
2.4.	Métodos de extração da fração lipídica de microalgas.....	17
2.5	Perfil graxo das microalgas.....	22
2.6	Potencialidade das microalgas para produção de biodiesel .....	26
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
3.1	Objetivo Geral .....	31
3.2	Objetivos específicos .....	31
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
4.1	Materiais e equipamentos .....	32
4.2	Métodos .....	33
4.2.1	Cromatografia de fase gasosa .....	33



4.2.2	Determinação da estabilidade oxidativa.....	33
4.2.3.	Determinação do teor de éster.....	33
4.2.4	Análise estatística.....	34
4.2.5	Método AM <sub>1</sub> - Extração dos lipídeos com agitação magnética.....	34
4.2.6	Métodos AM <sub>2</sub> , AM <sub>3</sub> e AM <sub>4</sub> - Extração dos lipídeos com agitação magnética .....	34
4.2.7	Método US <sub>1</sub> - Extração dos lipídeos com ultrassom.....	35
4.2.8	Método US <sub>2</sub> e US <sub>3</sub> - Extração dos lipídeos com ultrassom.....	35
4.2.9	Método S - Extração dos lipídeos com soxhlet .....	35
4.2.10	Derivatização dos ácidos graxos .....	36
4.2.11	Cálculo das características moleculares médias dos ácidos graxos .....	36
4.2.12	Reação de produção de FAAEs.....	37
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
5.1	Extração de lipídeos.....	39
5.2	Determinação do teor de lipídeos.....	41
5.3	Determinação do Perfil graxo.....	45
5.4.	Cálculo dos índices oleoquímicos com base no perfil graxo obtido para <i>Chlorella pyrenoidosa</i> .....	53
5.5	Produção de FAEEs a partir de <i>Chlorella pyrenoidosa</i> .....	55
5.6	Caracterização do biodiesel de microalgas .....	59
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>65</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Durante décadas, o interesse nos lipídeos de micro-organismos como microalgas, alguns fungos (leveduras, por exemplo) e bactérias tem aumentado. Isto se deve à essencial importância destes nas diversas cadeias tróficas e na possibilidade da aplicação comercial em distintas áreas como nutrição, saúde humana e animal, tratamento de águas residuais, produção de energia e obtenção de compostos de interesse das indústrias alimentícia, química e farmacêutica, dentre outras.<sup>1</sup>

Além da consolidada produção para a obtenção de biomassa, diversas microalgas têm sido cultivadas por sua capacidade de sintetizar compostos considerados nutracêuticos, como os ácidos graxos poliinsaturados<sup>2</sup> (ácido araquidônico - ARA, ácido eicosapentaenóico – EPA e ácido docosahexaenóico – DHA, por exemplo) e pigmentos carotenóides (astaxantina, betacaroteno, luteína, cantaxantina etc.), que apresentam propriedades terapêuticas.<sup>3,4</sup>

A biotecnologia de microalgas também demonstrou versatilidade em outros setores, podendo atuar no tratamento de efluentes e na biorremediação de metais pesados, nitrogênio e fósforo que podem causar eutrofização quando descartados diretamente em qualquer corpo d' água . A biomassa obtida nessa biorremediação pode servir como fonte de matéria-prima para produção de ração, fertilizantes e até mesmo ser utilizada na indústria de química fina.<sup>5</sup>

Segundo Meng e colaboradores<sup>6</sup>, as microalgas são os organismos fotossintetizantes mais eficazes no processo de conversão da energia luminosa em energia química e que vem ganhando destaque pelos benefícios ao meio ambiente, pois utilizam o CO<sub>2</sub> da atmosfera como nutriente. O cultivo de microalgas apresenta várias características interessantes: menor gasto de água quando comparados aos de cultivo de plantas e pode ser realizado em condições não adequadas para a produção de culturas convencionais.<sup>7</sup>

A partir desses aspectos, as microalgas possuem algumas vantagens em relação às oleaginosas convencionais e muitas destas características citadas acima

favorecem a utilização destes micro-organismos como matéria-prima na produção de biodiesel.<sup>7</sup>

O biodiesel é produzido a partir de fontes renováveis tais como óleos vegetais e gorduras animais. É um combustível limpo e renovável, cujas propriedades são similares às do óleo diesel e é definido como uma mistura de monoalquil ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos de gorduras animais e ou óleos vegetais.<sup>8</sup>

O biodiesel pode ser produzido por diferentes métodos e utilizando inúmeras matérias-primas. Óleos vegetais, gorduras animais, resíduos de óleos e gorduras, além de micro-organismos como as microalgas<sup>9</sup>, são matérias-primas promissoras na produção de biodiesel. Os óleos vegetais podem ser extraídos de oleaginosas como soja<sup>10, 11</sup>, mamona<sup>12</sup>, girassol<sup>13</sup>, arroz<sup>14</sup> e outras. As gorduras animais podem obtidas de aves, suínos e bovinos, enquanto que resíduos de óleos e gorduras são obtidos de abatedouros, restaurantes e também de estações de tratamento de esgotos.

O biodiesel apresenta algumas vantagens sobre o óleo diesel: é derivado de matérias-primas renováveis, reduz a atual dependência sobre os derivados do petróleo, é biodegradável e não contribui para um grande crescimento nos níveis de dióxido de carbono na atmosfera, e conseqüentemente ao efeito estufa.<sup>15</sup>

No cultivo de microalgas, todo o carbono acumulado advém das moléculas de dióxido de carbono presentes na atmosfera e são fixadas por elas para síntese de compostos como carboidratos, proteínas e lipídeos. Para uma produção de aproximadamente 100 toneladas de biomassa de microalgas, um total estimado de 183 toneladas de dióxido de carbono é absorvido.<sup>9</sup>

Desta forma, as microalgas são indicadas como substrato com alto potencial energético para a produção de biocombustíveis. Neste trabalho, um estudo sobre a extração de óleo seguido da produção de biodiesel de microalgas foi realizado, visando estudar a viabilidade de se utilizar esta matéria-prima para produção de biodiesel.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Microalgas

O termo microalgas não tem valor taxonômico, engloba microrganismos unicelulares com clorofila a e outros pigmentos fotossintéticos, os quais são capazes de realizar a fotossíntese e sua caracterização sistemática implica na consideração de uma série de critérios.<sup>16</sup> As microalgas são organismos microscópicos, coloniais ou filamentosos, coloridos, fotoautotróficos, procarióticos e eucarióticos.<sup>17</sup>

Os exemplos de microalgas procarióticas são cianobactérias (Cyanophyceae) e as microalgas eucarióticas são algas verdes (Chlorophyta) e diatomáceas (Bacillariophyta).<sup>1</sup> As microalgas estão presentes em todos os ecossistemas existentes na terra, representando uma variedade grande de espécies que vivem em condições extremas. Estima-se que mais de 50.000 espécies existam, mas somente um número limitado, de aproximadamente 30.000, já foram estudadas e analisadas.<sup>1</sup>

Conforme Arregondo-Vega<sup>18</sup>, as microalgas são produtores primários que armazenam energia solar para convertê-la em energia biológica, sendo as microalgas a base de inúmeras cadeias tróficas nos ambientes aquáticos. As microalgas são principalmente encontradas no meio marinho e água doce, sendo consideradas responsáveis por pelo menos 60% da produção primária da Terra.<sup>9</sup> Uma das características relevantes das microalgas é a capacidade destes microrganismos transformarem o dióxido de carbono presente na atmosfera e a luz solar em várias formas de energia, através do processo de fotossíntese. Através deste processo, são produzidos polissacarídeos, proteínas, lipídeos e hidrocarbonetos.<sup>9</sup>

A biomassa de microalgas e os extratos de biomassa vêm ganhando destaque no mercado mundial, sendo aplicadas de diferentes formas como na produção de proteína unicelular, lipídeos, carotenóides, clorofila, enzimas, ésteres, antibióticos, hidrocarbonetos e vitaminas.<sup>1</sup>

O aumento dessa demanda de produtos produzidos pelas microalgas deve-se, principalmente, ao fato de apresentarem substâncias com efeitos antioxidantes, ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), proteínas imunologicamente efetivas e compostos virostáticos.<sup>19</sup>

Peixes como bacalhau, savelha, arenque, anchova e sardinha contêm uma alta proporção de gordura e são empregados na obtenção de PUFA's. No entanto, os produtos extraídos destas fontes podem apresentar vários problemas, tais como: odor desagradável, contaminação com metais pesados, baixa estabilidade, presença de colesterol, produção variável e um complexo perfil de ácidos graxos, podendo apresentar mais de 40 tipos diferentes. Em contraste, os ácidos graxos das microalgas não apresentam as desvantagens citadas e a obtenção de ácidos graxos poliinsaturados a partir de cultura de microalgas representa uma fonte alternativa de produção desta classe de lipídeos.<sup>19</sup>

Para desenvolver o cultivo maciço de microalgas é necessário isolar e caracterizar as espécies, aprimorando as ferramentas genéticas em busca de características específicas como, por exemplo, o aumento da produtividade de lipídeos por litro de cultivo. No cultivo de microalgas, alguns fatores podem influenciar na produção desses lipídeos como: pH, nutrientes, intensidade de luz e temperatura. Estas condições ambientais podem ser controladas e as espécies selecionadas de acordo com o(s) ácido(s) graxo(s) desejado(s).<sup>20</sup>

Cada espécie de microalga produz diferentes teores de lipídeos, carboidratos e proteínas, pois estes minúsculos organismos têm a habilidade de alterar seu metabolismo de acordo com as mudanças na composição química do meio de cultura.<sup>21</sup> Por exemplo, o conteúdo lipídico da *Chlorella protothecoides* pode ser aumentando em 15 % depois da adição de glucose em meio sob limitação de nutrientes como nitratos alcançando 55 % de lipídeos em seu peso seco.<sup>22</sup> Na tabela 1, são listadas algumas condições de cultivo que afetam o perfil graxo das microalgas.

Huang e colaboradores<sup>23</sup> e Miao e Wu<sup>22</sup> apresentam dois sistemas de cultivo de microalgas, de forma a produzir energia química, sendo eles: Sistema fotoautotrófico (Autotrófico) e o heterotrófico, respectivamente.

No sistema fotoautotrófico, as microalgas são cultivadas na presença de luz e, através da fotossíntese, a microalga obtém energia da luz para fixar carbono e produzir produção de biomassa.<sup>18</sup> Todas as espécies de algas são fotoautotróficas. Embora o sistema autotrófico apresente eficiente incidência de luz sobre a cultura de microalgas, pode ocorrer que essa cultura tenha um crescimento muito lento devido

ao processo chamado de fotoinibição, ou seja, excesso de luz em dias ensolarados, acarretando uma menor produção celular.<sup>24</sup>

**Tabela 1** – Efeito das diferentes culturas no perfil graxo das microalgas<sup>21</sup>

<b>Tipo de cultura</b>	<b>Efeito no perfil graxo</b>
Baixa concentração de N	Aumenta o conteúdo lipídico
Alta concentração de N	Diminui a quantidade de C <sub>22</sub>
Aumento na intensidade luminosa	Aumenta a quantidade de ácidos graxos
Baixa temperatura	Aumenta a quantidade de ácidos graxos insaturados
Baixa temperatura	Aumenta a quantidade de 20:5 e 22:6
Mn <sup>+2</sup>	Aumenta o conteúdo lipídico
Alta concentração de CO <sub>2</sub>	Aumenta a quantidade de ácidos graxos insaturados
Baixa concentração de P	Aumenta o conteúdo lipídico

O cultivo de microalgas, através de um sistema heterotrófico, apresenta inúmeras vantagens em relação ao sistema anteriormente mencionado. Vantagens como a eliminação da exigência de luz, maior controle do processo de cultivo e baixo custo na colheita da biomassa. Um importante aspecto do sistema heterotrófico está relacionado ao baixo custo dos nutrientes, ou fontes de carbono, utilizados no processo de cultivo.<sup>23</sup>

As microalgas podem ser cultivadas em fotobiorreatores ou em lagoas abertas ou fechadas. Os fotobiorreatores consistem basicamente de um arranjo de tubos transparentes que podem ser feitos de material polimérico translúcido ou vidro. Este arranjo de tubos é acoplado a uma bomba de circulação e a uma coluna de degaseificação, formando um sistema totalmente fechado. O diâmetro dos tubos é dimensionado de forma a obter um melhor aproveitamento da luz, e o arranjo entre eles pode se apresentar na forma helicoidal, vertical e horizontal.<sup>9</sup>

O uso de fotobiorreatores (Figura 1) é mais adequado para algumas microalgas, principalmente as que são facilmente contaminadas por outros micro-organismos, ou aquelas que necessitam de um maior controle dos parâmetros físico-químicos do meio de cultivo. Existem algumas espécies de microalgas que podem sobreviver em ambientes extremos, como por exemplo, os gêneros *Arthrospira* e

*Dunalliella* que sobrevivem em ambientes com elevado ph e alta salinidade, respectivamente.<sup>23</sup>



**Figura 1** – Fotobiorreator utilizado no cultivo de microalgas<sup>25</sup>

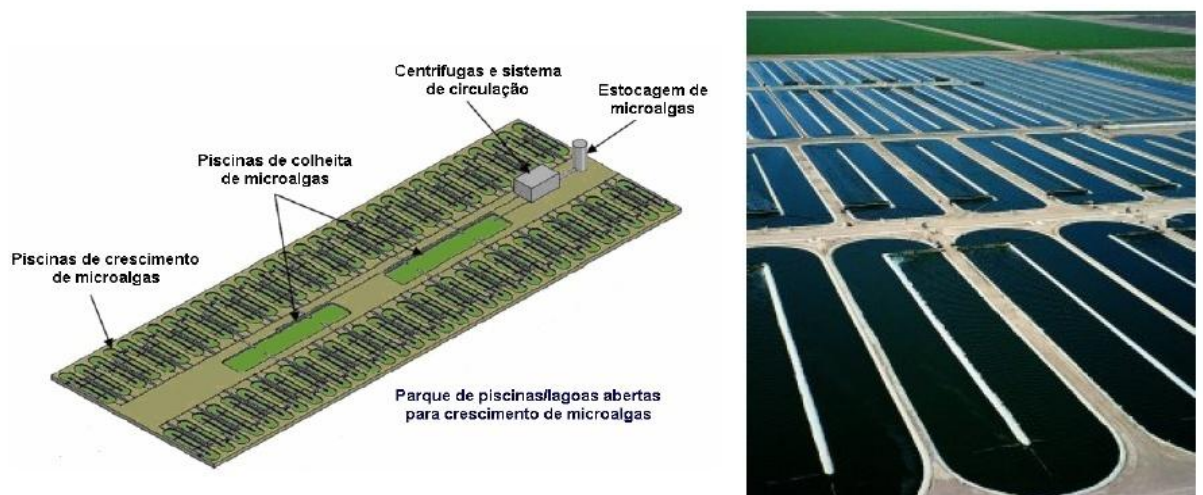
Para que o crescimento das microalgas seja satisfatório, alguns requisitos são necessários como a presença de dióxido de carbono, macro e micronutrientes além da incidência contínua de luz. Todos estes parâmetros são mais bem controlados com o uso de fotobiorreatores. Por outro lado, este sistema apresenta um custo de fabricação e operacional bastante elevado, devido à tecnologia e aos insumos necessários para colocá-lo em funcionamento.<sup>23</sup>

Os tanques para o cultivo de microalgas podem ser construídos em forma circular, retangular, elipsoidal ou cilíndrica, e podem ser conectados, formando um circuito fechado com recirculação e mistura. Independentemente da área do tanque, a profundidade varia de 20 a 30 cm, pois tanques muito profundos prejudicam o aproveitamento da luz pelas células. A agitação constante é essencial para promover uma distribuição uniforme das células, permitindo a iluminação de todas as células. A superfície interna é geralmente lisa, para facilitar a limpeza e evitar

danos resultantes do atrito de células com as paredes. O revestimento é feito com material plástico, fibra de vidro ou concreto e o material empregado no revestimento deve ser claro, para permitir maior reflexão de luz.<sup>26</sup>

Segundo Amin<sup>27</sup>, grande parte das microalgas produzidas atualmente são cultivadas em tanques abertos, considerando que esses tanques precisam ter acesso à luz solar, sendo que essa luz solar precisa estar disponível mesmo com possíveis variações sazonais e diárias.

Um problema presente no cultivo de microalgas em lagoas abertas em relação ao uso de fotobiorreatores, segundo Pérez<sup>28</sup>, está no fato de que as espécies com conteúdo mais elevado de óleo são as que se reproduzem mais lentamente. A partir desta realidade, facilmente ocorre à contaminação por espécies de microalgas e bactérias indesejáveis, devido à falta de um controle mais efetivo sobre o sistema em geral (Figura 2).



**Figura 2** – Sistema de cultivo de microalgas em lagoas abertas<sup>25</sup>

O crescimento das microalgas, tanto em seu ambiente natural como nos sistemas de cultivo, é o resultado da interação entre fatores biológicos, físicos e químicos. Normalmente, esses micro-organismos são mais encontrados em lugares ou regiões que apresentam um clima úmido ou tropical do que em regiões com clima mais seco. Todos esses aspectos estão diretamente relacionados ao acesso das



microalgas à iluminação, temperatura adequada, salinidade e também à disponibilidade aos nutrientes necessários.<sup>28</sup>

Embora o rendimento de óleo nas microalgas seja dependente de alguns fatores, esta quantidade ainda é muito superior às encontradas para as oleaginosas convencionais. Na tabela 2 são apresentados dados que comparam a quantidade de óleo sobre o peso seco e o rendimento de óleo por hectare por ano bem como a produtividade de biodiesel por área de cultivo.<sup>9</sup>

**Tabela 2 – Comparação da produtividade de óleo entre microalgas e oleaginosas convencionais<sup>9,29</sup>**

<b>Oleaginosa</b>	<b>Óleo (%)</b>	<b>Rend. de óleo (L oleo/ha ano)</b>	<b>Área necessária (m<sup>2</sup> ano/kg biodiesel)</b>	<b>Produtividade de biodiesel (kg biodiesel/ha ano)</b>
Milho ( <i>Zea mays</i> L.)	44	172	66	152
Maconha ( <i>Cannabis sativa</i> L.)	33	363	31	321
Soja ( <i>Glycine max</i> L.)	18	636	18	562
Jatropha ( <i>Jatropha curcas</i> L.)	28	741	15	656
Camelina ( <i>Camelina sativa</i> L.)	42	915	12	809
Canola ( <i>Brassica napus</i> L.)	41	974	12	862
Girassol ( <i>Helianthus annuus</i> L.)	40	1307	11	946
Mamona ( <i>Ricinus communis</i> )	48	1070	9	1156
Palma ( <i>Elaeis guineensis</i> )	36	5366	2	4747
Microalga (baixo teor de óleo)	30	58,700	0,2	51,927
Microalga (médio teor de óleo)	50	97,800	0,1	86,515
Microalga (alto teor de óleo)	70	136,900	0,1	121,104

A colheita da biomassa das microalgas não segue um regime de safras, pode ser realizada diariamente, pois tem um tempo de geração de poucas horas, o que permite cultivos contínuos. Para o cultivo deste tipo de matéria-prima não são necessárias áreas aráveis ou água potável, não competindo, portanto, com a agricultura, animais ou pessoas pela sua outorga.<sup>9</sup>

Após a colheita e extração do óleo, os meios de cultura são diretamente reaproveitados ou reciclados, os resíduos usados na produção de biogás por digestão anaeróbica e posterior co-geração de energia elétrica, para uso no próprio processo de cultivo, utilizando-se o CO<sub>2</sub> gerado pela combustão do biogás na aquíicultura das próprias microalgas, de forma a incrementar seu crescimento. Este

potencial de reaproveitamento pode ser incorporado pelas outras receitas, como da comercialização dos subprodutos da biomassa e da biodigestão. O aproveitamento dos resíduos poderá contribuir para redução dos custos de produção do biodiesel.<sup>9</sup>

Conforme Cohen e colaboradores<sup>29</sup>, a produção de microalgas pode ser justificada por apresentar diversas vantagens, dentre as quais podem ser destacadas:

- Um cultivo de microalgas é um sistema biológico eficiente na utilização da energia solar para produção de matéria orgânica, sendo que muitas espécies crescem mais rapidamente que as plantas terrestres, fato que possibilita maiores rendimentos da biomassa (maior produtividade).
- Sua natureza unicelular assegura uma biomassa com a mesma composição bioquímica, o que não ocorre nas plantas terrestres, que apresentam compostos localizados em partes específicas serem: nos frutos, folhas, sementes ou raízes;
- Podem crescer bem em regiões com extremas condições climáticas. Os cultivos podem ser desenvolvidos com água marinha ou de estuários, a qual não pode ser convencionalmente empregada no cultivo de plantas com valor para a agricultura, ou com água proveniente de diversos processos de produção (por exemplo: agropecuária, industrial e dejetos domésticos).
- Ciclo de vida da maioria das microalgas se completa em poucas horas, o que favorece a seleção de cepas e o melhoramento genético das espécies.

Além das vantagens na forma de cultivo dessas microalgas em relação aos vegetais superiores, o biodiesel das microalgas apresenta outras vantagens, que são listadas abaixo:<sup>30</sup>

- O CO<sub>2</sub> emitido na queima desse biocombustível é reabsorvido pelos vegetais e microalgas

- As microalgas podem ser utilizadas para o tratamento de efluentes contaminados com  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^-$ , no qual utilizam esses nutrientes para o crescimento.
- Após a extração do óleo, a biomassa restante pode ser processada para a produção de bioetanol, utilizada como ração animal e fertilizante, pois é fonte de nitrogênio e fósforo ou simplesmente queimada para gerar energia.
- Dependendo da espécie da microalga, outros compostos podem ser extraídos para diferentes aplicações industriais, compostos estes que estão incluídos no campo da química fina, como PUFA's, pigmentos, açúcares e antioxidantes.<sup>31</sup>

Algumas espécies de microalgas demonstraram potencialidades para a produção de biocombustíveis e podem ser consideradas como possíveis fontes de matérias-primas para o biodiesel. A *Chlorella* pode ser indicada com uma boa espécie para produção de biodiesel por apresentar alta produtividade por litro de cultivo, teor de óleo considerável e se adaptar bem as diferentes formas de cultivo (Tabela 3).

