

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

**Síntese de Ésteres Graxos de *Chlorella sp.* utilizando os  
processos de Extração-Transesterificação e  
Transesterificação *in situ*.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Juliana Silva Lemões

Rio Grande, 2011.

**SÍNTESE DE ÉSTERES GRAXOS DE *Chlorella sp.* UTILIZANDO OS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO-TRANSESTERIFICAÇÃO E TRANSESTERIFICAÇÃO *IN SITU***

por

**Juliana Silva Lemões**

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, 2011.**

**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

**SÍNTESE DE ÉSTERES GRAXOS DE *Chlorella sp.* UTILIZANDO OS PROCESSOS  
DE EXTRAÇÃO-TRANSESTERIFICAÇÃO E TRANSESTERIFICAÇÃO *IN SITU***

elaborada por

**Juliana Silva Lemões**

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. Dimitrios Samios (Membro) UFRGS**

---

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

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jorge e Maria Eulália, pelo amor incondicional e pelo apoio em todas as fases da minha vida.

Aos meus irmãos Davi e Lucas.

Ao Paulo pela compreensão e paciência nesses momentos estressantes, pelo constante incentivo, apoio e dedicação.

Aos meus dindos e tios, Sérgio e Claudia, que sempre me inspiraram profissionalmente, agradeço por mais uma acolhida.

Ao Prof. Marcelo Gonçalves Montes D'Oca pela orientação na realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório Kolbe de Síntese Orgânica em especial aos alunos de iniciação científica Sabrina Peres Farias, Ana Paula Lopes Monteiro, Laércio Vauchinski e ao colega Rui Carlos Medeiros Alves Sobrinho pelo auxílio na realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Análise de compostos orgânicos e metais (LACOM – FURG), em especial a Sergiane Caldas pela realização das análises cromatográficas.

Ao Rafael Messias pela realização das análises de proteínas e cinzas e ao Eberson Diedrich Eicholz pelo auxílio na realização das análises estatísticas.

Ao Prof. Fábio Andrei Duarte e ao Augusto A. Vieira pelas análises de ICP-MS e ICP-OES.

Aos professores Joaquín Ariel Morón-Villarreyes e Paulo C. Abreu pelas considerações feitas no exame de qualificação.

À Luciana Piovesan pelas correções e sugestões.

Aos colegas de mestrado e amigos Danielle Moraes, Jacqueline Kautz, Carolina Viêgas, Rodrigo Duarte, Cássia Fagundes e Juliane Marques.

Ao CNPq, Capes e Petrobras pelo apoio financeiro.

## RESUMO

**Título: Síntese de Ésteres Graxos de *Chlorella sp.* utilizando os processos de Extração-Transesterificação e Transesterificação *in situ***

**Autor: Juliana Silva Lemões**

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

Este trabalho teve como objetivo realizar estudo comparativo dos processos de extração-transesterificação e transesterificação *in situ* para a síntese de ésteres metílicos e etílicos a partir da microalga *Chlorella sp.*

Utilizando o processo de extração-transesterificação, a extração dos lipídeos foi realizada a partir da biomassa seca de *Chlorella sp.*, pelo uso de três diferentes solventes, clorofórmio:metanol, etanol e metanol, sendo o maior rendimento, 12,3%, obtido com a mistura clorofórmio:metanol (2:1 v/v). Independente do solvente extrator utilizado, as frações lipídicas obtidas apresentaram altos índices de acidez que variaram de 39,39 a 112,76 mg KOH/g. Após, os ésteres alquílicos graxos foram obtidos através da transesterificação das frações lipídicas realizada com metanol e etanol (razão molar álcool:extrato lipídico, 30:1) na presença de 10% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como catalisador a temperatura de 100 °C por 4h.

A transesterificação *in situ* (alcoholise direta) aplicada a biomassa de *Chlorella sp.*, foi realizada a 60 e 100 °C por 4 h usando 20% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com base na biomassa seca. A reação foi realizada a partir de 50 g de biomassa seca na presença de 150 mL de álcool (etanol ou metanol)

A partir do método de transesterificação *in situ* foram obtidos maiores rendimentos de ésteres alquílicos graxos (11,0%), quando comparado ao processo de extração-transesterificação (8,1%). Os produtos purificados apresentaram teores de ésteres que variaram de 75,4% a 99,8%. A variação da temperatura de reação da transesterificação *in situ* não teve influência significativa nos rendimentos dos produtos.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA E AMBIENTAL

Dissertação de Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental, Rio Grande, Julho de 2011