**Tabela 3 – Produtividade de algumas espécies de microalgas<sup>30</sup>**

<b>Microalga</b>	<b>Produtividade de lipídeos (mg/L/dia)</b>	<b>Volume de biomassa produzida (g/L/dia)</b>	<b>Área destinada à produção (g/m<sup>2</sup>/dia)</b>
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	-	-	11,5–17,4
<i>Botryococcus braunii</i>	-	0,02	3,0
<i>Chaetoceros muelleri</i>	21,8	0,07	-
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	17,6	0,04	-
<i>Chlorella emersonii</i>	10,3–50,0	0,036–0,041	0,91–0,97
<i>Chlorella protothecoides</i>	1214	2,00–7,70	-
<i>Chlorella sorokiniana</i>	44,7	0,23–1,47	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	11,2–40,0	0,02–0,20	0,57–0,95
<i>Chlorella</i> sp.	42,1	0,02–2,5	1,61–16,47/25
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	-	2,90–3,64	72,5/130
<i>Chlorella</i>	18,7	-	3,50–13,90
<i>Chlorococcum</i> sp.	53,7	0,28	-
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	-	10	-
<i>Dunaliella salina</i>	116,0	0,22–0,34	1,6–3,5/20–38
<i>Dunaliella primolecta</i>	-	0,09	14
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	-	0,12	-
<i>Dunaliella</i> sp.	33,5	-	-
<i>Ellipsoidion</i> sp.	47,3	0,17	-
<i>Euglena gracilis</i>	-	7,70	-
<i>Haematococcus pluvialis</i>	-	0,05–0,06	10,2–36,4
<i>Isochrysis galbana</i>	-	0,32–1,60	-
<i>Isochrysis</i> sp.	37,8	0,08–0,17	-
<i>Monodus subterraneus</i>	30,4	0,19	-
<i>Monallanthus salina</i>	-	0,08	12
<i>Nannochloris</i> sp.	60,9–76,5	0,17–0,51	-
<i>Nannochloropsis oculata</i>	84,0–142,0	0,37–0,48	-
<i>Nannochloropsis</i> sp.	37,6–90,0	0,17–1,43	1,9–5,3
<i>Neochloris oleoabundans</i>	90,0–134,0	-	-
<i>Pavlova salina</i>	49,4	0,16	-
<i>Pavlova lutheri</i>	40,2	0,14	-
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	44,8	0,003–1,9	2,4–21
<i>Porphyridium cruentum</i>	34,8	0,36–1,50	25
<i>Scenedesmus obliquus</i>	-	0,004–0,74	-
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	35,1	0,19	-
<i>Scenedesmus</i> sp.	40,8–53,9	0,03–0,26	2,43–13,52
<i>Skeletonema</i> sp.	27,3	0,09	-
<i>Skeletonema costatum</i>	17,4	0,08	-
<i>Spirulina platensis</i>	-	0,06–4,3	1,5–14,5/24–51
<i>Spirulina máxima</i>	-	0,21–0,25	25
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	17,4	0,08	-
<i>Tetraselmis suecica</i>	27,0–36,4	0,12–0,32	19
<i>Tetraselmis</i> sp.	43,4	0,30	-

## 2.2 *Chlorella pyrenoidosa*

O nome da microalga *Chlorella* provém do grego *chloro* (verde); e do sufixo diminutivo latino *ella* (pequeno), compreendendo em um gênero de algas verdes unicelulares, do Filo Chlorophyta. A classificação científica da microalga *Chlorella pyrenoidosa* está descrita abaixo (Tabela 4). A microalga *Chlorella pyrenoidosa* contém pigmentos verdes como a clorofila-a e -b em seu cloroplasto (aproximadamente 2 % do seu peso seco) que, através da fotossíntese, se multiplica rapidamente utilizando dióxido de carbono, água, luz solar e pequenas quantidades de minerais para reproduzir-se (Figura 3).<sup>32</sup>

**Tabela 4** – Classificação científica da espécie *Chlorella pyrenoidosa*<sup>32</sup>

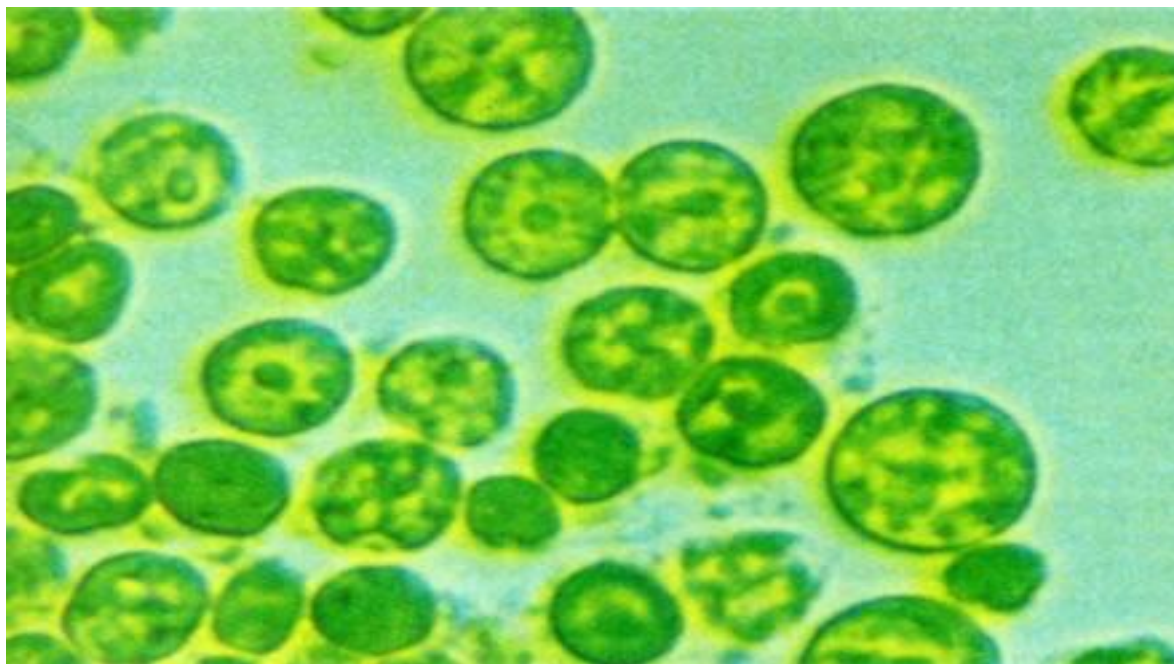
Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie
Protista	Chlorophyta	Chlorophyceae	Chlorococcales	Chlococeae	Chlorella	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>

O gênero *Chlorella* contém diversas espécies que produzem diferentes quantidades de lipídeos. Por exemplo, a *Chlorella vulgaris* apresenta 14-22 %<sup>33</sup> e a *Chlorella ellipsoidea*, 4,49 %<sup>34</sup>. De acordo com a literatura, a *Chlorella pyrenoidosa* apresenta de 2 %<sup>33</sup> a 11,93 % de lipídeos<sup>34</sup>. Variando as condições de cultivo, pode render de 18,9 % (com limitação de N) a 22,2 % de lipídeos (sob condições otimizadas) e ainda para esta mesmas condições de cultivo, foram obtidos 25,2 % e 38,0 %, respectivamente, para uma cepa mutante desta espécie.<sup>35</sup>

A *Chlorella* pode servir como uma fonte potencial de alimento e de energia devido a sua eficiência fotossintética, que é comparável com outros cultivos altamente eficientes como a cana-de-açúcar. Esta microalga pode ser uma atrativa fonte alimentar por sua alta proporção de proteína e outros nutrientes essenciais ao humano; seca, tem cerca de 57% de proteína, 2% de gordura, 26% de carboidratos, 2% de fibras, 10% de minerais e vitaminas.<sup>33,36</sup>

O bioquímico alemão Otto Heinrich Warburg recebeu o Prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina em 1931 por seu estudo da fotossíntese na *Chlorella*. Em 1961, Melvin Calvin da Universidade da Califórnia recebeu o Prêmio Nobel de

Química por seu estudo sobre os caminhos da assimilação do CO<sub>2</sub> em plantas usando a *Chlorella*.<sup>37</sup>



**Figura 3** – Fotografia microscópica da *Chlorella pyrenoidosa*

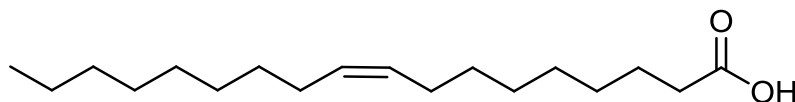
## 2.2 Composição da fração lipídica de microalgas

Os lipídeos caracterizam um conjunto de substâncias químicas que, ao contrário das outras classes de compostos orgânicos, não são caracterizadas por algum grupo funcional comum, e sim pela sua alta solubilidade em solventes orgânicos e baixa solubilidade em água.<sup>38</sup> Os azeites e gorduras são substâncias de origem vegetal ou animal, que consistem predominantemente em misturas de ésteres, oriundos da mescla de ácidos graxos com a glicerina, estes chamados de triacilgliceróis.<sup>39,40</sup>

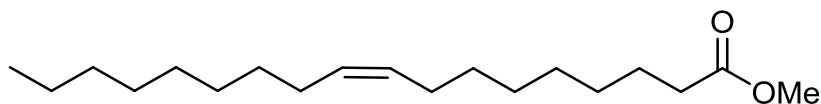
Os lipídeos são um dos principais macronutrientes categorizados geralmente como sendo neutros ou polares. Os lipídeos polares incluem além dos fosfolipídeos e glicolipídeos, predominantemente na maioria das microalgas na composição total dos lipídeos.<sup>41</sup> A classe típicas dos lipídeos complexos é formada por fosfolipídeos, glicolipídeos, ceramidas, cerebrosídeos e gangliosídeos. Os lipídeos neutros são

aqueles que não contêm grupos carregados, isto inclui triacilgliceróis, glicerídeos, carotenóides, esteróis e uma escala limitada dos hidrocarbonetos de alto peso molecular que aparecem naturalmente no óleo de alguns peixes, microalgas e sementes.<sup>19</sup>

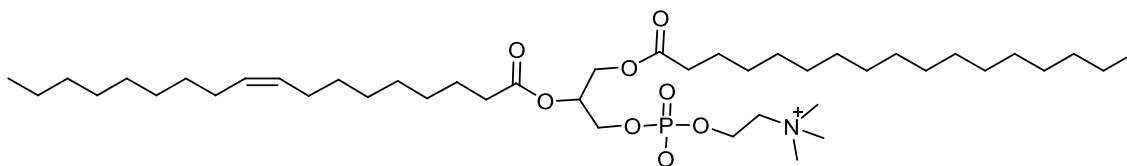
Triacilgliceróis são geralmente considerados como produto de estocagem energética, enquanto que glicolípídeos são estruturas lipídicas presentes na parede celular. Os lipídeos são tipicamente compostos por triacilgliceróis, glicolípídeos, fosfolípídeos, lipoproteínas e ácidos graxos contendo entre 12 e 22 carbonos, podendo ser saturados e poliinsaturados.<sup>19</sup> Na figura 4 podem ser observadas algumas estruturas químicas encontradas nos lipídeos das microalgas.



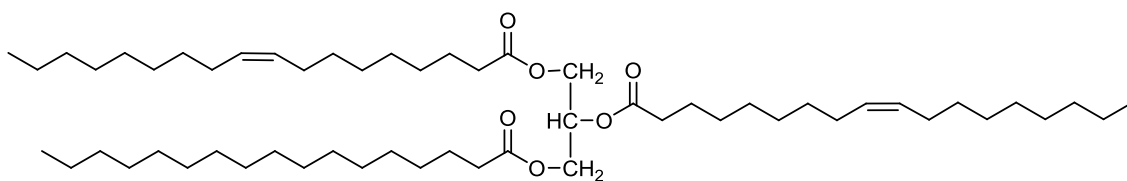
Ácido graxo



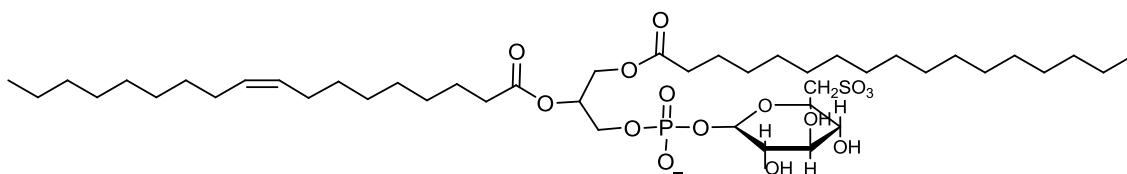
Éster graxo



Fosfolípídeo



Triglicerídeo



Glicolípido

**Figura 4** - Estrutura dos diferentes lipídeos encontrados nas microalgas

As microalgas podem ser consideradas uma fonte alternativa de lipídeos, por apresentarem altos teores destes que, segundo Chisti<sup>9</sup>, podem conter entre 15-75 % de lipídeos a partir de seu peso seco, dependendo da forma de cultivo (Tabela 5).

**Tabela 5** – Teor lipídico de microalgas<sup>9</sup>

Microalga	Conteúdo lipídico (% massa seca)
<i>Botryococcus braunii</i>	25–75
<i>Chlorella</i> sp.	28–32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16–37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis</i> sp.	25–33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris</i> sp.	20–35
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31–68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35–54
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20–30
<i>Nitzschia</i> sp.	45–47
<i>Schizochytrium</i> sp.	50–77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23

Os menores valores para este parâmetro foram observados em cianobactérias representantes do gênero *Anabaena* e *Oscilatória*, com 2 % e em *Arthrospira* com 6-7% com valores máximos sendo encontrados em diatomáceas entre 75-85% de lipídeos a partir de seu peso seco.<sup>21</sup>

Dentre a ampla variedade da composição lipídica de algumas microalgas, as espécies *Dunaliella tertiolecta* e *Nannochloris atomus* (Chlorophyceae) apresentam



um conteúdo lipídico polar entre 94-99% enquanto que pra microalgas *Tetraselmis suecica* (Prasinophyceae), este valor está em torno de 91,5% (Tabela 6).<sup>41</sup>

Segundo a tabela 6, podemos observar que o conteúdo polar, quando comparado ao resto da fração lipídica, é consideravelmente alto em relação a toda massa lipídica.

**Tabela 6** – Composição (%) dos lipídeos das microalgas<sup>41</sup>

<b>Microalga</b>	<b>Hidrocarbonetos, esteróis e ceras</b>	<b>Triacilgliceróis</b>	<b>Diacilglicé- rídios</b>	<b>Lipídeos polares</b>
<i>Isochrysis sp.</i>	0,4	2,8	0,2	83,0
<i>Isochrysis galbana</i>	-	44,6	0,8	53,9
<i>Pavlova lutheri</i>	0,2	4,0	6,3	78,3
<i>Chroomonas salina</i>	3,5	21,9	4,9	67,8
<i>Coscinodiscus sp.</i>	-	11,9	2,3	84,3
<i>Rhizosolenia setigera</i>	-	7,1	3,1	72,4
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	-	1,9	2,1	94,3
<i>Nannochloris atomus</i>	-	-	1,0	98,6
<i>Tetraselmis suecica</i>	1,8	3,3	1,9	91,5
<i>Amphora sp.</i>	-	2,1	0,9	92,4
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	0,4	8,4	6,1	72,8
<i>Chaetoceros gracilis</i>	1,3	34,0	6,0	44,2
<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	-	2,5	2,1	90,7
<i>Fragilaria pinnata</i>	-	5,0	3,7	89,1
<i>Haslea ostrearia</i>	-	14,5	1,7	53,9
<i>Navicula sp.</i>	-	47,7	0,1	50,1
<i>Nitzschia closterium</i>	-	0,3	0,3	89,7
<i>Skeletonema costatum</i>	0,8	1,7	1,7	84,6
<i>Thalassionema nitzschioides</i>	-	2,5	1,8	85,2
<i>Thalassiothrix heteromorpha</i>	-	5,9	3,6	59,4
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	1,2	14,4	2,8	80,4

## 2.4. Métodos de extração da fração lipídica de microalgas

Para obtenção de resultados confiáveis na extração de lipídeos de microalgas é necessário o conhecimento das principais classes lipídicas presentes e seus constituintes. O método para extração deve ser rápido, eficiente e delicado, a fim de reduzir a degradação dos lipídeos e triacilgliceróis. Na extração, os solventes devem ser baratos, voláteis (para serem removidos posteriormente), de baixa toxicidade, puros, imiscível em água e seletivos, ou seja, que não sejam extratores para compostos indesejáveis.<sup>19</sup>

Folch e colaboradores<sup>42</sup> desenvolveram um método usando uma mistura de clorofórmio e metanol (2:1 v/v), seguida pela adição de solução salina de KCl, visando uma melhor separação das fases lipídicas e aquosa. Bligh & Dyer<sup>43</sup> modificaram o método de Folch e propuseram um método rápido para extração e purificação de lipídeos totais utilizando clorofórmio:metanol:água (2:1:0,8 v/v).

Bligh & Dyer é um método bastante estudado e conhecido pelos pesquisadores da área para determinação de lipídeos totais. Os métodos de Folch e Bligh & Dyer são métodos de extração a frio para que a qualidade da fração lipídica não seja afetada.

O método de extração de Bligh & Dyer, utilizando clorofórmio: metanol (2:1 v/v) para amostras secas foi aplicado em uma grande variedade de materiais como tecido animal ou vegetal e micro-organismos com as microalgas.<sup>44</sup> Para o procedimento de extração dos lipídeos de microalgas não é necessária a homogeneização da amostra e a obtenção da fração lipídica é conduzida durante 2 horas na temperatura ambiente.<sup>19</sup>

A extração dos lipídeos de microalgas é normalmente realizada por processos como prensagem mecânica, a extração por solventes, fluídos supercríticos, utilizando-se enzimas, choque osmótico e extração ultra-sônica assistida. A extração utilizando o processo de prensagem é uma das opções mais simples. Neste processo, é utilizada uma prensa de forma a extrair uma grande porcentagem de óleo, através da compressão das microalgas contidas em um determinado volume de biomassa.<sup>28</sup>

A extração por solvente pode ser realizada isoladamente ou em conjunto com o método de prensagem, buscando, assim, um maior rendimento de óleo.<sup>28</sup> Em geral, são encontradas na literatura uma ampla variedade de solventes e métodos para a extração dos lipídeos das microalgas.

O etanol foi usado na extração dos lipídeos da microalga *Phaeodactylum tricorutum*<sup>45</sup>. Grima e colaboradores<sup>46</sup> realizaram a extração dos lipídeos da microalga *Isochrysis galbana* na presença dos solventes clorofórmio:etanol:água 1:2:0,8 (v/v), hexano:etanol 1:2,5 (v/v) e 1:0,9 (v/v), butanol, etanol, etanol:água 1:1 (v/v) e hexano:isopropanol 1:1,5 (v/v). Variando a temperatura e tempo de extração foi constatado que na presença de clorofórmio:etanol:água 1:2:0,8 (v/v) ocorreu um aumento no teor do lipídeos de acordo com o aumento da temperatura.

Para a extração dos lipídeos da microalga *Botryococcus braunii*<sup>47</sup> foram utilizados diferentes solventes como clorofórmio:metanol (2:1 v/v), hexano:isopropanol (3:2 v/v), dicloroetano/metanol (1:1 v/v), dicloroetano/etanol (1:1 v/v) e acetona/diclorometano (1:1 v/v) obtendo o melhor rendimento de 28 % na presença de clorofórmio:metanol (2:1 v/v). O etanol é um solvente bom para extração, porém, extrai alguns contaminantes como açúcares, aminoácidos, sais, proteínas hidrofóbicas e pigmentos que não são desejáveis na composição dos lipídeos.

Um dos métodos mais utilizados na literatura para este fim é o equipamento de soxhlet, que apresenta algumas vantagens em relação aos outros métodos como estar em constante contato com a amostra, o solvente estar sempre sendo renovado, metodologia simples e sem posterior procedimento para obtenção do óleo. O equipamento de soxhlet também foi utilizado para extração do óleo da *Chlorella prototecoides* na presença de hexano como solvente extrator e sob um tempo de 10 horas e temperatura de 60°C.<sup>22</sup> O método de soxhlet é sem dúvida o mais utilizado para extração de óleos devido a sua grande eficiência apresentada perante as matrizes vegetais e animais.

Conforme algumas referências encontradas na literatura, podem ser observadas outras proporções de solventes e tempos utilizados para o processo de extração dos lipídeos de microalgas (Tabela 7).

**Tabela 7** – Procedimento de extração e rendimento de extração de algumas microalgas

<b>Microalga</b>	<b>Tipo de Solvente</b>	<b>Tempo (min.)</b>	<b>Lipídeos extraídos (%)</b>	<b>Referências</b>
<i>Botryococcus sp.</i>	Clorofórmio: metanol (1:1)	3 x 20	11,5	47
<i>Scenedemus sp.</i>	Clorofórmio: metanol (1:1)	3 x 20	11,1	47
<i>Chlorella vulgaris</i>	Clorofórmio: metanol (1:1)	3 x 20	9,5	47
<i>Oedogonium sp.</i>	Hexano: éter (1:1)	1440	9,4	48
<i>Spirogyra sp.</i>	Hexano: éter (1:1)	1440	7,3	48

Lipídeos polares como fosfolipídeos e glicolipídeos requerem solventes com polares, tais como etanol ou metanol, para enfraquecer ligações de hidrogênio que os mantêm em. Em microalgas, a fração lipídica pode sofrer alterações em sua composição de acordo com a polaridade do solvente utilizado para sua extração (Tabela 8).<sup>19</sup>

**Tabela 8** – Composição da fração lipídica das microalgas de acordo com o solvente extrator<sup>19</sup>

<b>Solvente</b>	<b>Componentes extraídos</b>
Clorofórmio	hidrocarbonetos, carotenóides, clorofila, esteróis, triacilgliceróis, ceras, aldeídos e ácidos graxos
Acetona	diacilgliceróis, cerebrosídeos e sulfolipídeos
Metanol	fosfolipídeos e glicolipídeos
Hexano	hidrocarbonetos, Triacilgliceróis e ácidos graxos

A solubilidade dos lipídeos pode ser prevista qualitativamente pela análise estrutural das moléculas que compõem a fração. Há dois tipos de associações que

ocorrem para os lipídeos: i) forças de van der Waals nos lipídeos apolares (triacilgliceróis); ii) ligações de hidrogênio e forças eletrostáticas nos lipídeos polares (fosfolipídeos e glicolipídeos). Os triacilgliceróis por estarem ligados por forças de van der Waals, podem ser extraídos com solventes apolares como hexano e de média polaridade como o clorofórmio.<sup>49</sup>

As propriedades como o momento dipolar ( $\mu$ ) e a constante dielétrica ( $\epsilon$ ) podem ser levadas em consideração para o melhor entendimento dos componentes extraídos das frações lipídicas, que por consequência podem ser afetados de acordo com a polaridade de cada solvente (Tabela 9). De acordo com o conceito de polaridade uma molécula apolar é aquela em que a posição média de todos os centros das cargas positivas, coincide com o centro das negativas ( $\mu=0$ ). Numa molécula polar existe uma separação de cargas, ou seja, os centros não coincidem ( $\mu \neq 0$ ).<sup>38</sup>

**Tabela 9** – Momento dipolar e constante dielétrica de alguns solventes<sup>38</sup>

<b>Solvente</b>	<b>Fórmula</b>	<b><math>\mu</math></b>	<b><math>\epsilon</math></b>
Hexano	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	0	1,89
Ciclohexano	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	0	2,02
Benzeno	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	0	2,28
Tolueno	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	0,36	2,38
Clorofórmio	CHCl <sub>3</sub>	1,01	4,81
Dietiléter	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	1,15	4,34
Diclorometano	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1,60	9,08
Etanol	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	1,69	24,3
Metanol	CH <sub>3</sub> OH	1,70	32,6
Etilenoglicol	HOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	2,28	37,5
Acetona	CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	2,88	20,7
Água	H <sub>2</sub> O	1,85	78,5

Para a obtenção do biodiesel a partir de microalgas vários passos estão envolvidos no processo como: o cultivo, a colheita, extração dos lipídeos (rompimento da parede celular), e a reação de síntese do biodiesel (transesterificação).<sup>50</sup>

Na produção de biodiesel o rompimento da parede celular para extração dos lipídeos é um aspecto que deve ser considerado. Takeda<sup>51,52</sup> classifica as microalgas

de acordo com a composição dos sacarídeos da parede celular. Okuda<sup>53</sup> discute a diversidade das camadas celulares, por exemplo, as divisões de Chlorophyta, Rhodophyta, Ochrophyta apresentam parede celular celulósica; Prymnesiophyta têm parede celular composta por CaCO<sub>3</sub>, quitina e celulose; microalgas da espécie Diatomáceas apresentam sílica em volta de suas células; Euglenophyta apresentam uma película de proteína e Cyanobactéria têm parede de mureína (peptídeoglicano) com camada externa lipopolissacarídica.

Dessa forma dependendo da microalga deverão ainda ser realizados investimentos em tecnologias de ultrasonicação, homogeneização por alta pressão, moagem, presença de solventes orgânicos, microondas e outros procedimentos visando à quebra de parede celular.