**ABSTRACT**

**Title: Synthesis of Fatty Acid Alkyl Esters of *Chlorella sp.* by Extraction-  
Transesterification and Transesterification *in situ***

**Author: Juliana Silva Lemões**

**Advisor: Marcelo Gonçalves Montes D'Oca, Ph. D.**

The aim of this study was to investigate the extraction-transesterification and the *in situ* transesterification processes in the synthesis of methyl and ethyl esters from microalgae *Chlorella sp.*

In the extraction-transesterification process, lipid extraction was carried out using three different solvents, chloroform:methanol, methanol, and ethanol. The highest yield, 12.3%, was obtained with chloroform:methanol (2:1). Regardless the type of solvent, the lipid extracts had high acid levels, ranging from 39.39 to 112.76 mg KOH/g. Afterward, the fatty acid alkyl esters were obtained by the transesterification of lipid extracts. It was carried out with methanol and ethanol (molar ratio alcohol:lipid, 30:1), using H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> acid as catalyst (10% relation to the lipid mass) at 100 °C for 4 h.

The *in situ* transesterification (direct alcoholysis) applied on algal biomass was performed at 60 and 100 °C for 4 h with sulfuric acid 20% w/w (based on dry biomass). The reaction was carried out using 50 g dry biomass and 150 mL of alcohol.

Results showed that higher fatty acid alkyl ester yields were obtained in the *in situ* transesterification process (11.0%) than in the extraction-transesterification process (8.1%). In addition, the products had ester contents which ranged from 75.4% to 99.8%. The reaction temperature in the *in situ* transesterification process did not affect the yield of the fatty acid alkyl esters significantly.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

POST-GRADUATE PROGRAM IN ENVIRONMENTAL AND TECHNOLOGICAL  
CHEMISTRY M.Sc. Dissertation, Rio Grande, RS, Brazil, July 2011

## LISTA DE ABREVIATURAS

AGL – Ácido graxo livre

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

ASTM - American Society for Testing and Materials

BD - Biodiesel

BX – Mistura óleo diesel/biodiesel, combustível composto de (100-X)% em volume de óleo diesel e X% em volume do biodiesel

B100 – Biodiesel puro

CG - Cromatografia Gasosa

IA – Índice de Acidez

ICP-MS - Espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplada

ICP-OES - Espectrometria de emissão ótica com fonte de plasma indutivamente acoplada

DIN - Instituto Alemão para Normatização

EN – Norma Europeia

FID – Detector de ionização de chama

FAEEs – Ésteres etílicos de ácidos graxos

FAMEs – Ésteres metílicos de ácidos graxos

GC-MS - Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas

ha - hectare

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

SAS- *Statistical Analysis System*

TG – Triacilgliceróis

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Métodos de extração de lipídeos e produção de ésteres metílicos de <i>Chlorella pyrenoidosa</i> .....	16
<b>Figura 2.</b> Fluxograma do processo de síntese de ésteres graxos a partir de <i>Chlorella sp.</i> ...	30
<b>Figura 3.</b> Cromatograma da análise do teor de ésteres metílicos obtidos pelo processo de transesterificação <i>in situ</i> a 60°C.....	42
<b>Figura 4.</b> Espectro de Infravermelho do éster metílico de <i>Chlorella sp.</i> obtido a partir da extração lipídica com metanol.....	43
<b>Figura 5.</b> Espectro de Infravermelho do éster etílico de <i>Chlorella sp.</i> obtido pela transesterificação <i>in situ</i> a 100°C.....	44
<b>Figura 6.</b> Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ dos ésteres metílicos de <i>Chlorella sp.</i> ....	45
<b>Figura 7.</b> Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ dos ésteres etílicos de <i>Chlorella sp.</i> ....	46