O processo de desidratação das microalgas é comumente aplicado para aumentar o tempo de conservação desses micro-organismos. Muitos métodos são aplicados, por exemplo, em espécies como *Chlorella*, *Scenedesmus* e *Spirulina* como o *spray-drying*, *drum-drying* e *sun-drying*. Devido ao alto teor de água no interior dessas células, o *spray drying* não demonstra ser muito efetivo e é economicamente inviável para produtos de baixo valor, como biodiesel e proteínas.<sup>30</sup>

Para a extração dos lipídeos com solvente normalmente utiliza-se a biomassa liofilizada, sendo a liofilização um eficiente método que reduz qualquer tipo de degradação da matéria-prima. A ruptura da parede celular por choque osmótico é utilizado para liberar componentes celulares de organismos, como o óleo.<sup>50</sup>

As microondas, que quebram as células usando o choque de ondas de alta frequência, foram sugeridas recentemente como uma técnica para a extração de óleos vegetais.<sup>54,55</sup> A ultrasonicação racha a parede e a membrana de célula devido a uma cavitação o efeito foi amplamente utilizado interromper células microbianas<sup>37</sup> e a parede celular da diatomácea *Chaetoceros gracilis*<sup>56</sup>. As técnicas de quebra da parede celular são utilizadas para permitir uma melhor penetração do solvente no interior da célula. Embora nenhuma técnica padrão exista, a ultrasonicação parece ser um dos métodos mais comuns para assegurar acesso livre aos solventes e a subsequente extração os lipídeos.<sup>56</sup>

Para a extração dos lipídeos das microalgas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp. e *Botryococcus* sp., foram aplicadas as técnicas de trituração, autoclave, choque

osmótico, micro-ondas e ultrassonicação anteriormente à adição de solvente clorofórmio:metanol (2:1 v/v), visando o rompimento da parede celular. Neste caso, a utilização de micro-ondas e a trituração aumentaram significativamente a quantidade de lipídeos extraídos.<sup>50</sup>

Na extração dos lipídeos de algumas microalgas, o auxílio com equipamentos para a quebra da parede celular, quando comparados com os métodos convencionais (extração por solvente), melhoraram o poder de extração do óleo. Por exemplo, na presença de microondas e ultrassom, os tempos da extração foram reduzidos e os rendimentos foram aumentados entre 50-500% em massa. No caso da microalga marinha *Cryptothecodinium cohnii*, o ultrassom proporcionou um aumento no rendimento de 4.8% em soxhlet para um resultado considerável 25.9% de óleo.<sup>31</sup> Conseqüentemente, a quebra da e solvente apropriados proporcionam um aumento na quantidade de lipídeos extraídos.<sup>50</sup>

No método de extração por fluído supercrítico, utiliza-se o CO<sub>2</sub>. O gás é submetido à pressão até que se liquefaça, em seguida é aquecido ao seu ponto supercrítico, onde que apresenta propriedades tanto de líquido quanto de gás. A extração de óleo acontece, pois este fluído líquido atua como solvente. A extração dos lipídeos a partir de amostras liofilizadas da microalga *Chlorella vulgaris* foi estudada por Mendes e colaboradores<sup>57</sup>, que foram submetidas a CO<sub>2</sub> supercrítico a temperaturas de 40 e 55 °C e pressões de 20 e 35 MPa. Os rendimentos de extração dos lipídeos foram aumentados de acordo com o aumento da pressão. Esse método de extração também foi aplicado em espécies da microalgas como a *Spirulina platensis*.<sup>58</sup>

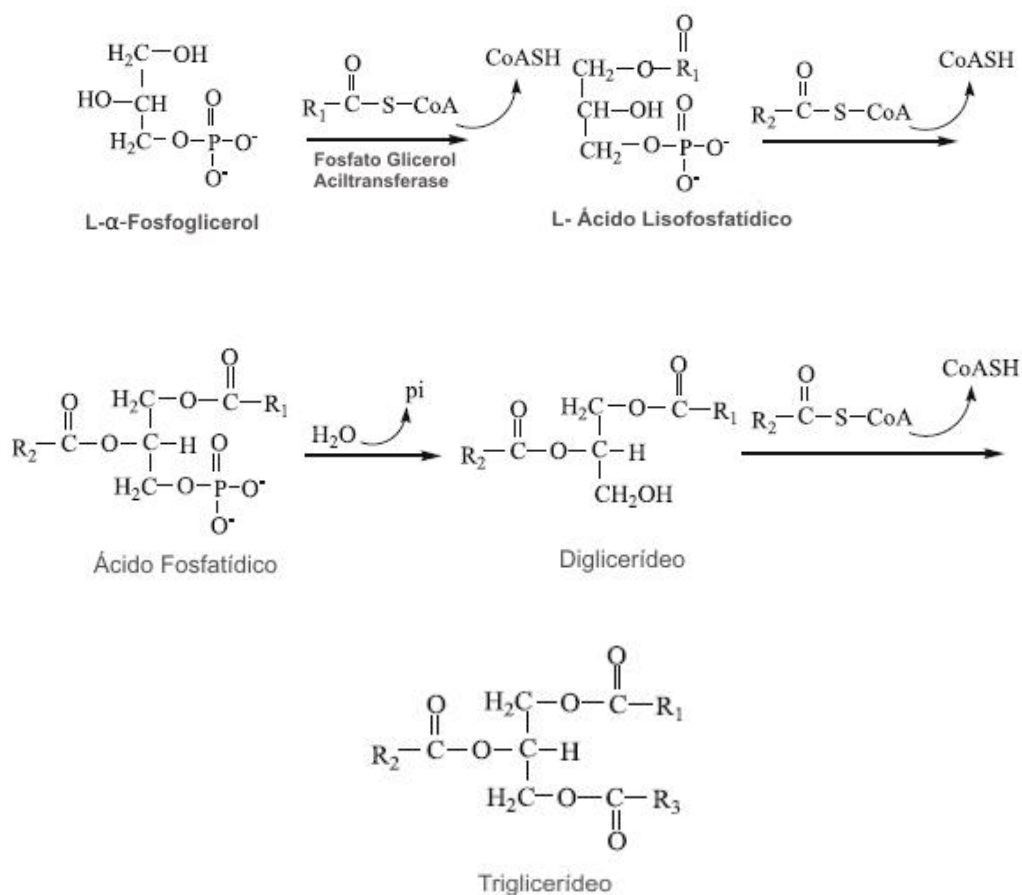
O processo de extração dos lipídeos representa a principal limitação para produção de produtos com baixo custo (combustíveis e alimentos) e aos co-produtos de valor mais elevado como ( $\beta$ -caroteno, polissacarídeos).

## 2.5 Perfil graxo das microalgas

Conforme Huang e colaboradores<sup>23</sup>, para que um triacilglicerol seja sintetizado pelas microalgas é necessário que ocorra a formação de acetil coenzima

A (acetil - CoA) no citoplasma da célula, seguida da elongação e dessaturação do carbono da cadeia de ácidos graxos e, por fim, a biossíntese de triacilgliceróis.

No esquema 1, é possível visualizar as reações envolvidas na síntese de triacilgliceróis.



**Esquema 1** - Reações envolvidas na biossíntese de triacilgliceróis em microalgas<sup>23</sup>

Neste processo químico, o primeiro passo é a reação da hidroxila da molécula do L-a-fosfoglicerol com o acetil-CoA, produzindo o ácido lisofosfatídico. É importante ressaltar que ambas as reações são catalisadas pela enzima Fosfato glicerol aciltransferase. Em seguida, o ácido lisofosfatídico reage com a segunda molécula de acetil-CoA e forma o ácido fosfatídico, o qual é hidrolisado para produzir o diglicerídeo. Por fim, a molécula de diglicerídeo se combina com a terceira molécula de acetil-CoA e completa-se, assim, a síntese de triglicerídeo.<sup>23</sup>



A composição dos ácidos graxos nas microalgas varia de espécie para espécie, diferindo e na composição do conteúdo de ácidos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados.

É possível observar uma grande variação na composição dos ácidos graxos presentes no óleo das microalgas, sendo constituído essencialmente de ácidos graxos insaturados como o palmitoleico, oleico, linolêico e linolênico. No entanto, por ácidos graxos saturados como o palmítico e o esteárico, também são encontrados em pequena quantidade.<sup>7</sup> A quantidade de ácidos graxos saturados nas microalgas está, em geral, situada entre 13,6-58,9% da soma de todos os ácidos graxos. Entre os ácidos graxos saturados ocorre uma predominância de palmítico, variando entre 2,9 - 63%, como por exemplo, na espécie *Spirulina*, que tem 25,8-63 % desse ácido. O ácido mirístico (C 14:0) predomina em certas espécies da classe Prymnesiophytia e Bacillariophyta contendo entre 20 – 3,7 %. Em muitas espécies, a quantidade de ácido esteárico constitui entre 0,1 – 16,3 % e o ácido láurico (C 12:0), entre 0,1 – 8,6%.<sup>41</sup> Nas microalgas *Thalassionema nitzschioides* e *Thalassiothrix heteromorpha* o ácido laurico predomina com uma quantidade entre 23,3 - 28,9% enquanto que a quantidade de ácido palmítico está entre 6,6 - 29%. Ácidos graxos como C15:0 e C17:0 estão presentes em menores quantidades 1 - 2% o C24:0 é raramente observado.<sup>41</sup>

Ácidos graxos monoinsaturados ligação estão nas microalgas entre 2,1 – 46,1%. ácido palmitoleico C 16:1  $\omega$ -7 seu conteúdo varia entre 0,5 – 44,8% na soma total dos ácidos graxos e são dominantes em Bacillariophyta, Prasinophyta e Prymnesiophyta.<sup>41</sup> O ácido C16:1  $\omega$ -9 constituem 0,1 – 30,1% da soma total dos ácidos graxos na microalga *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyta). Em microalgas da classe Chlorophyta (algas verdes), existe uma ampla variedade de ácidos graxos com 16 e 18 carbonos (saturados e insaturados).<sup>41</sup> A classe Chlorophyta geralmente apresenta uma composição de ácidos graxos similares àquelas encontradas em vegetais superiores e fungos e em algumas espécies dessa classe foi encontrada uma alta concentração de C20:5.<sup>59</sup>

A classe Chlorophyta tem uma enzima ativa, a estearil-CoA desaturase, que faz com que os níveis de ácidos graxos insaturados C18 sejam maiores nestas espécies.<sup>60</sup> O conteúdo de ácido oléico C18:1  $\omega$ -9 varia entre 0,1% a 35,5%. Dentre

os ácidos graxos que apresentam duplas ligações nas espécies de microalgas, o ácido linolênico C18: 2 ω-6 está presente em diferentes espécies num teor entre 0,1 – 24,3%. Para muitas espécies de microalgas o ácido linolênico é o ácido triênico dominante.

A biossíntese de C18 ocorre de duas formas: uma delas leva a formação de α-linolênico C18:3 ω-3 e outra via leva a formação de γ-linolênico C18:3 ω-6.<sup>41</sup> A síntese de alfa linolênico ocorre em particular em todas as cianobactérias com exceção da *Spirulina platensis*, em certos fungos e vegetais superiores enquanto que a síntese de gama-linolênico ocorre principalmente em animais.

De acordo Petkov e colaboradores<sup>61</sup>, a composição dos ácidos graxos de *Chlorella pyrenoidosa* (Tabela 10) podem sofrer variações a partir de diferentes modos de cultivo: fototrófico, fototrófico sem adição de nitrogênio e heterotrófico. Sendo possível observar a grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, característico em espécies de microalgas.

**Tabela 10 – Ácidos graxos da *Chlorella pyrenoidosa* sob diferentes formas de cultivo<sup>61</sup>**

<b>Ácidos graxos</b>	<b>Fototrófico</b>	<b>Fototrófico sem adição de N</b>	<b>Heterotrófico</b>
C14:0	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,2	1 ± 0,5
C16:0	22 ± 4	25 ± 2	22 ± 6
C16:1 <sup>7</sup>	2 ± 0,5	2.1 ± 0,5	5 ± 2
C16:1 <sup>9</sup>	1 ± 0,5	0.4 ± 0,2	2 ± 1
C16:2	7 ± 2	9 ± 2	7 ± 3
C16:3	14 ± 4	9 ± 3	8 ± 3
C18:0	0,8 ± 0,4	1,1 ± 0,4	4 ± 2
C18:1 <sup>9</sup>	5 ± 2	8 ± 2,5	6 ± 2
C18:1	1.5 ± 0,7	1,4 ± 0,2	4 ± 2
C18:2	18 ± 1,5	27 ± 2	21 ± 4
C18:3	27 ± 3	17 ± 2	18 ± 2

Dentre os PUFAs das microalgas os ácidos linoléico e linolênico são predominantes em quase todas as espécies.<sup>41</sup> A quantidade de ácido linoléico é principalmente alta em espécies como *Spirulina platensis* (Cyanophyceae), *Tetraselmis suecica* (Prasinophyceae), *Nannochloris atomus*, Chlorophyceae (*Chlorella* e *Dunaliella*), e *Porphyridium cruentum* (Bangiophyceae).<sup>41</sup>

A utilização de microalgas pode ser uma alternativa para obtenção de ácidos graxos para o consumo humano, visto que as microalgas são grandes produtoras de  $\omega$ -3.<sup>62</sup>

## 2.6 Potencialidade das microalgas para produção de biodiesel

O biodiesel é uma mistura de monoalquil ésteres de cadeia longa derivado de matérias-primas renováveis, como óleos vegetais e gorduras animais.<sup>63</sup> Para produção desse biocombustível são utilizados alguns processos como transesterificação, esterificação e craqueamento ou pirólise, sendo o processo de transesterificação ou alcóólise o mais utilizado.<sup>64</sup>

A transesterificação é a reação entre um óleo vegetal com um álcool de cadeia curta como metanol e etanol para formar monoésteres e glicerol. Esta reação é reversível e um excesso de álcool é usado para deslocar o equilíbrio para o lado dos produtos. Estequiometricamente, a reação de transesterificação requer 3 mol de álcool para cada mol de triglicerídeo para produzir 1 mol de glicerol e 3 de ésteres. Industrialmente, por se tratar de processo reversível são utilizados pelo menos 6 mols para cada 1 mol de triglicerídeo. Para que a reação de fato aconteça, o primeiro passo é a conversão dos triacilgliceróis à diglicerídeos, em seguida, a conversão de diglicerídeos à monoglicerídeos e, por fim, monoglicerídeos se convertem em monoésteres alquílicos e glicerol.<sup>64</sup>

Dentre os vários tipos de catalisadores estudados para a reação de transesterificação, os mais tradicionais são as bases e ácidos de Brønsted, sendo os principais exemplos os hidróxidos e alcóxidos de metais alcalinos e os ácidos sulfúrico, fosfórico, clorídrico e organossulfônicos.<sup>65</sup>

É reconhecido na literatura que a catálise básica tem problemas operacionais quando o óleo vegetal apresenta altos teores de ácidos graxos livre, pois são formados sabões que, além de consumirem parte do catalisador durante sua formação, acabam gerando emulsões e dificultando a separação dos produtos (ésteres e glicerina) no final da reação. O mesmo ocorre quando existe quantidade

considerável de água no meio reacional. Este contaminante leva à formação de ácidos graxos pela hidrólise dos ésteres presentes.<sup>8</sup>

Em geral, bases como os hidróxidos de sódio e de potássio são as mais utilizadas como catalisadores em uma concentração de 1 % em relação à massa do óleo.<sup>64</sup> Considerando o alto índice de ácidos graxos livres presentes no óleo das microalgas, a catálise básica não é indicada para o processo de transesterificação.<sup>22</sup>

A esterificação também é utilizada para produção de biodiesel e consiste na reação entre os ácidos graxos, encontrados nos óleos vegetais, com metanol ou etanol para formar ésteres metílicos ou etílicos, respectivamente, e água. Geralmente, a reação de esterificação é catalisada por ácidos inorgânicos como o ácido sulfúrico. A reação é reversível e o ácido catalisa tanto a reação direta (a esterificação) como a reação inversa (a hidrólise do éster). Assim, para deslocar o equilíbrio em favor dos produtos, podem-se utilizar dois métodos: remoção de um dos produtos, preferencialmente a água, ou utilizar um excesso de um dos reagentes, como o álcool.<sup>66</sup>

O processo de craqueamento ou pirólise de óleos e gorduras ocorre em temperaturas acima de 350 °C, na presença ou ausência de catalisador. Nesta reação, a quebra das moléculas dos triacilgliceróis leva à formação de uma mistura de hidrocarbonetos e compostos oxigenados, lineares ou cíclicos, tais como alcanos, alcenos, cetonas, ácidos carboxílicos e aldeídos, além de monóxido e dióxido de carbono e água. É interessante salientar que o tamanho e grau de insaturação dos compostos orgânicos obtidos dependem do esqueleto de carbono dos triacilgliceróis e de reações consecutivas dos produtos formados.<sup>8</sup>

Microalgas podem ser usadas para obtenção de energia de diferentes formas como, por exemplo, podem produzir biogases<sup>67</sup> sobre condições especiais de crescimento, a biomassa de microalgas pode ser queimada (pirólise)<sup>68,69</sup> para gerar calor, pode ser fermentada para obtenção de álcool etílico<sup>70</sup> e também podem ser utilizadas para produção de biodiesel<sup>22,48,71</sup>. Os óleos oriundos das microalgas são transesterificados para produzir o biodiesel<sup>22,48,71</sup>.

Existem algumas diferenças que podem ocorrer em relação ao óleo de microalgas. Uma delas está no fato de que, estas produzem muitos compostos poli-insaturados, o que leva à diminuição da estabilidade do biodiesel produzido.<sup>28</sup>

A produção de biodiesel a partir de microalgas foram demonstradas na literatura primeiramente a partir de rotas convencionais<sup>22,48,72</sup>, que envolvem a extração dos lipídeos seguidos pela reação de transesterificação.

Recentemente Sun e colaboradores<sup>73</sup>, realizaram a reação de transesterificação *in situ* do óleo de microalgas através de diferentes condições reacionais. Foram consideradas as seguintes condições no estudo, volume de metanol utilizado (20, 40, 60, 80 e 100 mL), temperatura (23, 30, 60 e 90°C), tempo de reação (1-12 horas) sob agitação (sem agitação, agitação na primeira hora, agitação com intervalos de 1 hora e agitação constante de 500 rpm) juntamente com 15g de biomassa. A partir das condições descritas acima foram verificadas o teor de 92% de conversão a ésteres graxos, sendo este valor obtido na presença de 60 mL de metanol, 60°C durante 1 hora e agitação constante. Neste mesmo trabalho foi observado que a umidade afetou o processo negativamente, sendo que o valor limite para inibir a reação foi acima de 31,7% (base seca). Da mesma forma chegando a 81,7% com 0,7 % (base seca) de umidade.

Outros exemplos de produção de biodiesel de microalgas obtidos de forma convencional são mostrados na literatura, Wu e colaboradores<sup>22</sup>, realizaram a transesterificação do óleo de microalga sob a combinação de 56:1(metanol/óleo) a temperatura de 30°C, 4 horas de reação e 100 % de catalisador ácido H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sob a massa inicial de lipídeos. Nessas condições ocorreu a redução do índice de acidez inicial de 8,92 mg de KOH/g para 0,374 mg de KOH/g.

No início da década de noventa Nagle e Lemke<sup>72</sup>, utilizaram dois tipos de catalisadores (HCl e NaOH) para a conversão do óleo de microalgas em biodiesel, estes autores mostraram que o uso de catalisadores ácidos para produção de ésteres metílicos a partir de microalgas resultou em maiores rendimentos do quando na presença catalisadores básicos sobre as mesmas condições. A influência da concentração do catalisador, tempo e temperatura da transesterificação também foram investigadas utilizando as seguintes condições HCl (0,6 M) em metanol por 1 hora a 70°C.<sup>72</sup> Foram obtidos neste experimento 68 % de conversão dos lipídeos em ésteres metílicos sob essas condições.

Na tabela 11 são apresentados alguns dados relacionando as propriedades encontradas no biodiesel de microalgas x diesel.

**Tabela 11** – Comparação das propriedades do diesel com o biodiesel de microalgas e com o padrão ATSM<sup>22</sup>

Propriedades	Biodiesel de microalgas	Diesel	Norma ATSM
Densidade(Kg/l)	0,864	0,838	0,86-0,9
Viscosidade (mm <sup>2</sup> /s, cSt a 40°C)	5,2	1,9-4,1	3,5-5,0
Ponto de fulgor ( °C)	115	75	min 100
Ponto de solidificação (°C)	-12	-50-10	-
Ponto de névoa (°C )	-11	-3,0 (max. -6)	verão max. 0;inverno <-15
Índice de acidez (mg KOH/g)	0,374	max.0,5	-
Poder calorífico (MJ/Kg)	41	40-45	-
Proporção de H/C	1,81	1,81	-

Houssain e colaboradores<sup>48</sup> estudaram a produção de biodiesel a partir de duas espécies de microalgas *Oedogonium* e *Spirogyra* usando 0,25g de hidróxido de sódio como catalisador e 24 mL de metanol durante 20 minutos obtendo uma conversão de 90 % do óleo em biodiesel.

De acordo com Seker e colaboradores<sup>71</sup>, estes autores utilizaram a microalga *Nannochloropsis oculata* para obtenção de biodiesel na presença de catalisadores heterogêneos como o CaO e MgO suportado em Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sob as seguintes condições: 50°C, 2 % de catalisador(em relação à massa do óleo), proporção molar de 6:1 e 30:1 durante 4 horas obtendo uma conversão de 97,5 % de ésteres metílicos na presença de CaO suportado em Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Segundo Wen e Johnson<sup>74</sup> um estudo foi realizado sobre a transesterificação da microalga *Schizochytrium limacinum* sendo primeiramente realizada a extração dos lipídeos seguida da transesterificação e transesterificação direta da biomassa de microalgas. Os testes foram realizados utilizando diferentes solventes extratores nos dois processos: clorofórmio, hexano e éter de petróleo. Para ambos os procedimentos foram utilizadas as mesmas condições reacionais 3,4 mL de metanol, 0,6 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> durante 40 minutos de reação a 90°C. O procedimento de extração-tranesterificação resultou em 82,6% de ésteres graxos, quando nenhum solvente foi usado na transesterificação direta, entretanto, o rendimento do biodiesel foi muito baixo (12,7%), indicando que o solvente extrator foi essencial para obtenção dos ésteres.

A partir de uma parceria da CENPES/PETROBRÁS–FURG/FAURG, estudos preliminares realizados pelo grupo de pesquisa Laboratório Kolbe de Síntese Orgânica indicaram resultados positivos para a produção de biodiesel de a partir da *Chlorella pyrenoidosa*, utilizando 3 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 30:1 metanol:ácido graxo.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

- O objetivo deste trabalho foi investigar diferentes métodos para extração dos lipídeos e o perfil graxo da *Chlorella pyrenoidosa* visando à produção de FAAEs.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Estudar os fatores que mais influenciam na extração dos lipídeos tais como: uso de diferentes solventes, tempo de extração e a utilização de sistemas como o Soxhlet, ultrassom e agitação magnética.
- Determinar o teor de lipídeos da *Chlorella pyrenoidosa*
- Determinar o perfil graxo das frações lipídicas extraídas da *Chlorella pyrenoidosa*.
- Determinar os índices oleoquímicos (*II*, *IS*, *MM*) das frações lipídicas extraídas da *Chlorella pyrenoidosa*.
- Produzir FAAEs a partir da fração lipídica da *Chlorella pyrenoidosa*.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais e equipamentos

A microalga *Chlorella pyrenoidosa* foi obtida comercialmente através da Galena<sup>®</sup> (Campinas-SP, Brasil) o laudo emitido pela empresa apresentou composição de 61,3% de proteínas, 21,0% de carboidratos, 2,3% de clorofila e granulometria de 120 mesh.

Para as extrações, a amostra foi conservada em congelador a -5°C em recipiente protegido da luz. A microalga foi previamente seca em estufa a 60°C até peso constante.

Para as extrações, todos os solventes utilizados foram da marca *Synth*<sup>®</sup> e de grau P.A. A placa aquecedora e agitadora utilizada nestes procedimentos foi da marca *Fisatom*<sup>®</sup> modelo 501 e o equipamento de banho de ultrassom da marca *Quimis*<sup>®</sup> modelo USC-1400/40 kHz.