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Vantagens e desvantagens de diferentes tipos de catalisadores para a produção de biodiesel. ....	6
<b>Tabela 2.</b> Condições para síntese de biodiesel usando catalisadores ácidos. ....	7
<b>Tabela 3.</b> Composição Química de diferentes fontes expressas em porcentagem em relação à massa seca. <sup>30</sup> .....	9
<b>Tabela 4.</b> Teor lipídico e produtividade de diferentes microalgas. ....	10
<b>Tabela 5.</b> Matérias primas utilizadas para produção de biodiesel.....	11
<b>Tabela 6.</b> Métodos utilizados para produção de biodiesel de <i>Schizochytrium limacinum</i> .....	12
<b>Tabela 7.</b> Rendimentos em ésteres metílicos obtidos por extração-transesterificação e transesterificação <i>in situ</i> a partir da biomassa seca. <sup>6</sup> .....	13
<b>Tabela 8.</b> Rendimentos obtidos por extração-transesterificação e transesterificação <i>in situ</i> a partir da biomassa seca e úmida. <sup>6</sup> .....	14
<b>Tabela 10.</b> Condições de Operação para ICP-MS e ICP-OES. ....	28
<b>Tabela 11.</b> Teor de lipídeos de <i>Chlorella sp.</i> utilizando diferentes solventes e temperaturas. ....	31
<b>Tabela 12.</b> Perfil graxo e massa molar calculada das frações lipídicas de <i>Chlorella sp.</i> extraídas com diferentes solventes a temperatura ambiente e com aquecimento. ....	32
<b>Tabela 13.</b> Índice de acidez e teor de ácidos graxos livres das frações lipídicas de <i>Chlorella sp.</i> .....	34
<b>Tabela 14.</b> Delineamento experimental dos processos de transesterificação de <i>Chlorella sp.</i> 35	
<b>Tabela 15.</b> Avaliação do efeito do solvente extrator no rendimento de ésteres graxos produzidos por extração-transesterificação.....	38
<b>Tabela 16.</b> Avaliação do efeito do álcool no rendimento de ésteres graxos produzidos por extração-transesterificação. ....	38
<b>Tabela 17.</b> Avaliação do efeito do álcool no rendimento de ésteres graxos produzidos pelo processo de transesterificação <i>in situ</i> .....	40

<b>Tabela 18.</b> Avaliação do efeito da temperatura no rendimento de ésteres graxos produzidos pelo processo de transesterificação <i>in situ</i> . .....	40
<b>Tabela 19.</b> Teor de ésteres metílicos e etílicos obtidos nos processos de transesterificação de <i>Chlorella sp.</i> .....	41
<b>Tabela 20.</b> Teor de proteína bruta e cinzas na biomassa inicial e residual dos processos de extração de lipídeos e transesterificação <i>in situ</i> de <i>Chlorella sp.</i> .....	47
<b>Tabela 21.</b> Concentração de elementos na biomassa e torta de extração de lipídeos com clorofórmio:metanol de <i>Chlorella sp.</i> determinados por ICP-MS e ICP-OES expressas em ppm e ppb. ....	49

**LISTA DE ESQUEMAS**

<b>Esquema 1.</b> Transesterificação de triacilglicerídeos na presença de metanol e hidróxido de sódio.....	4
<b>Esquema 2.</b> Esterificação de ácidos graxos catalisada por ácido sulfúrico.....	4
<b>Esquema 3.</b> Reação de formação de sabão a partir do ácido oléico.....	5

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Rendimento de ésteres metílicos e etílicos purificados obtidos pelos processo extração-transesterificação (barras verdes) e *in situ* (barras azuis), expressos em porcentagem em relação a biomassa seca. .... 36
- Gráfico 2.** Teores lipídicos de *Chlorella sp.* extraídos com diferentes solventes (barras em marrom) e rendimento de ésteres metílicos e etílicos purificados obtidos pelo processo de extração-transesterificação (barras verdes). .... 37
- Gráfico 3.** Teor de lipídeo de *Chlorella sp.* extraído com clorofórmio:metanol (2:1 v/v) (barras em marrom) e rendimento de ésteres etílicos e metílicos obtidos pelo processo de transesterificação *in situ*. .... 39

**ÍNDICE**

1.	INTRODUÇÃO .....	1
2.	REFERENCIAL TEÓRICO .....	3
2.1	Biodiesel.....	3
2.2	Microalgas – Características Gerais.....	8
2.3	Biodiesel de microalgas .....	12
3.	OBJETIVOS .....	18
3.1	Geral .....	18
3.2	Específicos.....	18
4.	EXPERIMENTAL.....	19
4.1	Extração de lipídeos de microalga .....	19
4.1.1	Extração em pequena escala .....	19
4.1.2	Extração em média escala .....	20
4.2	Determinação do perfil graxo .....	20
4.2.1	Derivatização da amostra.....	20
4.2.2	Análise cromatográfica.....	20
4.3	Determinação da massa molar da fração lipídica .....	21
4.4	Determinação do índice de acidez das frações lipídicas.....	21
4.5	Transesterificação da fração lipídica .....	22
4.6	Transesterificação <i>in situ</i> .....	23
4.7	Purificação .....	23
4.8	Caracterização dos ésteres graxos .....	24
4.8.1	Determinação do teor de ésteres .....	24
4.8.2	Espectrometria de Infra-vermelho .....	24
4.8.3	Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	24
4.9	Caracterização dos co-produtos .....	25
4.9.1	Determinação de Proteína Bruta.....	25
4.9.2	Determinação de cinzas.....	26
4.9.3	Determinação de Elementos por ICP-OES e ICP-MS.....	26

4.10	Análise estatística .....	29
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	30
5.1	Determinação do índice de acidez das frações lipídicas.....	33
5.2	Produção de ésteres graxos de <i>Chlorella sp.</i> utilizando extração- transesterificação e transesterificação <i>in situ</i> .....	34
5.3	Caracterização dos ésteres graxos .....	41
5.3.1	Teor de Ésteres.....	41
5.3.2	Espectrometria de infra-vermelho .....	42
5.3.3	Ressonância Magnética Nuclear.....	44
5.4	Caracterização dos co-produtos .....	47
5.4.1	Determinação de Proteína Bruta .....	47
5.4.2	Determinação de elementos por ICP-OES e ICP-MS .....	48
6.	CONCLUSÃO .....	51
7.	REFERÊNCIAS.....	52

## 1. INTRODUÇÃO

Biodiesel é um combustível limpo produzido a partir de fontes renováveis tais como óleos vegetais e gorduras animais, o qual pode ser utilizado puro (B100) ou misturado ao diesel em diferentes proporções (BX). O biodiesel é definido quimicamente como uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos proveniente dos processos de transesterificação ou esterificação.<sup>1</sup>

A utilização deste biocombustível está associada à substituição de combustíveis fósseis em motores do ciclo diesel. O biodiesel apresenta vantagens sobre o óleo diesel, por ser derivado de matérias primas renováveis de ocorrência natural, reduzindo assim a atual dependência sobre os derivados do petróleo. Ainda, sendo biodegradável, não contribui para um grande crescimento nos níveis de dióxido de carbono na atmosfera, e conseqüentemente ao efeito estufa.<sup>2</sup>

As matérias primas utilizadas para produção de biodiesel são os óleos vegetais obtidos de diferentes oleaginosas (soja, arroz, girassol, mamona, etc.), gorduras animais obtidas de aves, suínos e bovinos e também de resíduos de óleos e gorduras obtidas de abatedouros, restaurantes e de estações de tratamento de efluentes.<sup>3</sup>

Matérias primas não convencionais, como as microalgas, também têm sido sugeridas para a produção de biocombustíveis, em função de características como alta eficiência fotossintética, alta produção de biomassa e crescimento rápido comparado a oleaginosas convencionais.<sup>4,5</sup> Microalgas apresentam teores de óleo que podem chegar a 80% da biomassa seca, porém os teores comumente encontrados são de 20 – 50% de óleo em relação a biomassa seca.<sup>4</sup>

Em comparação a outras oleaginosas, as microalgas apresentam vantagens, a saber: possibilidade de serem cultivadas em áreas impróprias para a agricultura convencional, possuem elevado teor de óleo, o qual pode ser variável em função das condições de cultivo.<sup>6</sup>

Para produção de biodiesel a partir de microalgas é necessário o desenvolvimento de processo adequado, em função das características da matéria prima, uma vez que diferente das oleaginosas terrestres, a extração de óleo por prensagem não é eficiente em virtude dos teores de lipídeos encontrados na biomassa,<sup>7</sup> geralmente menores que

25%, e da parede celular rígida de algumas microalgas.<sup>6</sup> Outra característica relevante é que o óleo extraído apresenta alto índice de acidez, o que indica que a catálise ácida é a mais adequada para o processo.<sup>5</sup>

Estudos recentes mostram que a produção de biodiesel a partir de microalgas apresenta vários desafios, principalmente do ponto de vista dos processos reacionais, de acordo com as diferentes características das matérias primas.

Em nosso grupo de pesquisa, diferentes processos vêm sendo estudados para a produção de biodiesel de microalgas visando obter melhores rendimentos na extração de lipídeos e melhor qualidade na produção de biodiesel. Resultados recentes mostraram a síntese de ésteres graxos metílicos (FAMEs) a partir da fração lipídica e também diretamente da biomassa de microalgas.