A análise do perfil graxo foi realizada em um equipamento GC-2010 *Shimadzu*<sup>®</sup> equipado com injetor split/splitless e detector por ionização de chama (FID). As análises de espectrometria de infravermelho foram realizadas em um equipamento da marca *Shimadzu*<sup>®</sup>-IR PRESTIGE-21. Os espectros foram obtidos na faixa de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 1  $\text{cm}^{-1}$  usando 64 varreduras por espectro. As análises foram lidas utilizando células de NaCl quando líquidas ou por refletância difusa quando sólidas. As análises espectroscópicas no RMN foram realizadas em um equipamento *Varian* MR-400 9,40 T de campo magnético (CENPES/PETROBRAS) utilizando a concentração de aproximadamente 40% (para  $^{13}\text{C}$ ) e de 6% (para  $^1\text{H}$ ) em solução de  $\text{CDCl}_3$ . Os espectros foram gerados na temperatura ambiente em tubo de 5 mm.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Cromatografia de fase gasosa

A análise do perfil graxo foi realizada nas seguintes condições: Injetor: SPL, 250 °C, injeção split 1:50, modo de velocidade linear, vazão 1 mL/min, volume de injeção 1 µL; Coluna: Rtx-wax (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); temperatura do Forno: 200 °C, com tempo total de análise de 30 min, Temperatura do Detector, 260 °C. A identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação com o tempo de retenção de padrões. Foram utilizadas padrões individuais de ácidos graxos saturados, do C6:0 ao C24:0, na forma de ésteres metílicos. Também foi utilizada a mistura padrão de ésteres metílicos de PUFA nº 1, de fonte marinha, e nº 3, de óleo de Savelha, todos da Supelco.

### 4.2.2 Determinação da estabilidade oxidativa

As análises pelo rancimat foram realizadas pelo CENPES/PETROBRAS utilizando uma massa de aproximadamente 3,0 g de amostra, atmosfera de oxigênio puro a 10 L h<sup>-1</sup>, à temperatura de 110° C, seguindo a metodologia EN 14112 estabelecida pela Resolução ANP 42 de 24/11/2004.

### 4.2.3. Determinação do teor de éster

As amostras foram analisadas após tratamento com hexano, analisada por Cromatografia Gasosa (GC). O cromatógrafo utilizado foi o GC-2014 Shimadzu® com injetor split/splitless com detecção por ionização em chama (FID) e coluna Rtx-wax (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Restek). As condições de análise foram feitas de acordo com a DIN EN14103.

#### 4.2.4 Análise estatística

O extrato lipídico a partir dos diferentes métodos foi comparado de acordo com o solvente usando o software Estatística<sup>®</sup> ANOVA, Tukey test. O nível de diferença significativa foi de  $P < 0.05$ .

#### 4.2.5 Método AM<sub>1</sub> - Extração dos lipídeos com agitação magnética

Em um tubo de ensaio foram adicionadas 1 g de amostra juntamente a 6 mL de solvente, clorofórmio:metanol (2:1 v/v), clorofórmio, metanol, etanol ou hexano, deixando-se sob agitação magnética na velocidade de 700 rpm durante o tempo de 20 minutos na temperatura ambiente. Posteriormente, a amostra foi centrifugada à 2000 rpm durante 5 minutos. A fase orgânica foi cuidadosamente recolhida com uma pipeta de Pasteur e o solvente evaporado em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Foram adicionados à biomassa resultante mais 6 mL de solvente e o procedimento foi repetido por mais 1 vez. A fração lipídica foi seca até peso constante em estufa a 60°C. O método de extração AM<sub>1</sub> foi realizado em triplicatas.

#### 4.2.6 Métodos AM<sub>2</sub>, AM<sub>3</sub> e AM<sub>4</sub> - Extração dos lipídeos com agitação magnética

Em um tubo de ensaio foram adicionadas 1 g de amostra juntamente a 6 mL de solvente clorofórmio:metanol (2:1 v/v), clorofórmio, metanol, etanol ou hexano, deixando-se sob agitação magnética a velocidade de 700 rpm durante o tempo de 20, 120 e 1440 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente a amostra foi centrifugada a 2000 rpm durante 5 minutos. A fase orgânica foi cuidadosamente recolhida com uma pipeta de Pasteur e evaporada sob pressão reduzida. A fração lipídica foi seca até peso constante em estufa a 60°C. Os métodos de extração AM<sub>2</sub>, AM<sub>3</sub> e AM<sub>4</sub> foram realizados em triplicatas.

#### 4.2.7 Método US<sub>1</sub> - Extração dos lipídeos com ultrassom

Em um tubo de ensaio foram adicionadas 1 g de biomassa juntamente com 6 mL de solvente clorofórmio:metanol (2:1 v/v), clorofórmio, metanol, etanol ou hexano, sob ação do banho de ultrassom (40 kHz) durante o tempo de 20 minutos na temperatura ambiente (20°C). Posteriormente, a amostra foi centrifugada à 2000 rpm durante 5 minutos. A fase orgânica foi cuidadosamente recolhida com uma pipeta de Pasteur e evaporada sob pressão reduzida. Foi adicionado à mesma biomassa mais 6 mL de solvente e o procedimento foi repetido por mais 1 vez. A fração lipídica foi seca até peso constante em estufa a 60°C. O método de extração US<sub>1</sub> foi realizado em triplicatas.

#### 4.2.8 Método US<sub>2</sub> e US<sub>3</sub> - Extração dos lipídeos com ultrassom

Em um tubo de ensaio foram adicionadas 1 g de biomassa juntamente com 6 mL de solvente clorofórmio:metanol (2:1 v/v) ou clorofórmio ou metanol ou etanol ou hexano, sob ação do banho de ultrassom durante os tempos de 20 e 120 minutos à temperatura ambiente (20°C). Posteriormente a amostra foi centrifugada à 2000 RPM durante 5 minutos. A fase orgânica cuidadosamente foi recolhida com uma pipeta de Pasteur e evaporada sob pressão reduzida. A fração lipídica foi seca até peso constante em estufa a 60°C. Os métodos de extração US<sub>2</sub> e US<sub>3</sub> foram realizados em triplicatas.

#### 4.2.9 Método S - Extração dos lipídeos com soxhlet

Em um cartucho de celulose foram pesados 1,5 g de biomassa seca, a amostra foi coberta com algodão levemente umedecido com solvente. A extração foi realizada durante o período de 4 horas em aparelho de soxhlet na presença de 150 mL dos solventes clorofórmio:metanol (2:1 v/v), metanol, clorofórmio, etanol ou hexano. A temperatura foi mantida constante no aparelho extrator, dentro da faixa de ebulição de cada um dos solventes. Durante este período, foram observadas entre

8-10 sifonagens do solvente por hora na câmara de extração. Após a extração, o solvente foi evaporado em evaporador rotatório sob pressão reduzida e a fração lipídica foi seca até peso constante em estufa a 60°C.

#### 4.2.10 Derivatização dos ácidos graxos

A derivatização dos ácidos graxos foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Metcalfe e colaboradores<sup>78</sup>, no qual a amostra contendo 300 mg de lipídeos foi colocada em um tubo de ensaio, sendo adicionada à mistura 3 mL de trifluoreto de boro em metano (20% de metano). A mistura foi aquecida em banho-maria a 70°C por 20 minutos. Para recuperação dos ésteres, a mistura foi lavada em um funil de separação com 15 mL de hexano e 20 mL de água destilada. O funil foi agitado vigorosamente e as fases orgânica e aquosa foram separadas. A fase aquosa foi drenada e descartada. A fase orgânica contendo os ésteres foi drenada e o solvente foi evaporado em evaporador rotativo a 50 °C.

#### 4.2.11 Cálculo das características moleculares médias dos ácidos graxos

As características moleculares médias dos ácidos graxos foram calculadas segundo Morón-Villarreyes<sup>88</sup>, de acordo com a regra de Kay, para determinação das propriedades médias dos ácidos graxos que a partir do perfil cromatográfico dos lipídeos microalgais. Para obtenção desses valores foram utilizadas as seguintes expressões:

$$MM_{AG} = \frac{100}{\sum \frac{Z_i}{M_i}}$$

onde:  $MM_{AG}$ : Massa molar do ácido graxo

$Z_i$  : Percentagem do ácido graxo

$M_i$ : Massa molar do respectivo triglicerídeo

$$MM_{TG} = \frac{1658316,92}{IS}$$

De posse da caracterização oleoquímica (*IS* e *II*) podem ser estimadas as características médias dos ácidos graxos através das seguintes expressões abaixo:

$$n = \frac{3999,95 + 0,318II}{IS} \quad 3,185$$

$$I = 2,210 \frac{II}{IS}$$

$$M = 14,026n - 2,016I + 31,999$$

Onde: n: Número médio de carbonos nos ácidos graxos de um óleo (triglicerídeo):  
 I: Número médio de insaturações presentes em cada ácido graxo:  
 M: Massa molecular média do ácido graxo

#### 4.2.12 Reação de produção de FAAEs

Em um béquer de 600 mL foram adicionadas 100 g de microalgas juntamente com 300 mL de solvente, clorofórmio:metanol 2:1 (v/v), metanol ou etanol, deixando-se sob agitação magnética durante 2 horas (método AM<sub>3</sub>). A amostra foi filtrada, a fase orgânica foi evaporada sob pressão reduzida e seca em estufa a 60°C até peso constante.

Depois de extraídos os lipídeos, a reação foi realizada utilizando a proporção molar de álcool:ácido graxo (ácido linolênico) de 30:1 e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como catalisador ácido a 3% em relação a massa de lipídeos, sob a temperatura de 60°C durante 4 horas e sob agitação constante. Os volumes de álcool e catalisador utilizados nas reações estão listados na tabela 12.

**Tabela 12** – Volumes de álcool e catalisador utilizado nas reações de obtenção de FAAEs.

<b>Entrada</b>	<b>Massa de lipídeos (g)</b>	<b>Álcool</b>	<b>Volume de álcool (mL)</b>	<b>Volume de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (mL)</b>
1	20,92	CH <sub>3</sub> OH	72,08	0,66
2	22,13	CH <sub>3</sub> OH	75,91	0,75
3	19,92	CH <sub>3</sub> OH	68,24	0,62
4	20,51	CH <sub>3</sub> OH	70,16	0,64
5	19,90	CH <sub>3</sub> OH	68,24	0,62
6	15,70	CH <sub>3</sub> OH	53,87	0,50
7	7,00	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	34,56	0,22

Foram utilizados na reação álcool etílico e metílico para a síntese do biodiesel sob as mesmas condições. Para o acompanhamento da reação utilizou-se a cromatografia em camada delgada (CCD) com o eluente: hexano e éter, na proporção de 9:1. Após, foram adicionados 200 mL de hexano ao bruto reacional mantendo-se a mistura sob agitação magnética (700 rpm) durante 2 horas na temperatura ambiente. A amostra foi filtrada em funil e papel filtro. A fase orgânica foi recolhida em um balão de 250 mL e posteriormente evaporada em evaporador rotatório.

Depois de separado o biodiesel foi purificado através de uma coluna cromatográfica empacotada com 150 g de sílica e hexano como eluente. As eluições foram inicialmente com hexano puro, mas houve dificuldade na remoção dos éteres da fase estacionária. Posteriormente, a polaridade do eluente foi aumentada utilizando 5 % acetato de etila em hexano.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Extração de lipídeos

A *Chlorella pyrenoidosa* foi adquirida comercialmente a partir da empresa Galena<sup>®</sup>, e a biomassa foi seca em estufa à temperatura de 60°C até peso constante. Posteriormente, após investigou-se a extração dos lipídeos da *Chlorella pyrenoidosa*, avaliando o tipo de solvente o tempo de extração a quantidade de solvente, toxicidade do solvente e o sistema de extração.

Em nosso trabalho, a extração dos lipídeos foi realizada utilizando solventes com diferentes polaridades, clorofórmio, hexano, etanol, metanol e a mistura de clorofórmio:metanol (2:1 v/v, Bligh & Dyer), a fim de definir qual o mais apropriado para extração dos lipídeos. Neste estudo, também foi investigada a composição dos ácidos graxos presentes em cada extrato.

O hexano foi escolhido por ser um solvente amplamente utilizado na indústria química para extração de óleo, segundo o método IUPAC 1.122.<sup>75</sup>. O hexano é tido como solvente ideal para esta extração por ser um solvente apolar.

O metanol e o etanol também foram escolhidos como solventes, pois estes seriam vantajosos por simplificarem os processos de extração e síntese de biodiesel. O etanol é oriundo de uma fonte renovável, é amplamente usado na indústria e tem o Brasil o segundo maior produtor mundial, já o metanol é um solvente tóxico, sendo produzido na sua maior parte a partir do petróleo.

A mistura clorofórmio:metanol (2:1 v/v) já foi amplamente utilizada na literatura para extração de lipídeos de diferentes matérias-primas, apesar da toxicidade dos solventes. Este método de extração foi desenvolvido por Bligh & Dyer<sup>43</sup> e para fins de comparação foi utilizado como referência em nosso trabalho. O clorofórmio foi também testado para verificar o poder individual de extração de cada solvente, comparado com o metanol e com a mistura clorofórmio:metanol (2:1 v/v). Cabe salientar, que a utilização de clorofórmio como solvente apresentaria uma desvantagem se aplicado em larga escala, devido à sua toxicidade.



Os métodos de extração foram realizados em diferentes tempos e sob agitação magnética, banho de ultrassom e soxhlet (Tabela 13). Foram realizadas também triplicatas para todos os procedimentos de extração.

**Tabela 13** – Métodos e solventes utilizados para extração dos lipídeos

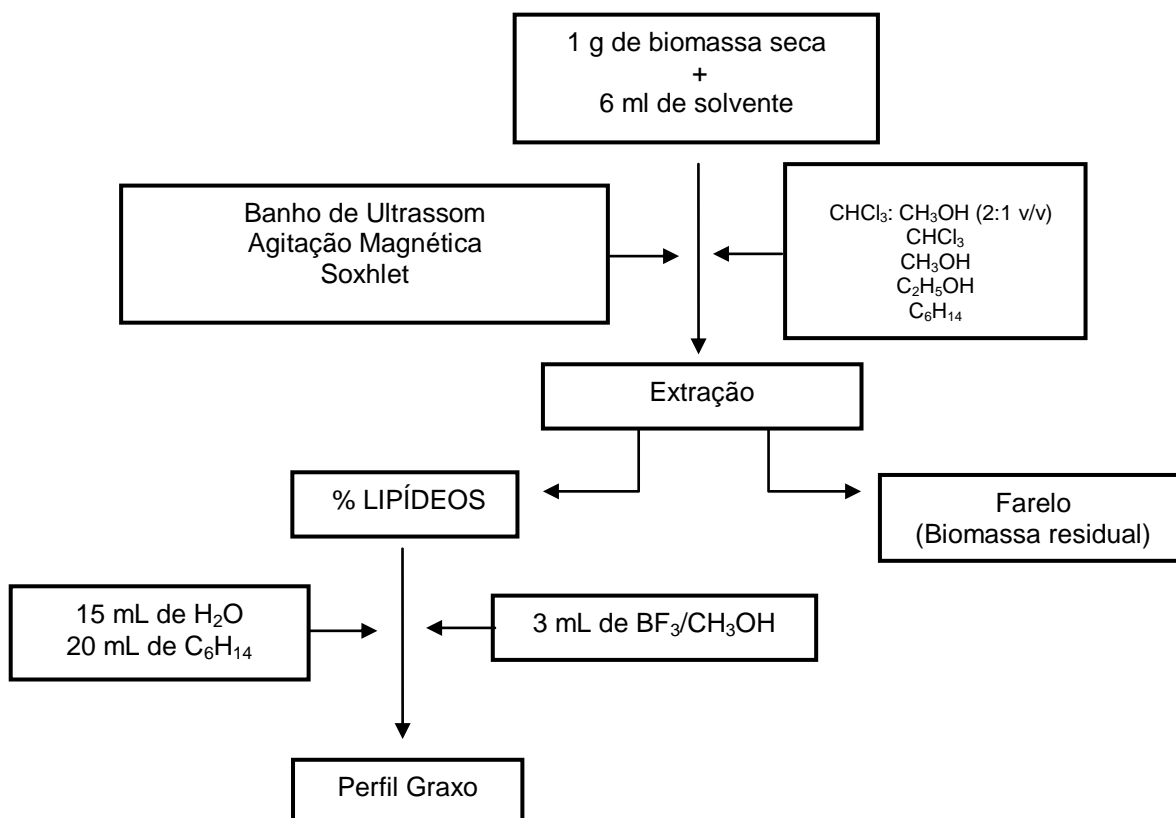
<b>Método</b>	<b>Solventes</b>	<b>Tempo (min.)</b>
AM <sub>1</sub>	CHCl <sub>3</sub> : CH <sub>3</sub> OH (2:1 v/v)	3 x 20
AM <sub>2</sub>		20
AM <sub>3</sub>		120
AM <sub>4</sub>		1440
US <sub>1</sub>	CHCl <sub>3</sub>	3 x 20
US <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> OH	
US <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	20
S	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	120
		240

AM= Agitação magnética, US= Banho de ultrassom, S= Soxhlet

Inicialmente as extrações foram realizadas utilizando agitação magnética, métodos AM<sub>1</sub>-AM<sub>4</sub>. O banho ultrassom, métodos US<sub>1</sub>-US<sub>3</sub>, foram utilizados para o rompimento da parede celular, visto que com o uso dessa técnica em muitos trabalhos encontrados na literatura foi observado um aumento significativo no teor dos lipídeos de microalgas. O soxhlet (método S) foi comparado com os outros sistemas, pois é o método que AOCS recomenda para extração de óleo.<sup>76</sup>

Nos métodos AM<sub>1</sub> e US<sub>1</sub> foi utilizado o protocolo de Zhu e colaboradores<sup>44</sup>, A amostra foi extraída durante 20 minutos na presença de 6 mL de solvente, posteriormente, a amostra foi centrifugada e o solvente da fase orgânica, contendo os lipídeos, foi decantado e depois evaporado sob pressão reduzida. Após, foi adicionado à mesma biomassa mais 6 mL de solvente e o procedimento foi e repetido por mais 1 vez. O método AM<sub>4</sub> foi baseado em Eganathan e colaboradores<sup>77</sup> e utilizou o tempo de 1440 minutos para extração de lipídeos. A partir das variáveis propostas para a extração dos lipídeos da microalga *Chlorella*

*pyrenoidosa* foram verificados se o teor de lipídeos e o perfil graxo sofreriam modificações de acordo com os diferentes métodos. No esquema 2 são demonstrados os processos utilizados para extração dos lipídeos e identificação dos ácidos graxos.



**Esquema 2** - Seqüência de procedimentos utilizados para extração dos lipídeos.

## 5.2 Determinação do teor de lipídeos

A Tabela 14 mostra o teor de lipídeos obtidos utilizando os métodos de extração, AM, US e S, na presença de diferentes solventes tempos de extração.

Os maiores rendimentos de lipídeos foram observados com o uso de clorofórmio:metanol (2:1 v/v), tanto utilizando banho de ultrassom como agitação magnética. Estes resultados podem ser explicados pelo uso de uma mistura de solventes que já foi muito utilizada na literatura para determinação de lipídeos totais

de diferentes microalgas. Esta mistura de solventes é adequada tanto extração de lipídeos neutros quanto para extração de lipídeos polares (Tabela 14).

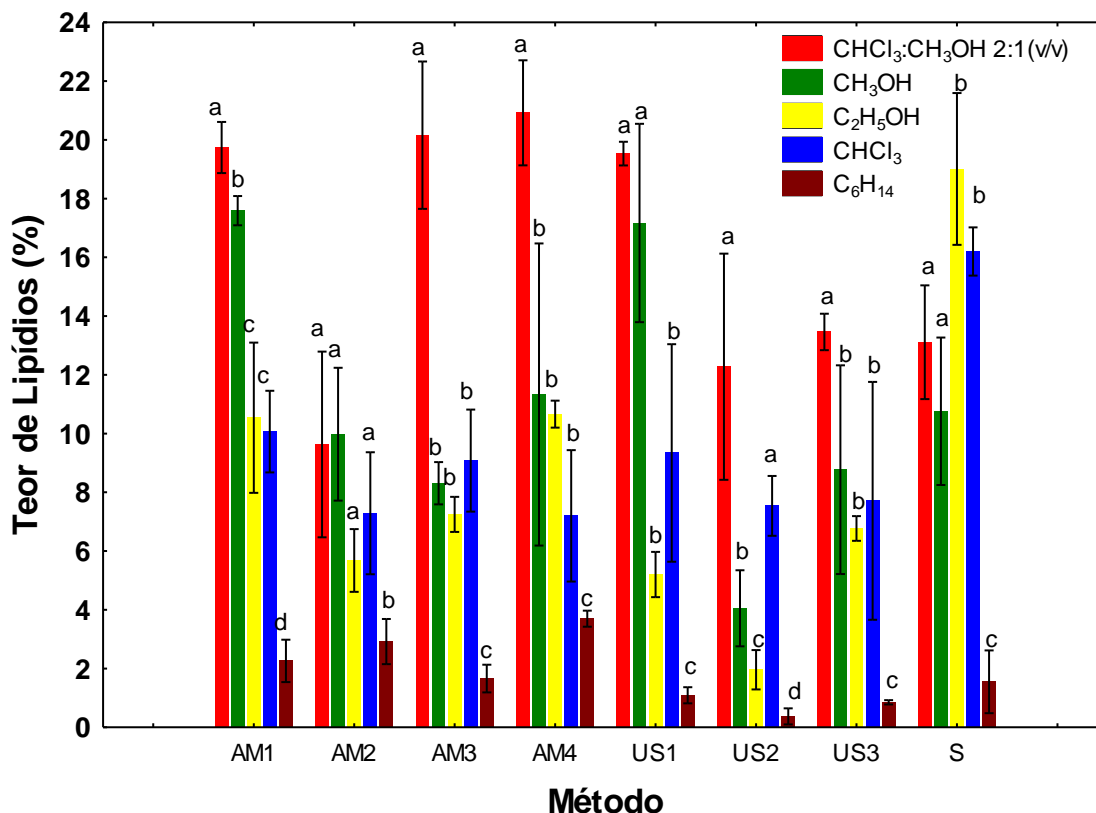
**Tabela 14** – Teor lipídico da *Chlorella pyrenoidosa* utilizando os diferentes métodos e solventes

Método	CHCl <sub>3</sub> :CH <sub>3</sub> OH	CH <sub>3</sub> OH	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	CHCl <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>
	2:1 (v/v)				
lipídeos extraídos, %					
AM <sub>1</sub>	19,74 (±0,35)	17,59 (±0,2)	10,54 (±1,03)	10,06 (±0,57)	2,26 (±0,29)
AM <sub>2</sub>	9,53 (±1,42)	9,98 (±0,91)	5,68 (±0,43)	7,33 (±0,76)	2,92 (±0,31)
AM <sub>3</sub>	20,16 (±1,01)	8,31 (±0,29)	7,25 (±0,24)	9,08 (±0,7)	1,66 (±0,19)
AM <sub>4</sub>	20,92 (±0,72)	11,33 (±2,07)	10,66 (±0,18)	7,20 (±0,9)	3,70 (±0,11)
US <sub>1</sub>	19,43 (±0,29)	17,17 (±1,36)	5,21 (±0,3)	9,34 (±1,49)	1,09 (±0,11)
US <sub>2</sub>	12,29 (±1,53)	4,02 (±0,57)	1,96 (±0,27)	7,54 (±0,41)	0,37 (±0,41)
US <sub>3</sub>	13,46 (±0,25)	8,77 (±1,43)	6,77 (±0,17)	7,71 (±1,63)	0,85 (±0,03)
<b>S</b>	13,11(±0,78)	10,76(±1,01)	19,01(±1,04)	16,2(±0,33)	1,55(±0,43)

De acordo com melhor resultado na presença de clorofórmio:metanol (2:1 v/v) com o uso do método AM<sub>4</sub> foram obtidos 20,92 %. Este resultado representou os lipídeos totais extraídos e foi comparado aos percentuais de eficiência de extração para cada método e solvente em relação a este método (Figura 5). A quantidade de lipídeos obtidos com os métodos AM<sub>1</sub>, AM<sub>2</sub>, AM<sub>4</sub> e US<sub>1</sub> na presença da mistura clorofórmio:metanol (2:1 v/v) também foi semelhante e ficou de acordo com os resultados encontrados na literatura para esta mesma microalga.<sup>35</sup>

Na presença de clorofórmio:metanol (2:1 v/v), não houve variação nos teores lipídicos das frações utilizando os métodos AM<sub>1</sub> e US<sub>1</sub>, obtendo-se um teor de 19,43 – 19,74% de lipídeos (Figura 5). Na extração com clorofórmio:metanol (2:1 v/v), utilizando o método AM<sub>2</sub> foram extraídos apenas 9,53 % dos lipídeos, metade dos lipídeos quando comparado ao método AM<sub>1</sub>. Estes resultados mostram que as duas extrações sucessivas, após a primeira extração, são fundamentais para o

desengorduramento total da biomassa de microalgas. Segundo a literatura, durante a extração, a velocidade do desengorduramento no começo é muito rápida decrescendo com o curso do processo. <sup>40</sup>



**Figura 5** – Tratamento estatístico para os resultados obtidos na extração dos lipídeos. Letras iguais para o mesmo método de extração não possuem diferença significativa mediante teste de Tukey ( $P>0,05$ ) e letras diferentes para o mesmo método possuem diferença significativa mediante teste de Tukey ( $P<0,05$ ).