Dentro deste contexto, neste trabalho será investigada a produção de ésteres graxos metílicos (FAMEs) e etílicos (FAEEs) comparando os processos de extração-transesterificação e transesterificação *in situ* da microalga *Chlorella sp.*



## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Biodiesel

Biodiesel é um biocombustível composto por uma mistura de ésteres de ácidos graxos, renovável e biodegradável que pode ser obtido de várias fontes renováveis como soja, canola, palma, girassol e mamona.<sup>1</sup>

O biodiesel pode ser produzido pela reação de transesterificação de triacilglicerídeos produzindo ésteres alquílicos de ácidos graxos (biodiesel) e glicerol, ou pela reação de esterificação de ácidos graxos livres produzindo ésteres alquílicos de ácidos graxos e água, as duas reações ocorrem na presença de alcoóis e de catalisadores.<sup>1,3,8</sup>

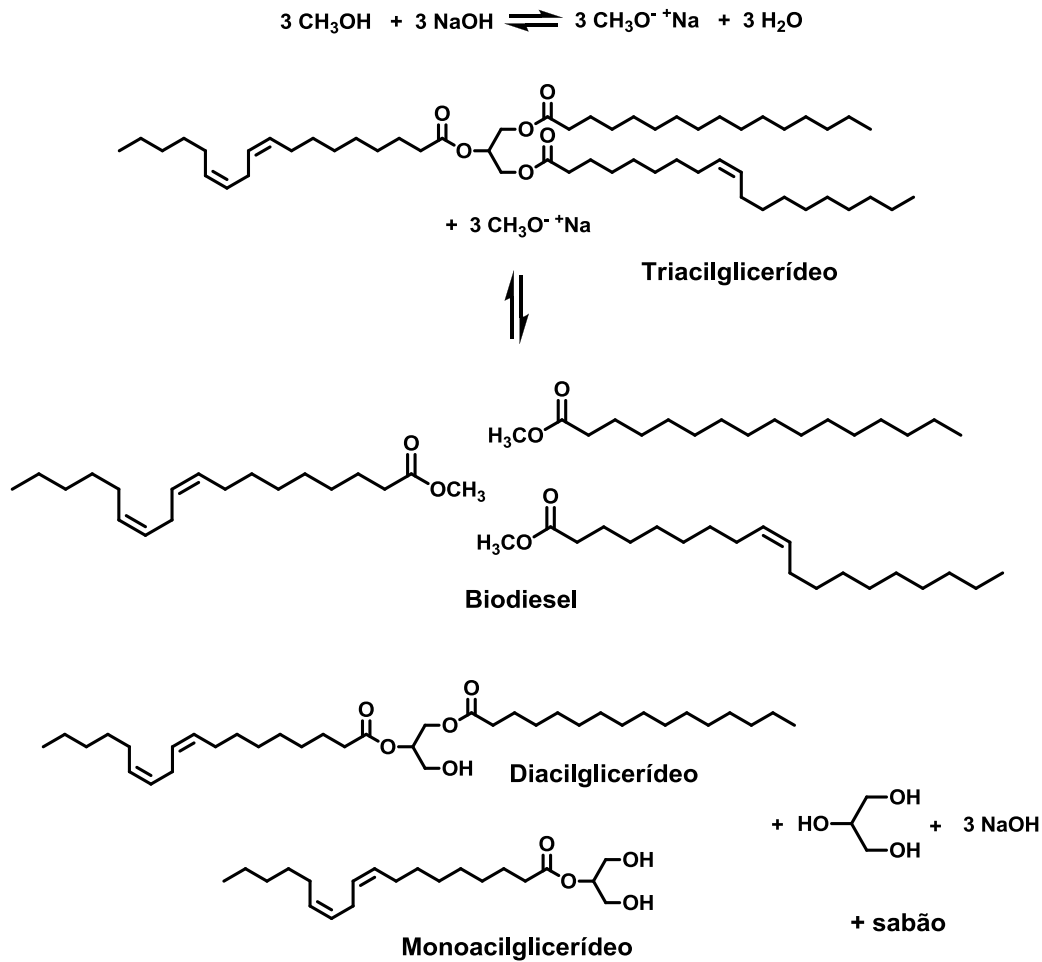
A reação de transesterificação (**Esquema 1**) requer 3 mols de álcool para 1 mol de triacilglicerídeo, porém por se tratar de um processo reversível, um excesso de álcool é utilizado para deslocar o equilíbrio para a formação dos produtos. Já a reação de esterificação (**Esquema 2**) requer 1 mol de álcool para 1 mol de ácido graxo, porém o excesso de álcool também é necessário visando a obtenção de melhores rendimentos.<sup>1,3,8,9</sup>

A formação de água no meio reacional é um fator importante na reação de esterificação de ácidos graxos, pois na presença de catalisador a água pode hidrolisar os ésteres formados, gerando novamente ácidos graxos e álcool (reação inversa mostrada no esquema 2).