A extração com o uso de metanol foi semelhante para os métodos AM<sub>1</sub> e US<sub>1</sub>, resultando em 17,17 e 17,59 % de lipídeos, respectivamente. Já a extração com metanol e método AM<sub>4</sub> rendeu aproximadamente 11% de lipídeos (Figura 5).

Quando foi utilizado método S o melhor rendimento foi observado na presença de etanol (16,2 %), este resultado pode ter sido ocasionado pelo aumento da temperatura na câmara de extração em função do ponto de ebulição do solvente utilizado, já que o etanol (78,4°C), seguido de clorofórmio (61,31°C) e metanol (64,36°C) é o que apresenta maior ponto de ebulição (Figura 5).

As frações extraídas com etanol nos métodos AM<sub>1</sub> e AM<sub>4</sub> foram comparáveis em seus rendimentos de lipídeos (Figura 5). A extração com etanol seria conveniente, pois este é derivado de uma fonte renovável, não tóxico, de baixo preço em relação aos outros solventes e de fácil aquisição. Entretanto, os rendimentos foram menores. Em geral os melhores rendimentos foram obtidos em todos os casos com uso do metanol quando comparado ao etanol. Com o aumento da polaridade do álcool, foi observado um aumento na quantidade de lipídeos extraídos. Este resultado comprova que a grande maioria da fração lipídica das microalgas é composta por lipídeos polares.

Os autores Grima e colaboradores<sup>19</sup> sugeriram que, dependendo do solvente utilizado, a qualidade da fração lipídica também pode sofrer modificações. Por exemplo, na presença de metanol são extraídos os fosfolipídeos e glicolipídeos; com etanol os sulfolipídeos; com clorofórmio, hidrocarbonetos, ceras, ácidos graxos e triacilgliceróis, com hexano a fração apolar da massa lipídica dentre eles, hidrocarbonetos, ácidos graxos e triacilgliceróis.

Com a variação do tempo e método de extração para o hexano, a quantidade de lipídeos obtida não ultrapassou 3,7%. Para extração com hexano, o método AM<sub>4</sub> foi o mais eficiente na extração do óleo de microalgas. A quantidade obtida pelo método S na presença de hexano foi semelhante ao teor obtido no método AM<sub>3</sub> (1,26 a 1,55%). Os menores resultados encontrados para as extrações foram às realizadas com hexano que comprovou que a quantidade de componentes lipídicos apolares como triacilgliceróis na amostra é baixa, evidenciando que lipídeos da *Chlorella pyrenoidosa* estão na forma de lipídeos polares, o que também pode observado em outras espécies de microalgas.<sup>41</sup>

De acordo com os resultados observados com os métodos AM<sub>3</sub> e AM<sub>4</sub> na presença de solventes polares, não houve variação significativa na quantidade de lipídeos obtidos. No entanto, com o uso do método AM<sub>3</sub> (tempo de 2 horas), teríamos uma economia de tempo e de energia em relação a extração com o método AM<sub>4</sub> (tempo de 24 horas).

Na maioria dos casos, também foi observado que o uso do banho de ultrassom (métodos US<sub>2</sub>-US<sub>3</sub>) mostrou-se menos efetivo que a agitação magnética (métodos AM<sub>1</sub> - AM<sub>4</sub>) para extração dos lipídeos dessa microalga.

### 5.3 Determinação do Perfil graxo

Com objetivo de identificar os principais ácidos graxos das frações extraídas com os diferentes métodos, as amostras de lipídeos totais foram esterificadas de acordo com Metcalfe & Schmidt<sup>78</sup> e posteriormente analisadas e identificadas através de cromatografia de fase gasosa.

Em geral, não houve diferença entre o perfil graxo obtido das frações extraídas com agitação magnética e ultrassom na presença dos diferentes solventes extratores (Figuras 6-8). A percentagem de cada ácido graxo também foi semelhante, não apresentando diferenças significativas (Tabela 15).

Os principais ácidos graxos identificados foram: C16:0, C18:2 e C18:3, além de menores percentagens de C14:0, C16:1, C16:2, C16:3, C18:0, C18:1. Sob o ponto de vista quantitativo e qualitativo não ocorreu variação no perfil graxo para a *Chlorella pyrenoidosa* quando comparado com a literatura. Segundo Petkov e Garcia<sup>61</sup> a microalga *Chlorella* sp. contém os mesmos ácidos graxos de outras espécies do gênero. Em todos os casos, nenhum ácido graxo incomum foi observado. Para as extrações realizadas com os métodos AM<sub>1</sub> e US<sub>1</sub> que foram obtidos os melhores rendimentos em teor lipídico, não ocorreu variação significativa na composição desses ácidos graxos (Figuras 10-15).

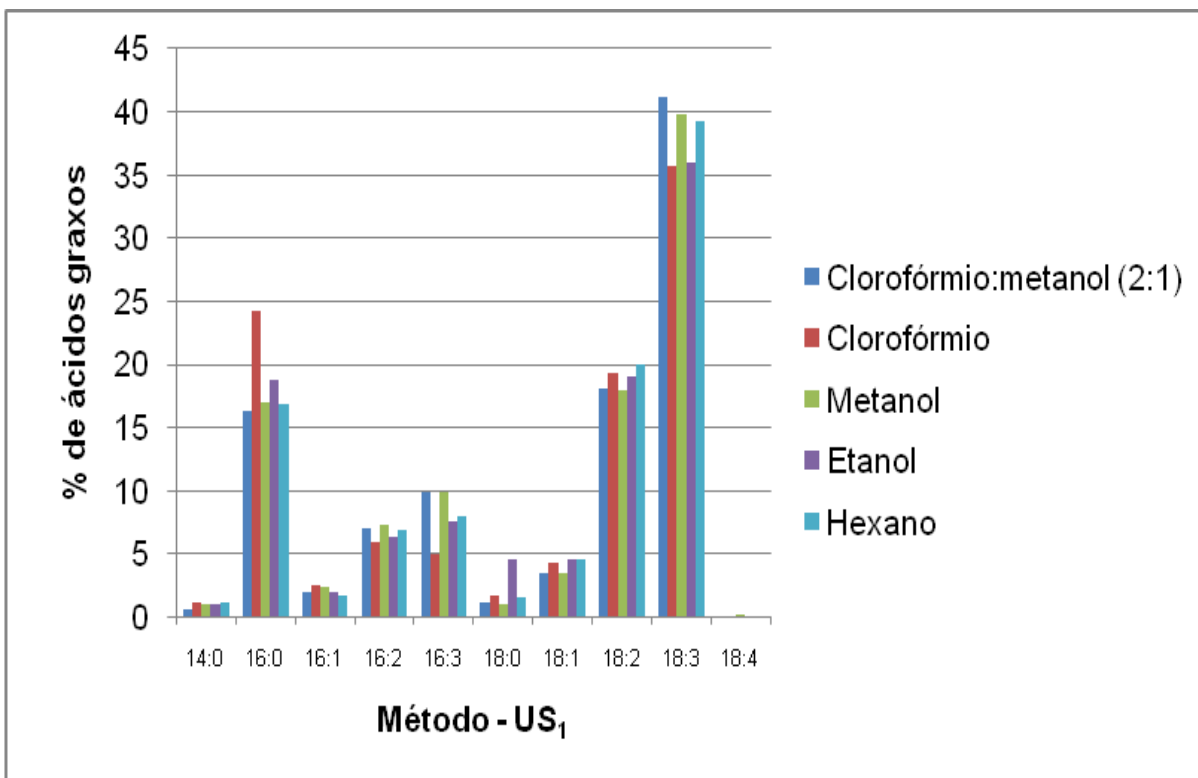


Figura 6 - Percentagem extraída de ácidos graxos no método de ultrassom US<sub>1</sub>

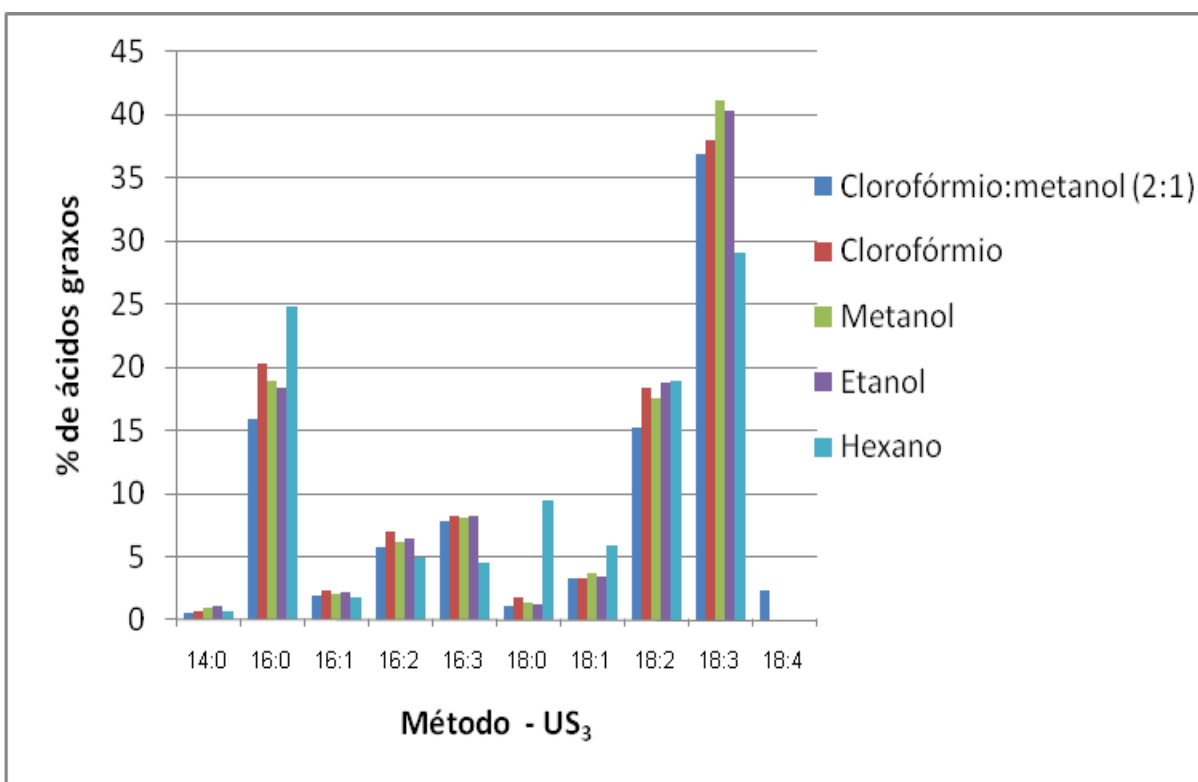


Figura 7 - Percentagem extraída de ácidos graxos no método US<sub>3</sub>

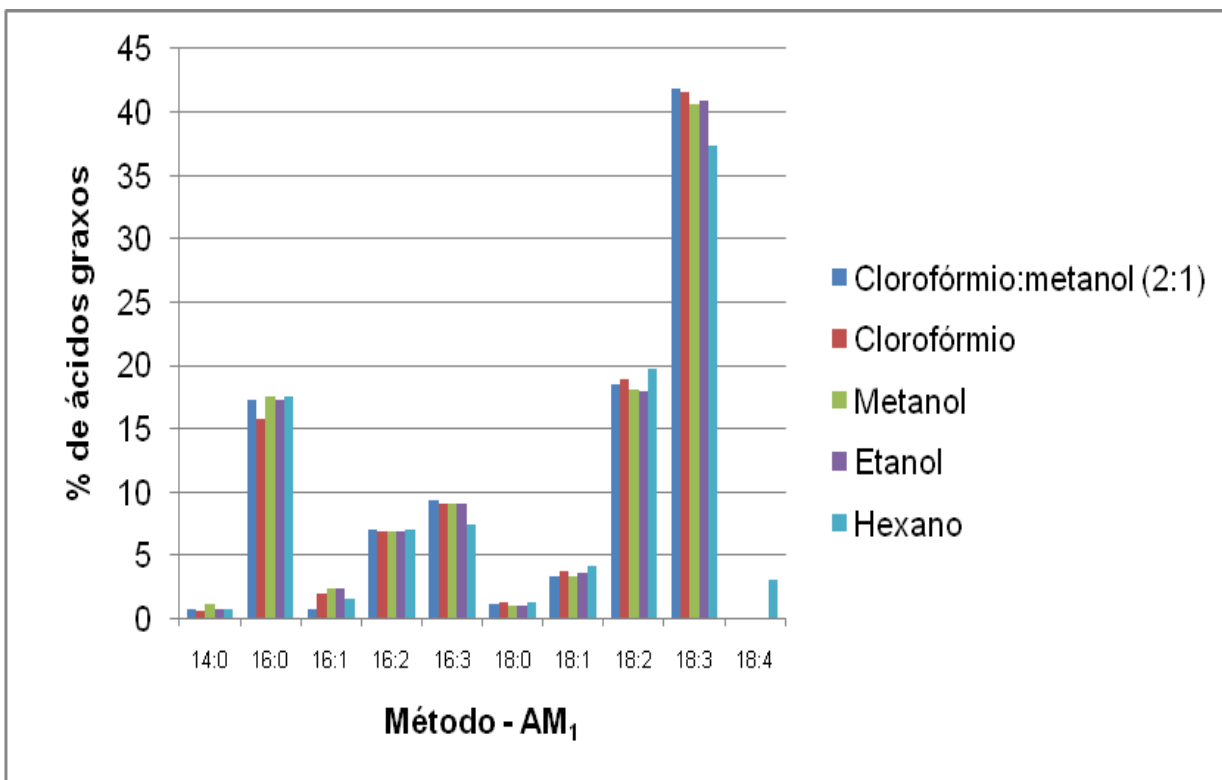


Figura 8 - Percentagem extraída de ácidos graxos no método AM<sub>1</sub>

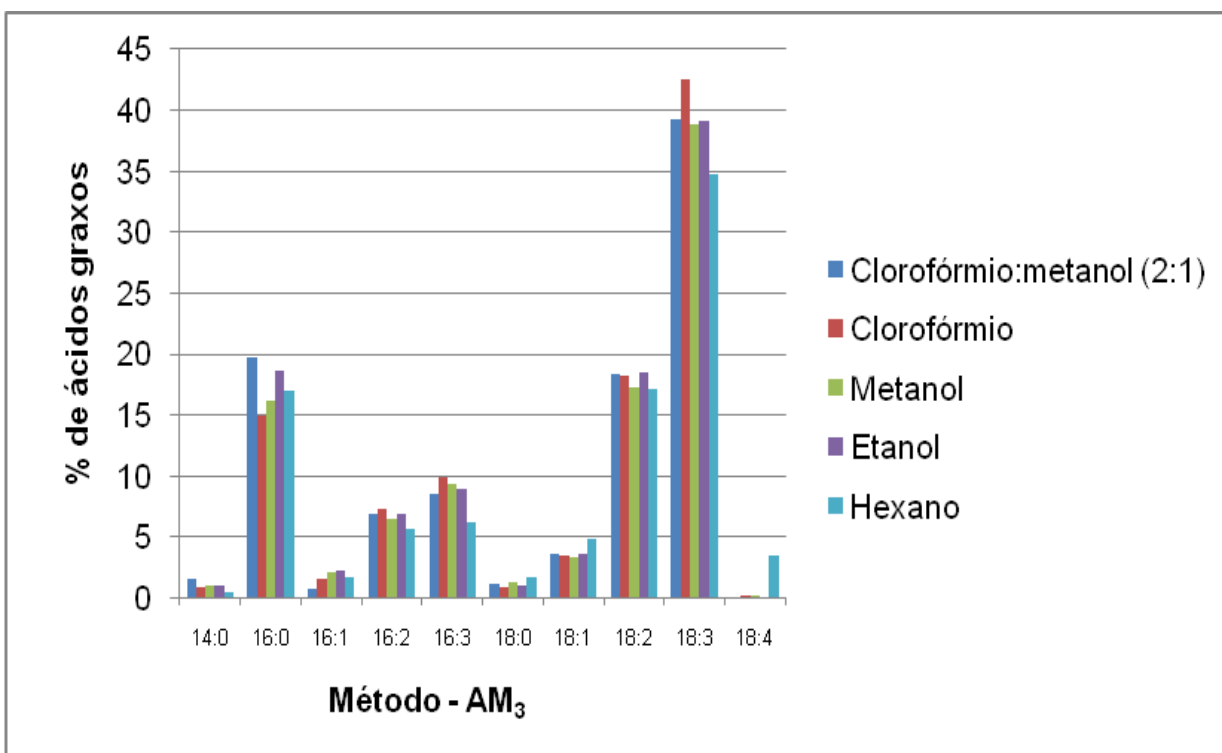
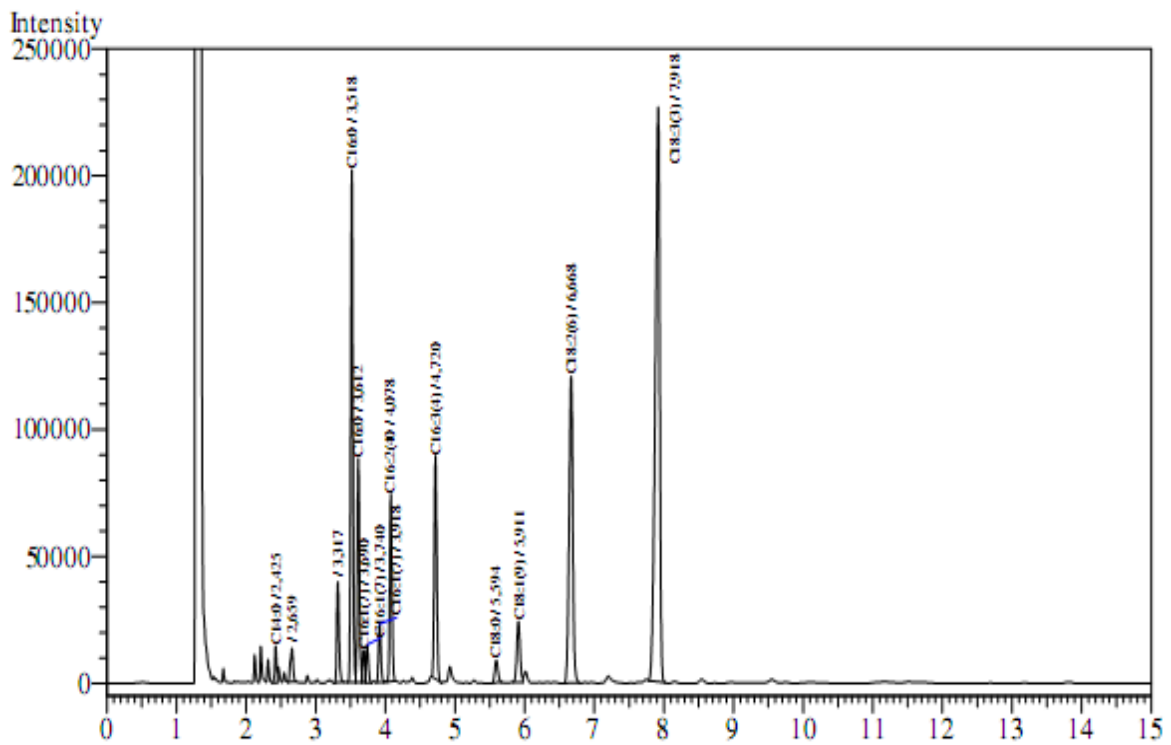
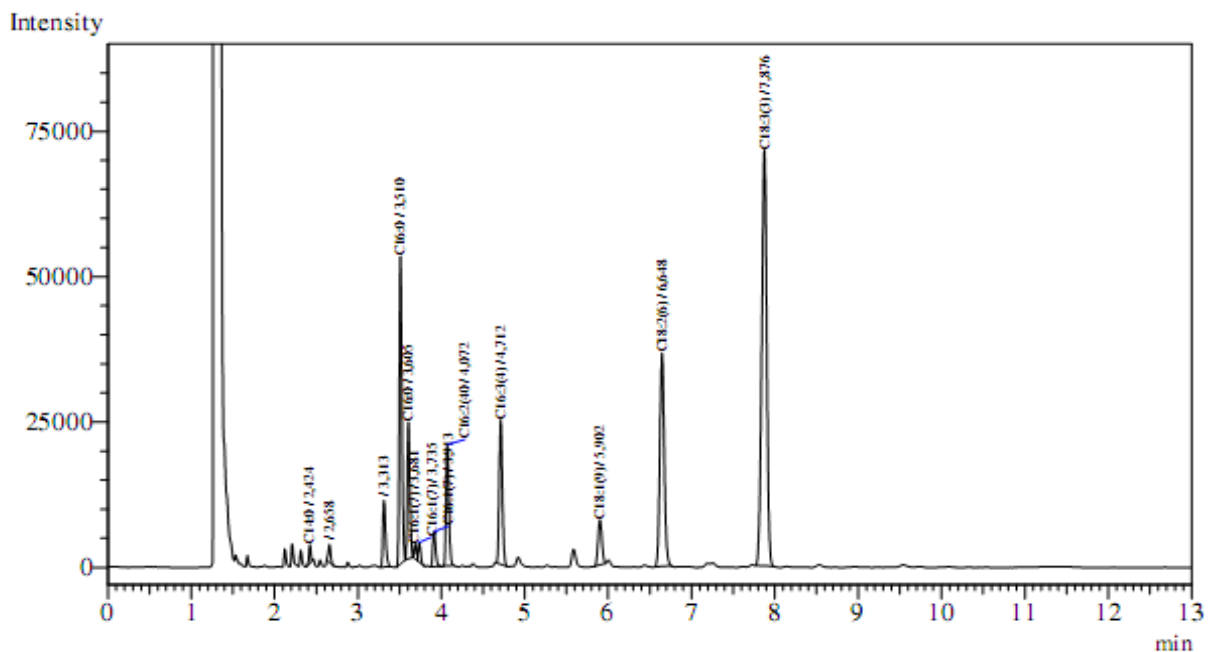