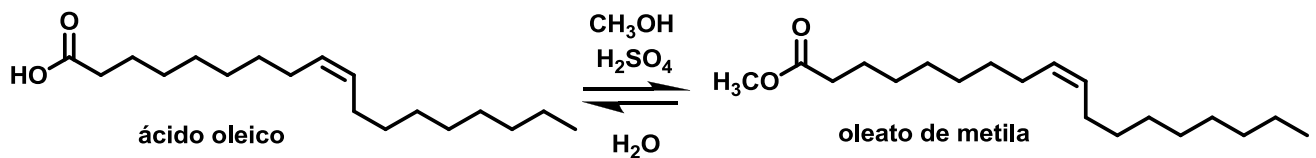
As reações de esterificação e transesterificação podem ser catalisadas por ácido, base ou enzima e o catalisador pode ser homogêneo ou heterogêneo. Catalisadores homogêneos alcalinos incluem hidróxidos de sódio ou potássio e metóxidos de sódio ou potássio,<sup>10</sup> os catalisadores ácidos mais utilizados são os ácidos sulfúrico, sulfônico e clorídrico, catalisadores heterogêneos incluem enzimas, compostos metálicos,<sup>11</sup> entre outros.

Nos processos para produção de biodiesel os catalisadores alcalinos são os mais comuns, pois propiciam processos mais rápidos, condições de reação moderadas e altos níveis de conversão, porém a escolha do tipo de catalisador deve ser feita em

função das características do óleo usado e depende do conteúdo de ácidos graxos livres.<sup>1,8,12</sup>

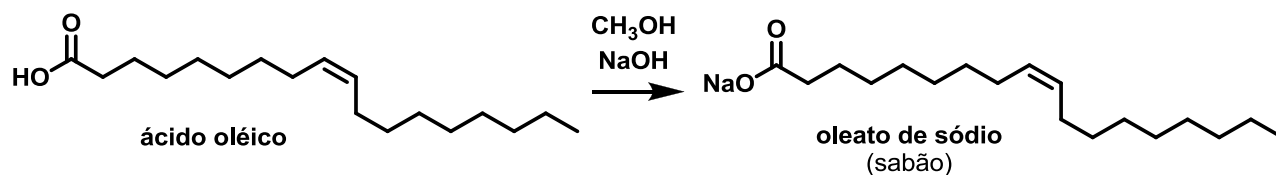


**Esquema 1.** Transesterificação de triacilglicerídeos na presença de metanol e hidróxido de sódio



**Esquema 2.** Esterificação de ácidos graxos catalisada por ácido sulfúrico.

A principal característica da matéria prima que deve ser observada na escolha do catalisador é o índice de acidez. Para a produção de biodiesel a partir de óleos vegetais ou gorduras animais contendo altas quantidades de ácidos graxos a catalise básica não é indicada devido à formação de sabão no meio reacional (**Esquema 3**), reação paralela que consome o catalisador e também dificulta a separação das fases biodiesel e glicerina.<sup>1,8</sup>



**Esquema 3.** Reação de formação de sabão a partir do ácido oléico.

Para matérias primas que apresentam altos índices de acidez<sup>13,14</sup> é comum utilizar um processo em duas etapas, onde é realizado um pré-tratamento ácido da matéria prima que consiste na esterificação dos ácidos graxos livres, seguido por transesterificação alcalina para produção de biodiesel. O tratamento em duas etapas facilita a produção de biodiesel a partir de matérias primas de baixo custo, como resíduos de óleos e gorduras que apresentam alto índice de acidez.<sup>15,16</sup>

Entretanto, o uso de catalisadores ácidos pode simultaneamente catalisar reações de esterificação e transesterificação sendo vantajoso por não ser influenciado pela presença de ácidos graxos livres.<sup>5,17,18</sup> Em razão disto, para matérias primas com altas concentrações de ácidos graxos a catalise ácida é mais adequada que a catalise básica. A Tabela 1 apresenta vantagens e desvantagens de diferentes tipos de catalisadores utilizados para a produção de biodiesel.

**Tabela 1.** Vantagens e desvantagens de diferentes tipos de catalisadores para a produção de biodiesel.  
19

<b>Tipo</b>	<b>Catalisadores</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Homogêneos alcalinos	KOH, NaOH, NaOMe, KOMe	Alta atividade catalítica; baixo custo; cinética favorável; condições operacionais moderadas.	Matéria prima com baixo teor de ácidos graxos livres; formação de sabão; geração de efluentes.
Heterogêneos alcalinos	CaO, CaTiO <sub>3</sub> , CaZrO <sub>3</sub> , Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /KI, alumina/sílica suportada K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Não corrosivo; reciclável; fácil separação; alta seletividade; tempo de vida útil longo.	Matéria prima com baixo teor de ácidos graxos livres; altas temperatura e pressão; alto custo; geração de efluente.
Homogêneos ácidos	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ;	Catalisa esterificação e transesterificação simultaneamente; evita a formação de sabão.	Corrosão dos equipamentos; tempo e temperatura de reação elevados; baixa atividade catalítica;
Heterogêneos ácidos	ZnO/I <sub>2</sub> , ZrO <sub>2</sub> /SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , TiO <sub>2</sub> /SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , Amberlist 15	Catalisa esterificação e transesterificação simultaneamente; reciclável.	Baixa microporosidade; alto custo.
Enzimas	Lipase	Evita a formação de sabão; não poluente; fácil purificação.	Alto custo; desnaturação.