Figura 9 - Percentagem extraída de ácidos graxos no método AM<sub>3</sub>

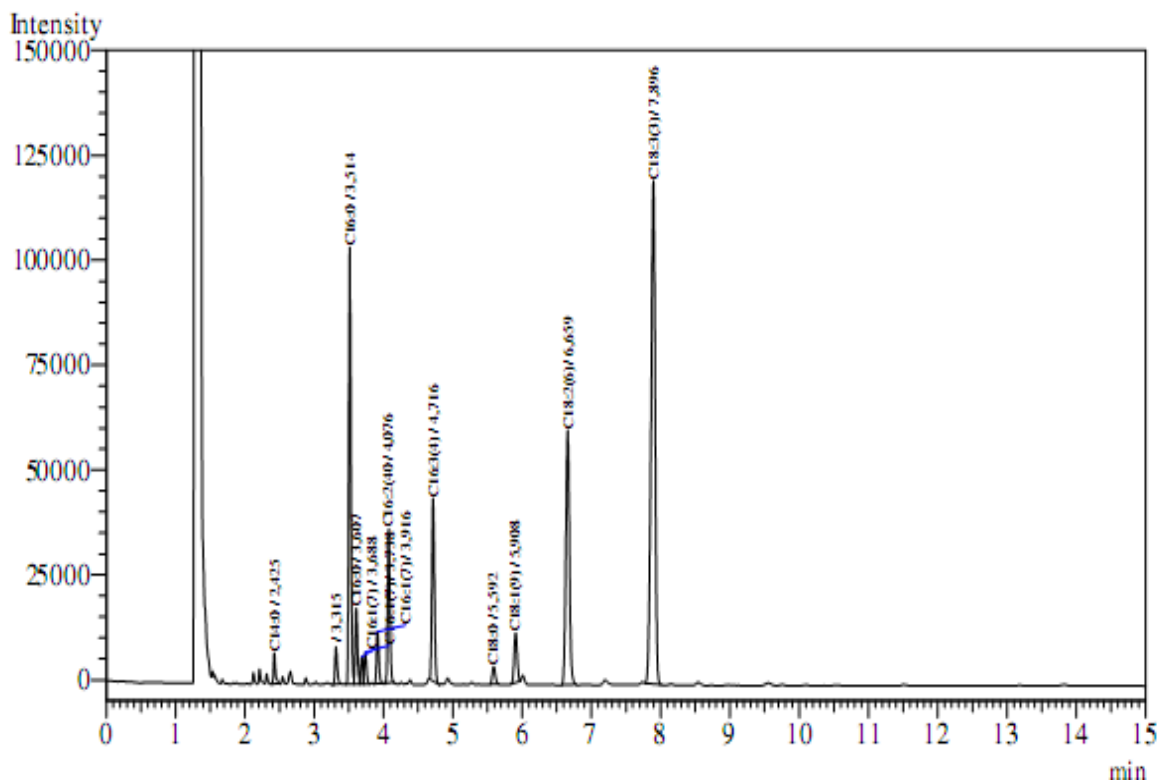




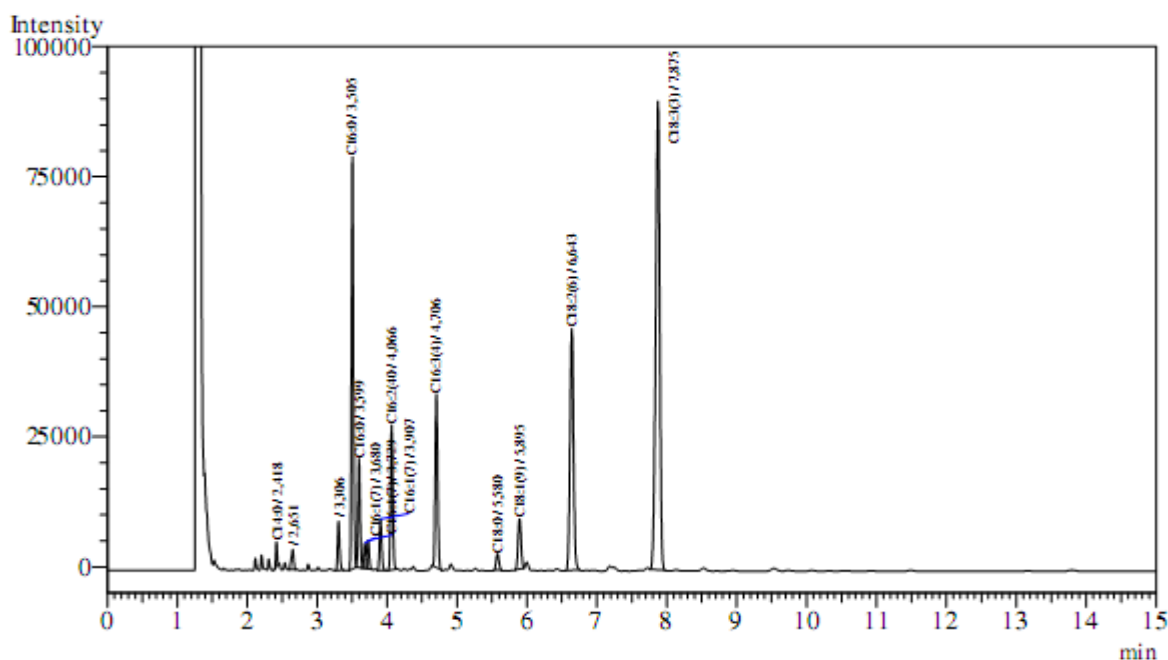
**Figura 10** – Cromatograma dos ésteres metílicos da *Chlorella pyrenoidosa* utilizando o método AM<sub>1</sub> na presença de clorofórmio: metanol (2:1 v/v). Identificação: C14:0 (2,4 min), C16:0 (3,5 min), C16:1 (3,7 min), C16:2 (4,0 min), C16:3 (4,7 min), C18:0 (5,5 min), C18:1 (5,9 min), C18:2 (6,6 min), C18:3 (7,9 min).



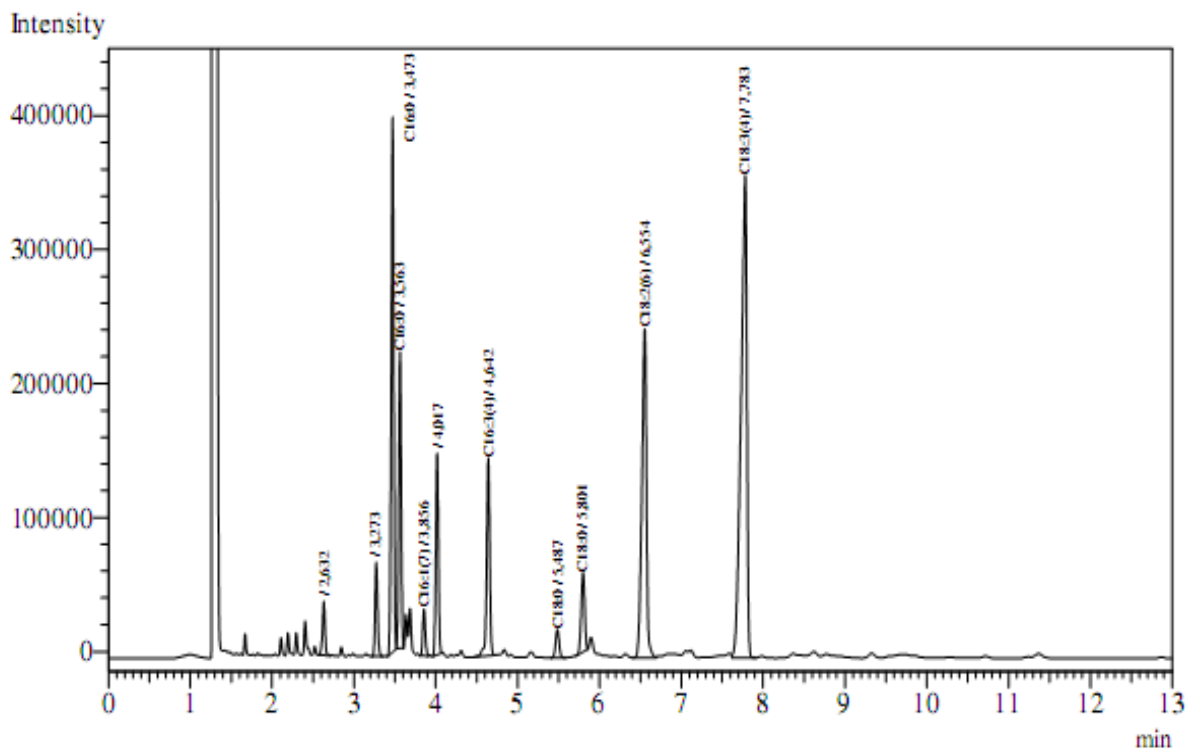
**Figura 11** – Cromatograma dos ésteres metílicos da *Chlorella pyrenoidosa* utilizando o método AM<sub>1</sub> na presença de clorofórmio. Identificação: C14:0 (2,4 min), C16:0 (3,5 min), C16:1 (3,7 min), C16:2 (3,9 min), C16:3 (4,7 min), C18:0 (5,4 min), C18:1 (5,9 min), C18:2 (6,6 min), C18:3 (7,8 min).



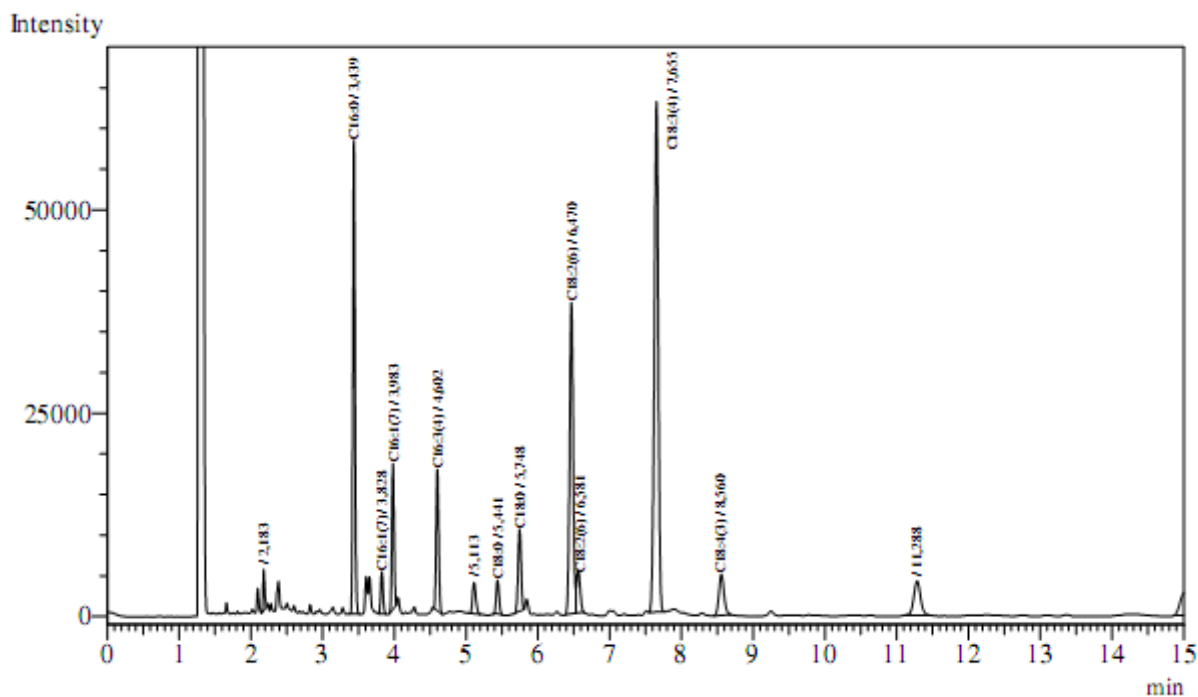
**Figura 12** – Cromatograma dos ésteres metílicos da *Chlorella pyrenoidosa* utilizando o método AM<sub>1</sub> na presença de metanol. Identificação: C14:0 (2,4 min), C16:0 (3,5 min), C16:1 (3,9 min), C16:2 (4,0 min), C16:3 (4,7 min), C18:0 (5,5 min), C18:1 (5,9 min), C18:2 (6,6 min), C18:3 (7,8 min).



**Figura 13** – Cromatograma dos ésteres metílicos da *Chlorella pyrenoidosa* utilizando o método AM<sub>1</sub> na presença de etanol. Identificação: C14:0 (2,4 min), C16:0 (3,5 min), C16:1 (3,9 min), C16:2 (4,0 min), C16:3 (4,7 min), C18:0 (5,5 min), C18:1 (5,8 min), C18:2 (6,6 min), C18:3 (7,8 min).



**Figura 14** – Cromatograma dos ésteres metílicos da *Chlorella pyrenoidosa* utilizando o método AM<sub>1</sub> na presença de hexano. Identificação: C14:0 (2,4 min), C16:0 (3,4 min), C16:1 (3,8 min), C16:2 (4,9 min), C16:3 (4,6 min), C18:0 (5,5 min), C18:1 (5,8 min), C18:2 (6,6 min), C18:3 (7,7 min).



**Figura 15** – Cromatograma dos ésteres metílicos da *Chlorella pyrenoidosa* utilizando o método AM<sub>3</sub> na presença de hexano. Identificação: C14:0 (2,3 min), C16:0 (3,4 min), C16:1 (3,8 min), C16:2 (3,9 min), C16:3 (4,6 min), C18:0 (5,4 min), C18:1 (5,7 min), C18:2 (6,4 min), C18:3 (7,6 min), C18:4 (8,5 min) e não identificados (11,1 min)

Nas entradas 1, 7, 10, 11, 19 e 20 (Tabela 15), foi detectada a presença do ácido estearidônico (C18:4), comum em cultura mista de algas verdes.<sup>61</sup>

O ácido graxo presente em maior quantidade foi o C18:3 (ácido linolênico), que variou entre 29,04 a 42,47%. Ácidos graxos poliinsaturados da família do  $\omega$ -3 são muito abundantes em microalgas<sup>79</sup>, como por exemplo, *Porphyridium cruentum*<sup>80</sup> *Phaeodactylum tricornutum*<sup>81</sup> e *Monodus subterraneus*<sup>82</sup>.

A presença do ácido linolêico C18:2 foi detectada entre 15,2 e 20,04 % nas amostras analisadas. Petkov e Garcia<sup>61</sup> realizaram um estudo sobre a variação do perfil graxo na microalga *Chlorella pyrenoidosa* sob diferentes condições de cultivo, identificaram a presença de 18:2 entre 18 e 27 %.

Neste trabalho, também foram identificados os ácidos C16:2 e C16:3 nas mesmas proporções encontradas por Petkov e Garcia.<sup>61</sup> Essa quantidade de ácidos graxos poliinsaturados para *C. pyrenoidosa* também foi observada por outros autores<sup>61,83,84</sup>.

A alta quantidade encontrada de ácidos graxos poliinsaturados deve-se ao fato de que o perfil graxo das microalgas assemelha-se aos encontrados em organismos marinhos. Este percentual elevado de insaturações pode conferir ao óleo uma maior instabilidade frente ao oxigênio.<sup>85</sup>

O ácido mirístico C14:0 apresentou menor quantidade em todas as amostras variando entre 0,45 – 1,55 %. Segundo a literatura, a percentagem de C14:0 em microalgas de água doce não ultrapassa 1 %.<sup>61</sup>

A extração utilizando o método US<sub>3</sub> na presença de hexano como solvente apresentou maior percentagem de C16:0 e C18:0 e menor percentagem de C18:3 em relação aos demais métodos de extração. A quantidade de C18:0 foi de 9,45%, enquanto que, nas outras frações, este valor não ultrapassou 4,58%.

Na presença de hexano e clorofórmio:metanol (2:1 v/v), utilizando os métodos AM<sub>3</sub> (Figura 15) e US<sub>3</sub>, respectivamente, foram detectados compostos não identificados com os padrões disponíveis – o que, segundo o encontrado na literatura, pode ser atribuído até mesmo a presença de hidrocarbonetos com alto peso molecular, como os encontrados nas microalgas *Botryococcus Braunii* e *Dunaliella tertiolecta*.<sup>86</sup>

**Tabela 15** – Perfil graxo dos lipídeos da *Chlorella pyrenoidosa* obtido a partir de difentes métodos de extração e solventes

Entrada	Método	Solvente extrator	Ácidos graxos (%)									
			C14:0	C16:0	C16:1	C16:2	C16:3	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C18:4
1	AM <sub>1</sub>	CHCl <sub>3</sub> : CH <sub>3</sub> OH (2:1)	0,74	17,31	0,79	7,04	9,32	1,17	3,32	18,56	41,81	ND*
2	US <sub>1</sub>	CHCl <sub>3</sub> : CH <sub>3</sub> OH (2:1)	0,63	16,38	2,01	7,09	9,96	1,16	3,48	18,08	41,21	ND
3	AM <sub>3</sub>	CHCl <sub>3</sub> : CH <sub>3</sub> OH (2:1)	1,55	19,69	0,79	6,91	8,53	1,23	3,64	18,34	39,31	ND
4	US <sub>3</sub>	CHCl <sub>3</sub> : CH <sub>3</sub> OH (2:1)	0,49	15,93	1,91	5,79	7,86	1,08	3,23	15,2	36,96	2,41
5	AM <sub>1</sub>	CHCl <sub>3</sub>	0,68	15,78	1,99	6,89	9,12	1,34	3,76	18,85	41,64	ND
6	US <sub>1</sub>	CHCl <sub>3</sub>	1,13	24,28	2,63	5,90	5,01	1,73	4,36	19,26	35,74	ND
7	AM <sub>3</sub>	CHCl <sub>3</sub>	0,92	14,96	1,64	7,25	9,97	0,91	3,43	18,23	42,47	0,25
8	US <sub>3</sub>	CHCl <sub>3</sub>	0,67	20,26	2,31	6,99	8,29	1,83	3,36	18,34	37,97	ND
9	AM <sub>1</sub>	CH <sub>3</sub> OH	1,16	17,53	2,34	6,88	9,14	1,03	3,33	18,03	40,56	ND
10	US <sub>1</sub>	CH <sub>3</sub> OH	1,01	16,96	2,33	7,25	9,93	1,02	3,46	18,02	39,76	0,26
11	AM <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> OH	1,06	16,18	2,12	6,52	9,42	1,32	3,41	17,22	38,86	0,23
12	US <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> OH	0,98	18,93	2,09	6,19	8,05	1,38	3,66	17,53	41,18	ND
13	AM <sub>1</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	0,75	17,32	2,39	6,91	9,12	0,99	3,61	18,02	40,91	ND
14	US <sub>1</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	1,09	18,74	2,02	6,31	7,54	4,58	4,63	19,11	36,01	ND
15	AM <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	0,98	18,66	2,27	6,87	9,01	1,04	3,62	18,46	39,10	ND
16	US <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	1,03	18,4	2,17	6,41	8,23	1,23	3,43	18,83	40,30	ND
17	AM <sub>1</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	0,71	17,6	1,62	6,97	7,42	1,34	4,21	19,77	37,33	3,04
18	US <sub>1</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	1,17	16,8	1,73	6,92	8,01	1,52	4,54	20,04	39,27	ND
19	AM <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	0,45	16,94	1,69	5,64	6,18	1,68	4,85	17,08	34,74	3,52
20	US <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	0,65	24,89	1,85	4,91	4,47	9,45	5,86	18,88	29,04	ND

\*ND = não detectado

#### 4.4. Cálculo dos índices oleoquímicos com base no perfil graxo obtido para *Chlorella pyrenoidosa*

Visando a produção do biodiesel é necessária a utilização de matérias primas que satisfaçam requerimentos como viabilidade, estabilidade e bom desempenho do combustível obtido. Neste sentido existem alguns índices oleoquímicos que merecem destaque como, por exemplo, o índice de iodo (*II*) e índice de saponificação (*IS*), que são determinados por titulação da amostra.

Como definição, o índice de iodo é o número de gramas de iodo absorvido por 100g de gordura ou óleo; fornece medida do grau de insaturação das gorduras extraídas com éter ou, ainda, medida do grau de insaturação dos ácidos graxos presentes na gordura. A adição de iodo pode ser quantitativamente introduzida nas duplas ligações dos ácidos graxos insaturados e triacilgliceróis, razão por que, quanto maior a insaturação de um ácido graxo, maior será a sua capacidade de absorção de iodo e, conseqüentemente, maior também será o índice.<sup>40</sup>

O índice de saponificação é definido como o número de (mg) de hidróxido de potássio (KOH) necessários para neutralizar os ácidos graxos, resultantes da hidrólise de um grama da amostra;<sup>40</sup> é inversamente proporcional ao peso molecular médio dos ácidos graxos dos triacilgliceróis presentes na amostra. Quanto menor o peso molecular do ácido graxo, tanto maior será o índice de saponificação, grosseiramente; para as gorduras vegetais, quanto mais altos os índices de saponificação melhor servem para fins alimentares. Estes índices são importantes para a classificação de óleos e gorduras e para o controle de alguns processos. Cada óleo tem um intervalo característico do valor dos índices de iodo e saponificação (Tabela 16).<sup>87</sup>

. Para as frações lipídicas extraídas da microalga *C. pyrenoidosa*, não foram realizados experimentos para determinação do *II* e *IS* pois o óleo apresentou coloração verde escuro, não podendo sofrer titulação para obtenção destes índices. Com base no perfil graxo das frações extraídas com os solventes: mistura clorofórmio:metanol (2:1 v/v), clorofórmio, metanol, etanol e hexano utilizando o método US<sub>1</sub> foram realizados os cálculos de caracterização oleoquímica desses lipídeos.<sup>88</sup>

**Tabela 16** – Caracterização oleoquímica de alguns óleos e gorduras<sup>87</sup>

<b>Óleo ou Gordura</b>	<b>IA</b> (mg/g)	<b>IS</b> (mg/g)	<b>II</b> (cg/g)	<b>MM<sub>(TG)</sub></b> (g/mol)
<i>Chlorella prototecoides</i> <sup>22</sup>	8,97	189,3	154*	933
Algodão	-	189-198	90 – 119	870
Mamona	-	176-187	82 – 88	927
Milho	-	190	103 – 140	886
Oliva	-	191,4	80-106	879
Soja	-	189-198	117 – 143	870
Sebo	-	190-200	35 - 48	863
Frango	-	196,9	68	855

\* Valor obtido para *Chlorella* sp.

Os ácidos graxos não apresentaram uma grande variação em seu perfil, conseqüentemente não ocorreu uma grande variação nos índice oleoquímicos (Tabela 17). Os índices de saponificação e iodo encontrados para os lipídeos da *Chlorella pyrenoidosa* pode ser comparado aos encontrados na literatura para os índices oleoquímicos presentes nos óleos de microalgas (para microalga do gênero *Chlorella* IS= 189,3 mg/g e II=154 cg/g). Os índices de iodo (177,16 - 151,54 cg/g) foram maiores do que os presentes nas oleaginosas convencionais devido à grande quantidade de duplas ligações presentes nos lipídeos das microalgas. As massas molares e o número médio de carbonos praticamente não variaram, pois os mesmos ácidos graxos foram identificados em todas as amostras apenas, com uma pequena variação em suas quantidades.

Com base nos resultados da tabela 17 o maior índice de iodo foi obtido para a amostra extraída com clorofórmio:metanol (2:1 v/v), sendo estes valores confirmados por cromatografia, que apresentou aproximadamente 82% de ácidos graxos poliinsaturados. O menor índice de iodo foi o obtido na fração extraída com clorofórmio, que apresentou, de acordo com seu perfil graxo, 72 % de ácidos graxos poliinsaturados.

A fração extraída com clorofórmio:metanol (2:1 v/v) apresentou o menor índice de saponificação e maior massa molar que, segundo os parâmetros os oleoquímicos, o índice de saponificação deve ser inversamente proporcional a massa molar,

**Tabela 17** – Índices oleoquímicos calculados para os lipídeos da *Chlorella pyrenoidosa* extraídos com o método US<sub>1</sub>

Índices oleoquímicos	Unidade	CHCl <sub>3</sub> :CH <sub>3</sub> OH (2:1 v/v)	CHCl <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> OH	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>
Índice de Saponificação (IS)	mg/g	195,65	197,64	196,17	196,47	196,42
Índice de iodo (II)	cg/g	177,16	151,54	175,42	155,28	167,73
Número de carbonos (n)	-	17,55	17,30	17,49	17,43	17,45
Número de duplas ligações (I)	-	2,00	1,69	1,98	1,75	1,89
Massa molar do ácido graxo (MM <sub>AG</sub> )	g/mol	274,08	271,19	273,33	272,88	272,95
Massa molar do triglicerídeo (MM <sub>TG</sub> )	g/mol	822,24	813,57	819,99	818,64	818,65

### 5.5 Produção de FAEEs a partir de *Chlorella pyrenoidosa*

De acordo com a literatura, a transesterificação catalisada por bases é muito mais rápida que a catalisada por ácidos. Porém, apesar do processo catalisado por bases ser mais rápido, a presença de ácidos graxos livres no meio reacional pode diminuir o rendimento de formação do biodiesel.<sup>64</sup>

Segundo os estudos de Wu e Miao<sup>22</sup> a catálise básica não é indicada para a reação com óleo de microalgas devido ao alto índice de acidez presente.

Em nosso trabalho não foi possível determinar experimentalmente o índice de acidez devido à coloração verde escura do óleo da microalga, e por este motivo a catálise básica não foi utilizada.

O ácido sulfúrico foi o catalisador utilizado na síntese dos FAEEs a partir da *Chlorella pyrenoidosa*, afim de que ocorresse a esterificação dos ácidos graxos e a transesterificação dos triacilgliceróis ao mesmo tempo, convertendo-os a ésteres.

Partindo de aproximadamente 100g de biomassa seca e 300 mL de solvente, foram realizadas as extrações dos lipídeos utilizando o método AM<sub>3</sub> na presença dos solventes extratores, clorofórmio:metanol (2:1 v/v), metanol e etanol (Tabela 18). A quantidade de lipídeos variou entre 7,01 - 22,13g.



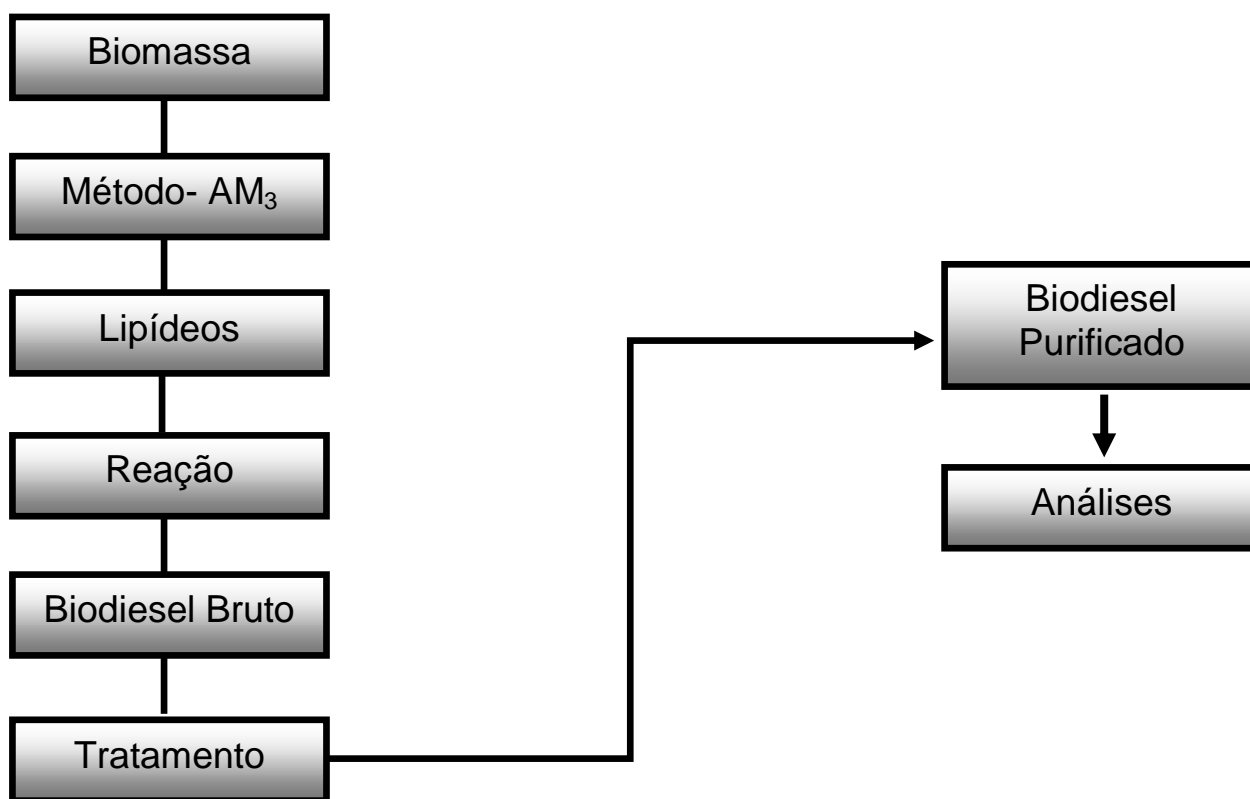
**Tabela 18** – Rendimentos de extração dos lipídeos da *Chlorella pyrenoidosa*

<b>Entrada</b>	<b>Biomassa (g)</b>	<b>Solvente Extrator</b>	<b>Lipídeos Extraídos (g)</b>
1	108,00	CHCl <sub>3</sub> : CH <sub>3</sub> OH (2:1 v/v)	20,92
2	108,69	CHCl <sub>3</sub> : CH <sub>3</sub> OH (2:1 v/v)	22,13
3	100,92	CHCl <sub>3</sub> : CH <sub>3</sub> OH (2:1 v/v)	19,92
4	100,35	CHCl <sub>3</sub> : CH <sub>3</sub> OH (2:1 v/v)	20,51
5	100,20	CHCl <sub>3</sub> : CH <sub>3</sub> OH (2:1 v/v)	19,90
6	100,72	CH <sub>3</sub> OH	15,71
7	100,25	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	7,01

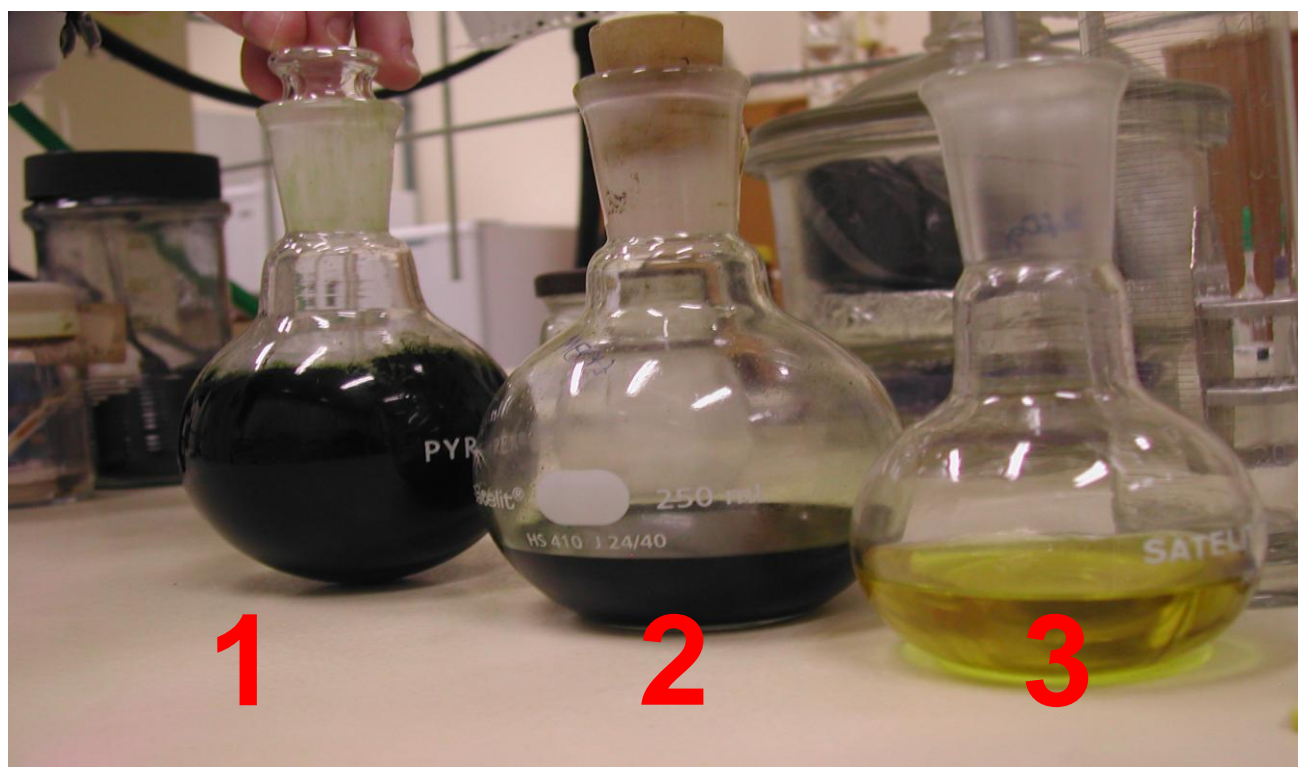
A partir dos lipídeos extraídos foram realizadas as reações para produção dos ésteres graxos, na presença de metanol ou etanol. As reações foram realizadas utilizando um excesso de álcool e a partir do ácido graxo presente em maior quantidade C18:3 (ácido linolênico, MM= 278,64 g/mol), de acordo com o seguinte protocolo: relação molar álcool:ácido graxo de 30:1, 60°C, 3 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> p/p e 4 horas sob agitação magnética (Tabela 19). No esquema 3, podemos observar a seqüência de procedimentos utilizados para obtenção de ésteres graxos, Figura 16, produtos produzidos neste trabalho.

Após a reação, foi observado que, para as mesmas condições utilizando os lipídeos extraídos com CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH (2:1 v/v) a taxa de conversão dos lipídeos em FAMEs, (Tabela 19) foi em média de 31,7%. Apesar das quantidades de lipídeos extraídas com os solventes metanol e etanol terem sido menores, a taxa de conversão a partir dos extratos lipídicos dessas frações foi maior do que as obtidas nas demais reações.

No experimento realizado na presença de com etanol a taxa de conversão em FAEs (Tabela 19, entradas 6-7) foi à maior obtida nos experimentos, 98%.



**Esquema 3-** Fluxograma do processo utilizado para obtenção dos ésteres graxos a partir de microalgas



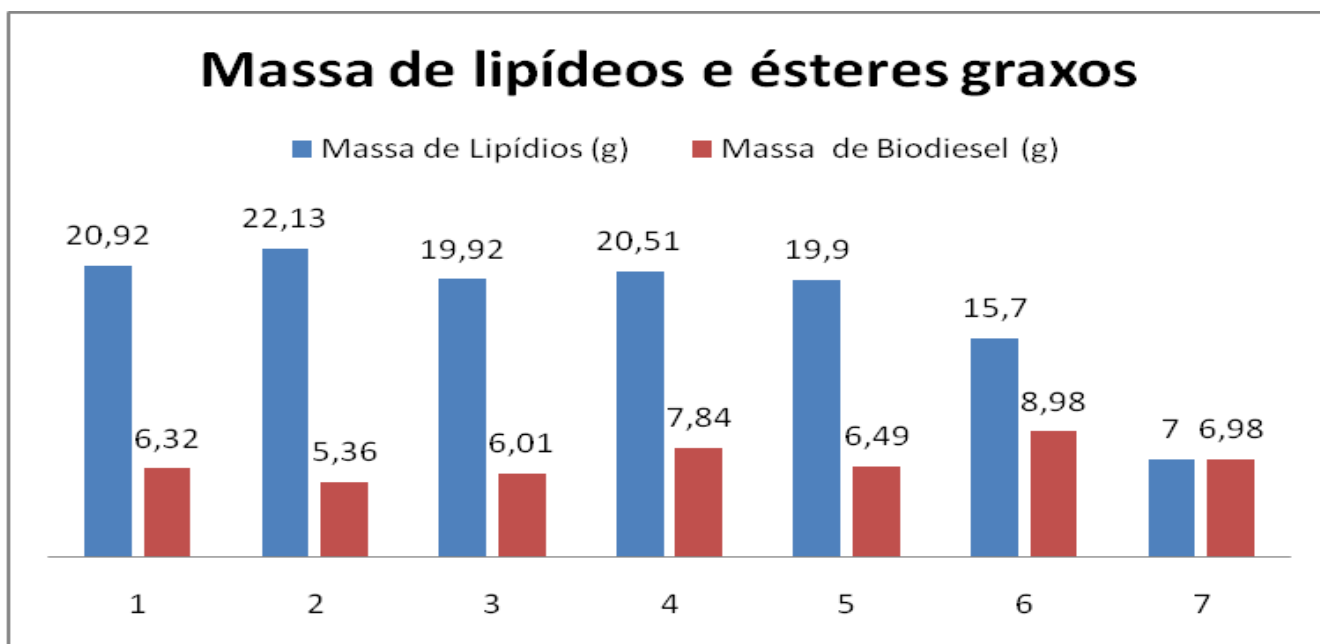
**Figura 16 –** Produtos obtidos: Lipídeos (1), Biodiesel Bruto (2) e Biodiesel purificado (3)

**Tabela 19** – Rendimentos de biodiesel metílico e etílico de microalgas obtido a partir da extração da fração lipídica com método AM<sub>3</sub>.

Entrada	Massa de Lipídeos	Álcool usado na reação	Rendimento de
	Extraídos (g)		FAAEs (%)
1	20,92	CH <sub>3</sub> OH	30,40
2	22,13	CH <sub>3</sub> OH	24,22
3	19,92	CH <sub>3</sub> OH	30,17
4	20,51	CH <sub>3</sub> OH	38,22
5	19,90	CH <sub>3</sub> OH	32,61
6	15,70	CH <sub>3</sub> OH	57,19
7	7,00	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	98,42

A partir dos rendimentos obtidos na tabela 19 foi realizado também um comparativo (Figura 17) em massa da quantidade de ésteres graxos obtidos das frações extraídas com os diferentes solventes com base em 100g de biomassa seca. Após, observou-se que na extração com metanol (entrada 6 e figura 17) seguido da reação de transesterificação obteve-se a maior quantidade em massa de ésteres graxos, 8,98g após purificação. A quantidade de ésteres para os casos investigados variou entre 5,36-8,98%.

Este valor pode ser um valor considerado satisfatório quando comparado as oleaginosas convencionais, onde apenas a semente que contém entre 18-50 % de óleo, que é destinado ao biodiesel, representa uma pequena fração em relação à planta como um todo (folhas, galhos e semente).



**Figura 17** – Massa de lipídeos e quantidade em gramas de ésteres graxos obtidos.

## 5.6 Caracterização do biodiesel de microalgas

Os ésteres metílicos da fração extraída com clorofórmio:metanol (2:1 v/v) e o etílico a partir da fração lipídica extraída com etanol, foram analisados por espectrometria de infravermelho, ressonância magnética nuclear e também foi realizado o teste de estabilidade à oxidação usando o aparelho de Rancimat.

Os espectros de infravermelho obtidos permitiram identificar para o biodiesel etílico (Figura 18) bandas típicas de carbonila de éster C=O em  $1737\text{ cm}^{-1}$  e os estiramentos de C–O–C na faixa de  $1246 - 1180\text{ cm}^{-1}$ . Para o biodiesel metílico (Figura 19), a banda típica de carbonila de éster foi identificada na região de  $1741\text{ cm}^{-1}$  e as bandas de C–O–C, na faixa de  $1246-1170\text{ cm}^{-1}$ . Além disto, o estiramento de C–H (estiramento) foi observado nas regiões de  $2924\text{ cm}^{-1}$ ,  $1463$  e  $721$  em ambas as amostras. Todas as amostras analisadas de biodiesel etílico e metílico apresentaram a mesmas características espectroscópicas.

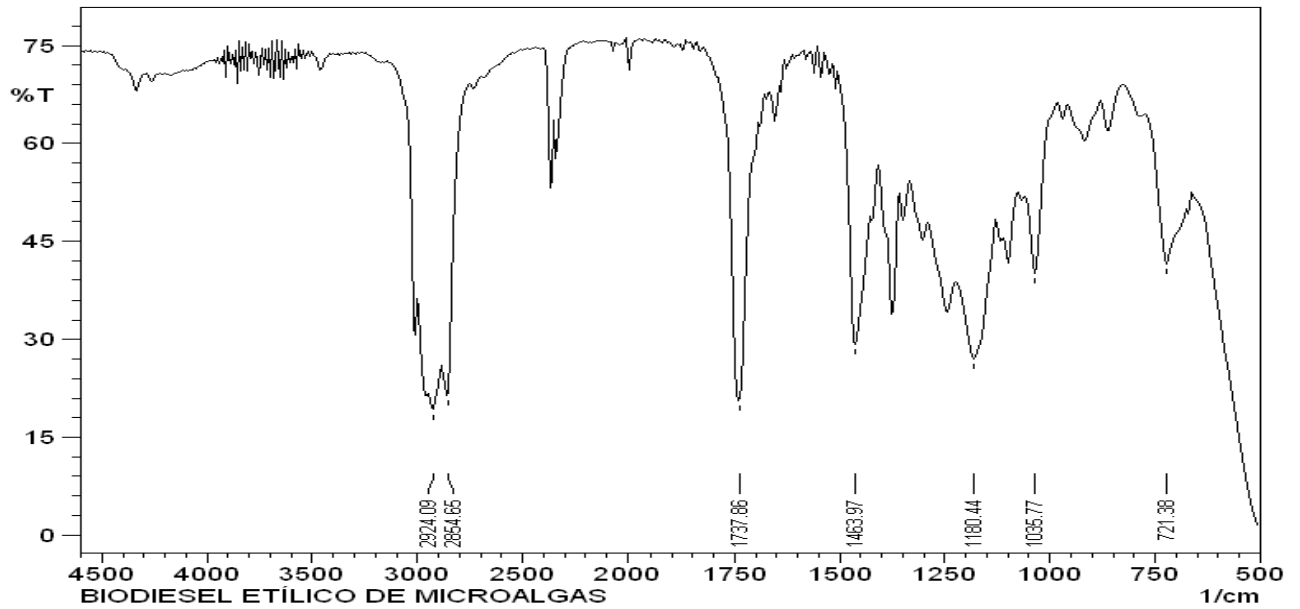


Figura 18 – Espectro de IV dos ésteres etílicos de microalgas.

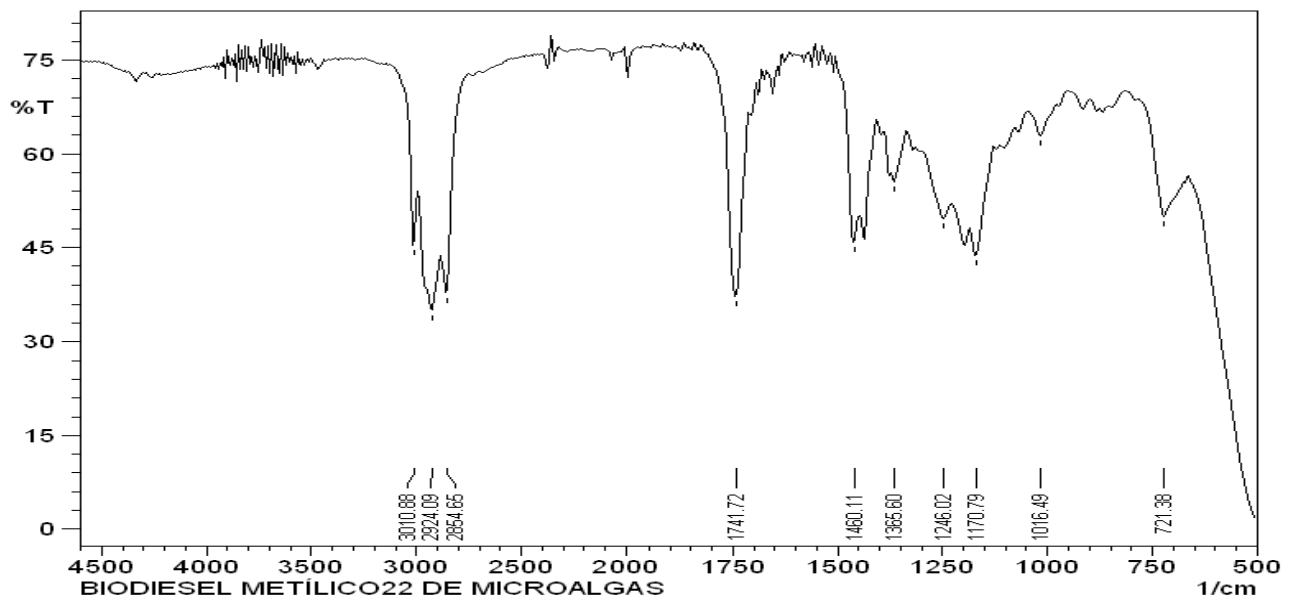


Figura 19 – Espectro de IV dos ésteres metílicos de microalgas.

A amostra de biodiesel metílico de *Chlorella pyrenoidosa* foi analisada por RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  pelo laboratório do CENPES/Petrobras. A presente amostra de biodiesel apresentou maior quantidade de compostos insaturados que amostras padrão de biodiesel de soja. Na presente amostra, há também indícios da existência de um padrão de ésteres insaturados.

Pelos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e de  $^1\text{H}$  (Figuras 20 e 21) da amostras analisadas, pode-se dizer que os componentes principais desta amostra foram ésteres metílicos.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , observa-se principalmente em 174 ppm um sinal referente à carbonila de éster em, 132 e 128 ppm referente aos carbonos vinílicos e em 52 ppm referente ao  $\text{CH}_3$  ligados ao O. O grande número de sinais de ressonância na região de 14 a 42 ppm (Figura 20), observados no espectro de  $^{13}\text{C}$  desta alga, podem indicar a presença de hidrocarbonetos alifáticos saturados adicionais normalmente não observados em amostras de biodiesel convencionais (oriundos de oleaginosas). No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 21), observou-se um multipeto em 5,4 ppm relativo aos hidrogênios vinílicos, um singlete em 3,7 ppm referente aos três hidrogênios  $\text{CH}_3$  ligados ao O, um triplete em 2,8 ppm referente aos hidrogênios bisalílicos, um triplete em 2,3 ppm referente aos hidrogênios do  $\text{CH}_2$   $\alpha$ -carbonila, um multipeto em 2,1 ppm referentes aos hidrogênios alílicos e um multipeto em 1,6 ppm referente aos hidrogênios  $\beta$ -carbonila. O hidrogênios metilênicos foram observados em um multipeto em 1,3 ppm e em 0,8 ppm um multipeto referente  $\text{CH}_3$  terminal da cadeia graxa.