A Tabela 2 apresenta condições reacionais usuais para obtenção de ésteres graxos com catálise ácida. Essas reações são geralmente catalisadas por ácidos

sulfônico e sulfúrico,<sup>20</sup> sendo normalmente reações lentas que requerem temperaturas acima de 100 °C e tempos de 3 a 4 horas para uma boa conversão.<sup>21</sup> Segundo Freedman e colaboradores,<sup>22</sup> o aumento da temperatura apresentou efeito significativo na conversão completa dos triacilglicerídeos em apenas 3 horas a 117 °C, enquanto que a 77 °C foram necessárias 20 horas para obter a mesma taxa de conversão.

**Tabela 2.** Condições para síntese de biodiesel usando catalisadores ácidos.

Matéria prima	Mistura de triacilglicerídeos com alto teor de ácidos graxos (>4%). Óleos residuais e álcool de cadeia curta (anidro)
Razão molar álcool:óleo	30:1
Temperatura	80–100 °C
Tempo	3–4h
Pressão	4 bar
Catalisador	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mais comum)
Concentração do catalisador (com base na massa de óleo)	1,0–2,0%
Conversões ≥ 97% após 4h de reação	

Em geral as reações de esterificação e transesterificação podem ocorrer na presença de alcoóis com cadeias de 1 a 8 átomos de carbono sendo os mais utilizados para produção de biodiesel o metanol e etanol. A vantagem da utilização de metanol é o custo e as propriedades físicas e químicas (álcool polar de cadeia curta), porém o etanol é sugerido por ser obtido de fonte renovável e possuir baixa toxicidade, apesar de apresentar uma desvantagem devida à menor reatividade em relação ao metanol.<sup>23,24</sup>

O rendimento de formação de ésteres graxos é influenciado pela quantidade de álcool no meio reacional, por as reações de transesterificação e esterificação serem reações de equilíbrio. Dessa forma um excesso de álcool é necessário para deslocar a reação para formação dos ésteres. Para máxima conversão de ésteres, geralmente é

utilizada uma razão molar de na faixa de 6:1 a 13:1 álcool:óleo, porém a otimização da razão molar depende das características da matéria prima utilizada.<sup>1,8,9,21</sup>

Freedman e colaboradores<sup>23</sup> descreveram as condições reacionais clássicas para a metanólise de óleos vegetais ou gorduras animais, razão molar 6:1(metanol:óleo), 0,5 % catalisador alcalino em relação a massa de triacilglicerídeo, 600 rpm, temperatura de 60 °C e uma hora de reação. Estudos têm descrito melhores condições para a produção de ésteres metílicos pela otimização do tipo e da quantidade de catalisador, tempo e temperatura de reação, quantidade de álcool e intensidade de agitação.

Como já dito, o etanol apresenta vantagens em relação ao metanol por não ser tóxico e ser obtido de fontes renováveis, porém a reatividade do íon etóxido é menor do que a do metóxido devido ao aumento na cadeia carbônica e conseqüente diminuição na nucleofilicidade, resultando em redução na reatividade do etóxido em relação ao metóxido.<sup>25</sup> Em razão disto, a etanólise ocorre mais lentamente do que a metanólise.

Na transesterificação do óleo de canola (a 25 °C) com uma mistura de 1:1 etanol e metanol (com razão molar de álcoois ao óleo 6:1) o rendimento de ésteres metílicos foi 50 % maior do que dos ésteres etílicos, indicando a preferência na formação de ésteres metílicos.<sup>26</sup>

Além da razão molar álcool:óleo, tipo de álcool e da quantidade e tipo de catalisador outras variáveis influenciam no rendimento de reação como temperatura, conteúdo de água e de ácidos graxos livres e agitação.<sup>1,4,8</sup>