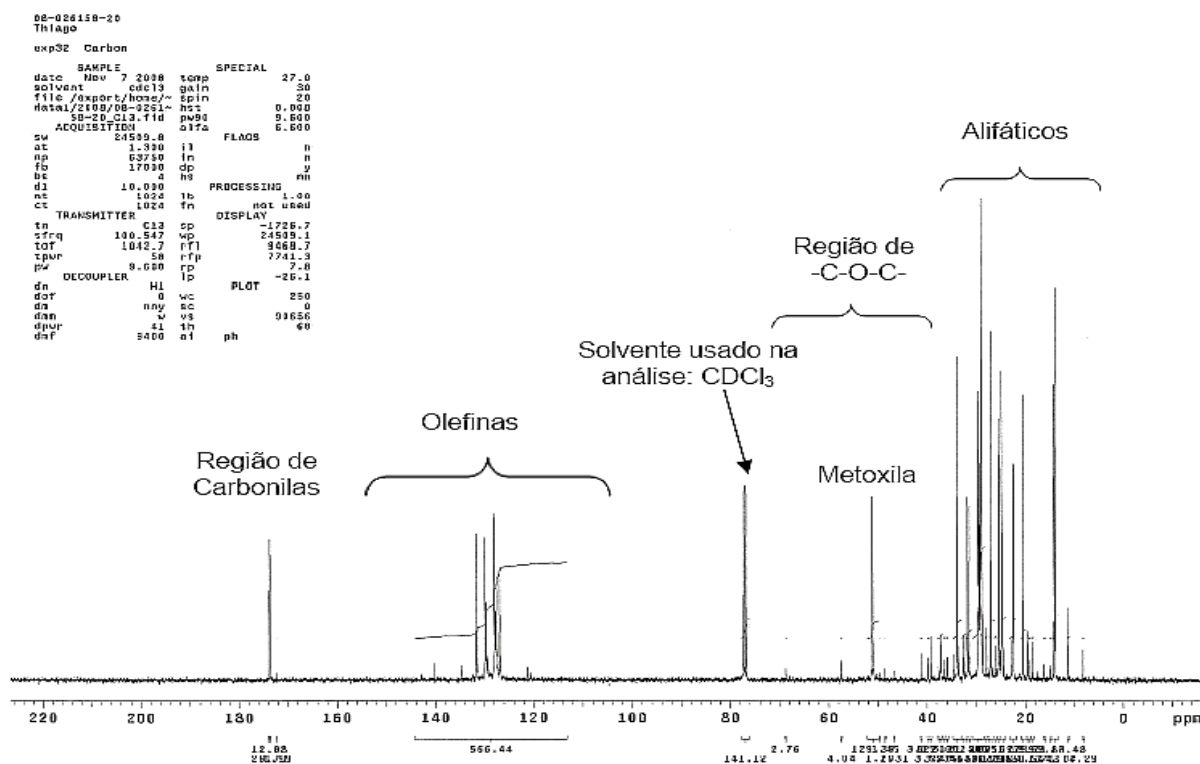


Figura 20 – Espectro de ressonância magnética de  $^{13}\text{C}$  do biodiesel metílico de *Chlorella pyrenoidosa*

```

10-02E108-20
T11105
EXP33 Proton
SAMPLE
Date 7 2019 temp SPECIAL 27.0
Solvent CHCl3 gain 20
File export/08057- Spin 20
Date/2019/08-08-08 hst 0.000
Sd-20.H1 file p080 13.700
ACQUISITION: A1E0 C.000
ac 3210.3 FLAG n
pc 2.04 s1 n
pp 26244 sm n
rs 4018 dp y
hs 4 ht nn
ss 2 PROCESSOR 3.30
d1 1.018 fb 7n DISPLAY 65606
hc 120
cc 120
TRANSMITTER HE 20
to HE 4637.8
freq 332.007 rffl 737.2
sot 322.5 rfn 0
pwr 7.333 rfp -141.8
p1 DECOUPLER 1p PLPT -1.0
dn 0.19 wt 250
dnt 3 sc 0
cs 1 vs 386
cm 4 tn 157
dnc 27 a1 ph
dnt 2012

```

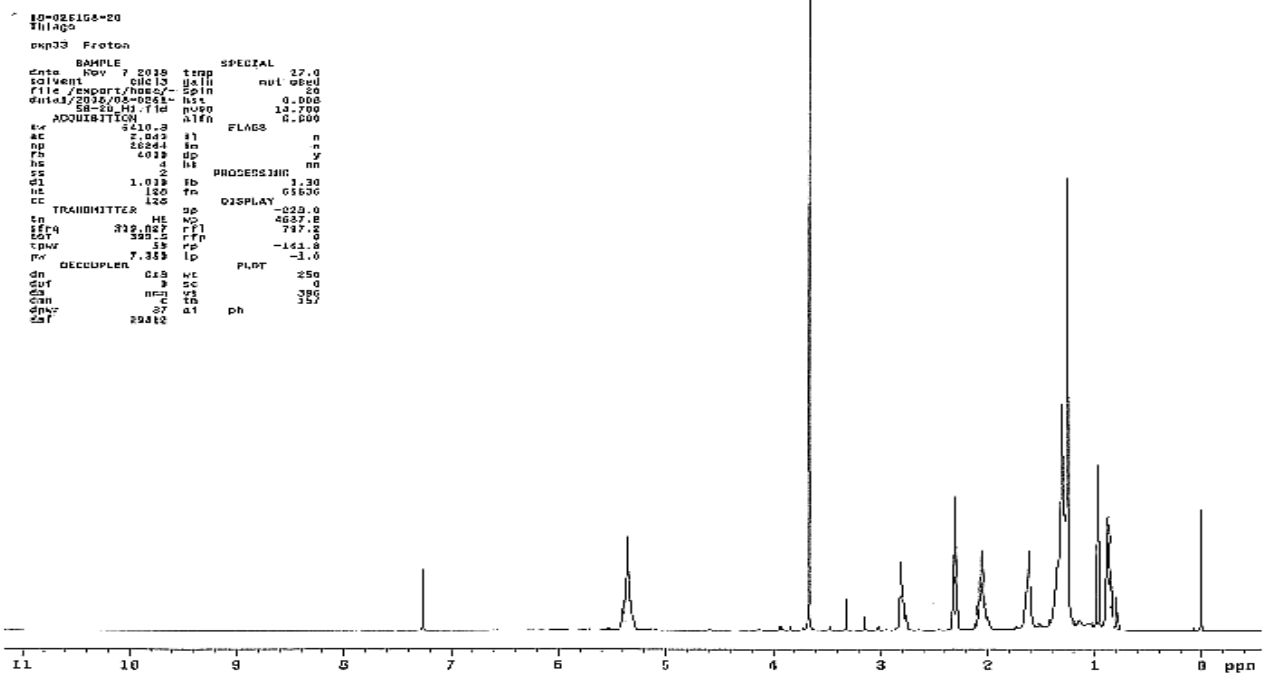


Figura 21 - Espectro de ressonância magnética nuclear <sup>1</sup>H do biodiesel metílico de *Chlorella pyrenoidosa*

5.7 Medida da estabilidade oxidativa

A estabilidade à oxidação da presente amostra de ésteres metílicos da alga *Chlorella pyrenoidosa* ficou em torno de 2 minutos de acordo com o ensaio EN14112 realizado no aparelho de Rancimat. Este fato sugere que a composição dos ésteres apresenta em sua composição uma grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, o que pode ser confirmado anteriormente pela cromatografia, o que difere os perfis de ésteres normalmente observados para biodiesel oriundos de oleaginosas convencionais (tempo de 6 horas para o padrão de biodiesel de soja).

## 6 CONCLUSÃO

Levando em consideração os objetivos propostos e analisando os resultados obtidos para este trabalho, podemos observar que os mesmos foram alcançados.

Dos métodos utilizados para a extração a agitação magnética foi mais efetiva do que com o banho de ultrassom, pois a agitação magnética permitiu uma melhor dispersão do solvente no interior da célula. A mistura de clorofórmio: metanol (2:1 v/v) foi o solvente extrator que apresentou o melhor resultado entre os ensaios (~20 % de lipídeos), enquanto que o hexano apresentou os piores rendimentos na extração (1 % de lipídeos). Estes resultados mostram que a quantidade de triacilgliceróis (óleo) nas microalgas é baixa e que a fração graxa esta na forma de lipídeos polares.

Não houve variação significativa no perfil graxo dessa microalga, independentemente do método empregado para extração (AM<sub>1</sub>, AM<sub>3</sub>, US<sub>1</sub> e US<sub>3</sub>) e do solvente utilizado o ácido graxo observado em maior quantidade foi o C18:3 com ~40 %, em menores quantidades C18:0 ~1,5 %. De acordo com a cromatografia os lipídeos da *Chlorella pyrenoidosa* apresentaram uma grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, entre 60 e 80 %, que conferiram uma baixa estabilidade oxidativa a este óleo clorofórmio:metanol (2:1 v/v).

Os índices oleoquímicos não sofreram variações significativas em seus resultados. O índice de saponificação pode ser comparado ao encontrado na literatura para microalgas da espécie *Chlorella*. O alto índice de iodo calculado pode ser confirmado pela grande presença de PUFAs.

Embora a quantidade de lipídeos extraídos tenha sido menor, a utilização de metanol como solvente extrator seria vantajosa, pois o mesmo solvente seria utilizado para os processos de extração e de esterificação/transesterificação. A quantidade de lipídeos extraídos em escala de 1g foi repetida em escala de 100g, obtendo-se os mesmos resultados.

A quantidade de biodiesel obtido a partir de 100 g de biomassa seca de microalga foi em média de 6,85 g. Apesar da mistura com clorofórmio:metanol (2:1 v/v) ter sido a mais eficiente, com 20 % para extração de lipídeos, foram obtidos no máximo 7,84g de ésteres a partir de 100g de microalgas. A fração lipídica extraída com metanol foi menor do que a obtida com clorofórmio:metanol (2:1 v/v) porém a quantidade em massa de biodiesel puro



foi a maior, 8,98 g a partir de 100g de biomassa. A obtenção de ésteres pode ser confirmada pelos espectros no infravermelho e ressonância magnética nuclear.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- 1 RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycolgy**. Oxford: Blackwell Science, 2004.
- 2 GILL, I.; VALIVETY, R.; Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications. **Trends in Biotechnology**, 15, 401, 1997.
- 3 KOMAKI, H.; The effect of processing of *Chlorella vulgaris*: K-5 on in vitro and vivo digestibility in rats. **Animal Feed Science Technology**, 70, 363, 1998.
- 4 QUEIROZ, M. L. S.; Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead exposed mice infected with *Listeria Monocytogenes*. **International Immuno Pharmacology**, 3, 889, 2003.
- 5 BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. In: RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycolgy**. London: Blackwell Science, 2004.
- 6 MENG, X; YANG, J.; XU, X; ZHANG, L; NIE, Q.; XIAN, M.; Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, 34, 1, 2009.
- 7 TEIXEIRA, C. M.; MORALES, M. E.; Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel. **Instituto Nacional de Tecnologia**. Rio de Janeiro.
- 8 MA, F.; HANNA, M.A.; Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, 70, 1, 1999.
- 9 CHISTI, Y.; Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, 25, 294, 2007.
- 10 MARCHETTI, J.M.; MIGUEL, V.U.; ERRAZU, A.F.; Possible methods for biodiesel production. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, 11, 1300, 2007.
- 11 FERRARI, R.A.; OLIVEIRA, V.; SCABIO, A.; Biodiesel de Soja – Taxa de Conversão em Ésteres Etílicos, Caracterização Físico-Química e Consumo em Gerador de Energia. **Química Nova**, 28, 19, 2005.

- 
- 12 PERIN, G.; ÁLVARO, G. O.; WESPHAL, E.; VIANA, L. H.; JACOB, R. G.; LENARDÃO, E.J.; D'OCA, M. G. M.; Transesterification of Castor Oil Assisted by Microwave Irradiation. **Fuel**, 87, 2838, 2008.
- 13 MARTÍN, M. A.; BERRIOS, M.; SILES, J.; MARTÍN, A.; A kinetic study of the esterification of free fatty acids (FFA) in sunflower oil. **Fuel**, 86, 2383, 2007.
- 14 LIN, L.; YING, D.; CHAITEP, S.; VITTAYAPADUNG, S.; Biodiesel production from crude rice bran oil and properties as fuel. **Applied Energy**, 86, 681, 2009.
- 15 CANOIRA, L.; ALCÁNTARA, R.; AMORES, J.; FIDALGO, E.; FRANCO, M. J.; NAVARRO, A.; Catalytic production of biodiesel from soy-bean oil, used frying oil and tallow. **Biomass and Bioenergy**, 18, 515, 2000.
- 16 HOEK, C. V. **Algae: an introduction to phycology**. London: Cambridge University, 1995.
- 17 OLAIZOLA, M.; Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, 20, 459, 2003.
- 18 ARREGONDO-VEGA, B. O. **Crecimiento autotrófico y mixotrófico de la microalga marina *Porphyridium cruentum***.1995. Tese de Doutorado. Faculdade de Farmácia, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.
- 19 MOLINA, G. E.; MEDINA, R. A.; GIMÉNEZ, G. A. Recovery of algal PUFAs. In: Cohen, Z. **Chemicals from microalgae**, London: Taylor & Francis, 1999.
- 20 CERTIK, M.; SHIMIZU, S.; Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 87, 1, 1, 1999.
- 21 BEHRENS, P. W.; KYLE, D.J. ; Microalgae as a source of fatty acids. **Journal of Food Lipids**, 3, 259, 1996.
- 22 WU, Q.; MIAO, X.; High quality biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Bioresource Technology**, 97, 841, 2006.

- 
- 23 HUANG, G.H.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X. W.; CHEN, Gu.; Biodiesel production by microalgae biotechnology. **Applied Energy**, 2009.
- 24 ZY, W.; JIANG, Y.; CHEN, F.; Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. **Biotechnology Advances**, 21, 273, 2003.
- 25 OILGAE- <http://www.oilgae.com> . acessada em Fevereiro de 2010.
- 26 BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, v. 70, p. 313-321, 1999.
- 27 AMIN, S.; Review on biofuel oil and gas production process from microalgae. **Energy Conversion and Management**, 30, 1834, 2009.
- 28 PÉREZ, Homero E. B. **Biodiesel de Microalgas**, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, 1 - 19, 2007.
- 29 COHEN, Z. Products from microalgae.In:RICHMOND, A.(ed).**CRC Handbook of Microalgal Massa Culture**, Boca Raton:CRC, p.421-454, 1986.
- 30 MATA, T. M.; MARTINS, A.; CAETANO, N. S.; Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 14, 217, 2010.
- 31 WANG, B, LI, Y. WU, N, Lan C.Q.; CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 79(5), 707, 2008.
- 32 ZELITCH, I.; Photosynthesis, Photorespiration and Plant Productivity. **Academic Press**, 275, 1971.
- 33 BECKER, E. W. In. **Microalgae: biotechnology and microbiology**. Baddiley, J. et al., 178 Cambridge University Press, Cambridge, New York 1994.

---

34 LEVEILLE, G.A.; SAUBERLICH, H.E.; SHOCKLEY, J.W.; The protein value and amino acid deficiency of various algae for growth of rats and chicks. **Journal of Nutrition**, 76, 4, 1962.

35 RAMAZANOV, A.; RAMAZANOV, Z.; Isolation and characterization of a starchless mutant of *Chlorella pyrenoidosa* STL-PI with a high growth rate, and high protein and polyunsaturated fatty acid content. **Phycological Research**, 54, 255, 2006.

36 <http://www.plantamed.com.br/fitoterapicos/Phytomare/Clorella.htm> - acessada em Maio de 2010.

37 1931- WARBURG - <http://www.salton.med.br> – acessada em Fevereiro de 2010.

38 SOLOMONS, T. W. G. ; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**, 8ªed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

39 BAILEY, A.E.; **Aceites y grasas industriales**. Reverté , 1944.

40 MORETTO, E; FETT, R. **Tecnologia de óleos Vegetais e Gorduras Vegetais na Indústria de Alimentos**. São Paulo: Varela, 1998.

41 BASOVA, M.M.; Fatty acid composition of lipids in microalgae. **International Journal on Algae**, 7(1), 33, 2005.

42 FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY G.H.S.; A simple method for isolation and purification of total lipids. **Journal of Biological Chemistry**, 226(1), 497, 1957.

43 BLIGH, E. G ; DYER, W. J.; A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal do Biochemistry and Physiology**, 37, 911, 1959.

44 ZHU, M.; ZHOU, P. P.; YU, L.J.; Extraction of lipids from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids. **Bioresource Technology**, 84, 93, 2002.

- 
- 45 MEDINA, R. A.; FAJARADO, A. R.; CERDÁN, L. E.; FERNANDÉZ, F. G.; MORENO, P. A.G.; GRIMA, M. E.; Lipid extraction from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **European Journal Lipid Science Technology**, 109, 120, 2007.
- 46 GRIMA, M.E.; MEDINA R.A.; GIMENEZ, G. A.; PEREZ, S.J.A.; Camacho, G. G.; Sánchez, G.J.L.; Comparasion between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass. **Journal of American Oil Chemists´ Society**, 71, 955, 1994
- 47 OH, H.M.; LEE, S.J.; YOON, B.D.; Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. **Biotechnology Technology**, 12, 553, 1998.
- 48 HOSSAIN, S.; SALLEH, A.; BOYCE, N.A.; CHOWDHURY, P.; NAQUIDDIN, M.; Biodiesel Fuel Production from Algae as Renewable Energy. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, 4 (3), 250, 2008.
- 49 NELSON, J.G. Isolation and purification of lipids from biological matrices. In: Perkins, E.G. **Analises of fats, oils and lipoproteins** .Champaing: American oil Chemists´ Society(AOCS), 1991.
- 50 OH, H.M.; AHN, C.Y.; JUN, S.Y.; LEE, J.Y.; YOO, C.; Comparasion of several methods of effective lipid extaction from microalgae. **Bioresource Technology**, 101, S75, 2010.
- 51 TAKEDA, H.; Classification of *Chlorella* strains by cell wall sugar composition. **Phytochemistry**, 27(12), 3823, 1988.
- 52 TAKEDA, H.; Taxonomical assignment of chlorococal algae from their cell wall composition. **Phytochemistry**, 34(4), 1053,1993.
- 53 OKUDA, K.; Structure and phytoeny of cell coverings. **Journal of Plant Research**, 115, 283, 2002.
- 54 CRAVOTTO, G.; BOFFA, L.; MANTEGNA, S.; PEREGO, P.; AVOGADRO, M.; CINTAS, P.; Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. **Ultrasound. Sonochemistry**, 15, 898, 2008.

---

55 VIROT, M.; TOMAO, V.; GINIES, C.; VISINONI, F.; CHEMAT, F.; Microwave-integrated extraction of total fats and oils. **Journal of Chromatography A**, 1196, 57, 2008.

56 PERNET, F.; TREMBLAY, R.; Effect of ultrasonication and grinding on the determination of lipid class content of microalgae harvested on filters. **Lipids**, 38(11), 1191, 2003.

57 MENDES, R. L., COELHO, J. P., FERNANDES, H. L., MARRUCHO, I.J., CABRAL, J. M. S., NOVAIS, J. M., PALAVRA, A. F.; Applications of supercritical carbon dioxide extraction to microalgae and plants. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**, 62, 53, 1995.

58 FIORENTINI, R.; ANDRICH, G.; ZINNAI, A.; NESTI, U.; VENTURI, F.; Supercritical fluid extraction of oil from microalga *Spirulina (arthrospira) platensis*. **Acta Alimentaria**, 35 (2), 195, 2006.

59 CHEN, F.; JOHNS, M. R.; Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana*. **Journal Applied Phycology**, 3, 203, 1991.

60 YONGMANITCHAI, W.; WARD, O. P.; Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid. **Phytochemistry**, 30, 2963, 1991.

61 PETKOV, G.; GARCIA, G.; Which are fatty acids of the green alga *Chlorella*?. **Biochemical Systematics and Ecology**, 35, 281, 2007.

62 BARCLAY, W. R.; MEAGER, K. M.; ABRIL, J. R.; Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms. **Journal of Applied Phycology**, 6, 123, 1994.

63 NAIK, A. N.; MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, 10, 248, 2006.

64 FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H.; Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. **Journal Bioscience and Bioengineering**, 92(5), 405, 2001.

---

65 SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R.; WOLF, C. R.; Transformação de Triacilgliceróis em combustíveis materiais. Poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. **Química Nova**, 30(3), 667, 2007.

66 BOOCOOCK, D. G. B.; ZHOU, W.; KONAR, S. K.; Ethyl Esters from Single-Phase Base-Catalyzed Ethanolysis of Vegetable Oils. **Journal of American Oil Chemists Society**, 80, 367, 2003.

67 BENEMANN, J. R., Overview: Algae Oil to Biofuels, National Renewable Energy Laboratory-Air Force Office of Scientific Research. **Workshop on Microalgal Oil for Jet Fuel Production**, February, 2008.

68 WU, Q.; TU, P.; ZHAO, N.; PENG, W.; Pyrolytic characteristics of microalgae as renewable energy source determined by thermogravimetric analysis. **Bioresource Technology**, 80, 1, 2001.

69 WU, Q.; TU, P.; ZHAO, N.; PENG, W.; Effects of temperature and holding time on production of renewable fuels from pyrolysis of *Chlorella protothecoides*. **Journal of Applied Phycology**, 12, 147, 2000.

70 CHISTI, Y.; Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, 26 (3), 126, 2008.

71 SEKER, E.; TUNCER, M.; UMBU, E.S.; Transesterification of *Nannochloropsis oculata* microalga's lipid to biodiesel on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> supported CaO and MgO catalysts. **Bioresource Technology**, 100(11), 2828, 2009.

72 NAGLE, N.; LEMKE, P.; Production of Methyl Ester Fuel from Microalgae. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 24, 355, 1990.

73 SUN, Z. F.; EHIMEN, E. A.; CARRINGTON, C.G.; Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids. **Fuel**, 89(3), 677, 2010.

74 JOHNSON, B, M.; WEN, Z.; Production of Biodiesel Fuel from the Microalga *Schizochytrium limacinum* by Direct Transesterification of Algal Biomass. **Energy Fuels**, 23 (10), 5179, 2009.



---

75 International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC); **Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives**, 6th ed., Pergamon Press: Oxford, 1979.

76 American Oil Chemists' Society (AOCS); **Official methods and recommended practices**, 5th ed., AOCS: Champaign, 1997.

77 EGANATHAN, P.H.M.; SUBRAMANIAN, S.R.; LATHA, R.; RAO, C. S. Oil analysis in seeds of *Salicornia brachiata*. **Industrial Crops and Products**, 23, 177–179, 2006.

78 METCALFE, L. D. A.; SCHMITZ, J. R.; Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, 38, 514, 1966.

79 COHEN, Z.; BIGOGNA, C.; KHOZIN, G. I.; BOUSSIBAA, S.; VONSHAK, A.; Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. **Phytochemistry**, 60, 497, 2002.

80 COHEN, Z.; VONSHAK, A.; RICHMOND, A. Effect of environmental conditions on fatty acid composition of the red alga *Porphyridium cruentum*. **Journal of Phycology**, 24, 328, 1988.

81 MOLINA, E. G.; GARCIA, F. C.; ACIEN, G. F.; Production of EPA from *Phaeodactylum tricorutum*. In: **Cohen, Z. Chemicals from microalgae**. Taylor and Francis, 1999.

82 COHEN, Z.; Production potencial of eicosapentaenoic acid by *Monodus subterraneus* . **Journal American Oil Chememistry Society**, 71, 941, 1994.

83 SCHELENK, H.; MANGOLD, H. K.; GELLERMAN, J. L.; LINK, W. E.; MORRISSETE, R. A.; HOLMAN, R. T.; HAYES, H.; Comparative analytical studies of the alga *Chlorella pyrenoidosa* .**Journal of American Oil Chemists Society**, 37, 547, 1960.

84 MILNER, W. H.; The fatty acids of *Chlorella*. **The Journal of Biological Chemistry**, 813, 1948.

85 SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, J.P.D. Extraction and analysis of lipids. In Akoh,C.C; Min, D.B.; **Food lipids: Chemistry, Nutrion and Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1998.

---

86 TSHUKAHARA, K.; SAWAYAMA, S.; Liquid fuel production using microalgae. **Official Of Japan Petroleum Institute**, 48 (5), 251, 2005.

87 GUNSTONE, F. D.; HAMILTON, R. J.; **Oleochemical Manufacture and Applications**. Shenfield Academic Press. Liverpool, 2001.

88 MORÓN-VILLARREYES, J.A. **Modelo molecular para estimación e correlação de propriedades e composição dos óleos naturais na combustão interna**. 1991. Dissertação de Mestrado. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, SP.