## 2.2 Microalgas – Características Gerais

As microalgas são organismos microscópicos, unicelulares e que apresentam clorofila-a, sendo que a presença deste pigmento permite a realização da fotossíntese (*i.e.*, a produção de matéria orgânica a partir de luz e gás carbônico).<sup>27, 28</sup> São necessários luz, dióxido de carbono, água e sais inorgânicos para o crescimento fotossintético das microalgas, sendo que o meio de cultivo deve suprir elementos inorgânicos que constituem a célula das algas como nitrogênio, fósforo, ferro e, em alguns casos, silício.<sup>4, 29</sup>

As microalgas têm como aplicações principais seu uso como suplemento alimentar, na aquicultura e na extração de produtos de elevado valor comercial como proteínas, lipídeos, carotenóides, clorofila, enzimas, ésteres, antibióticos, hidrocarbonetos e vitaminas.<sup>12, 29, 30</sup> Na Tabela 3 é encontrada a composição química de espécies diferentes de microalgas e de algumas fontes alimentícias e energéticas.

**Tabela 3.** Composição Química de diferentes fontes expressas em porcentagem em relação à massa seca.<sup>30</sup>

<b>Materia prima</b>	<b>Proteína (%)</b>	<b>Carboidrato (%)</b>	<b>Lipídeo (%)</b>
Carne	43	1	34
Leite	26	38	28
Arroz	8	77	2
Soja	37	30	20
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Spirulina máxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11

Por outro lado, em função de sua composição química, as microalgas podem também ser utilizadas como matéria prima para produção de diferentes biocombustíveis como biodiesel, metano, hidrogênio, etanol e outros.<sup>4,5,30</sup>

Como matéria prima para produção de biodiesel, as microalgas apresentam algumas vantagens em relação a outras oleaginosas, como altas taxas de crescimento, o conteúdo de lipídeo pode ser ajustado com a mudança da composição do meio de cultivo, a coleta pode ser feita mais de uma vez ao ano, o dióxido de carbono atmosférico é fonte de carbono para o cultivo.<sup>4,5,30,31</sup>

As taxas de crescimento e produtividade das microalgas variam em função da espécie e das condições de cultivo (intensidade de luz, aeração, temperatura e nutrientes),<sup>4,31</sup> a Tabela 4 apresenta o teor lipídico e a produtividade de diferentes microalgas.<sup>31</sup>

**Tabela 4.** Teor lipídico e produtividade de diferentes microalgas.

Microalga	Teor Lipídico (% biomassa seca)	Produtividade	
		Volumétrica (mg lipídeo/L/dia)	Superficial (g biomassa/m <sup>2</sup> /dia)
<i>Chlorella emersonii</i>	25,0 – 63,0	10,3 – 50,0	0,91 – 0,97
<i>Chlorella prototecoides</i>	14,6 – 57,8	1214	-
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19,0 – 21,0	44,7	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	5,0 – 58,0	11,2 – 40,0	0,57 – 0,93
<i>Chlorella sp.</i>	10,0 – 48,0	42,1	1,61 – 16,47
<i>Chlorella</i>	18,0 – 57,0	18,7	3,50 – 13,90
<i>Scenedesmus sp.</i>	19,6 – 21,1	40,8 – 53,9	2,43 – 13,52
<i>Nannocloropsis oculata</i>	22,7 – 29,7	84,0 – 142,0	-
<i>Nannocloropsis sp.</i>	12,0 – 53,0	37,6 – 90,0	1,9 – 5,3
<i>Tetraselmis suecica</i>	8,5 – 23,0	27,0 – 36,4	19

Outra vantagem no uso das microalgas é que para a produção de biomassa, elas necessitam de menor área para cultivo, quando comparadas a outras matérias primas para produção de biodiesel. Na Tabela 5, Chisti<sup>4</sup> compara várias culturas em relação ao rendimento de óleo, a área requerida para o cultivo, e o percentual em relação à área destinada à agricultura, necessária para suprir 50% da demanda de combustível nos Estados Unidos.



**Tabela 5.** Matérias primas utilizadas para produção de biodiesel.

<b>Cultura</b>	<b>Rend. de óleo(L/ha)</b>	<b>Área necessária (M ha)<sup>a</sup></b>	<b>% área destinada à agricultura<sup>a</sup></b>
Milho	172	1540	846
Soja	446	594	326
Canola	1190	223	122
Pinhão Manso	1892	140	77
Coco	2689	99	54
Palma	5950	45	24
Microalga <sup>b</sup>	136.900	2	1,1
Microalga <sup>c</sup>	58.700	4,5	2,5

<sup>a</sup> para suprir 50% da demanda de combustível nos Estados Unidos, <sup>b</sup> 70% de óleo na biomassa, <sup>c</sup> 30% de óleo na biomassa

Com base nos dados apresentados na Tabela 5, Chisti justifica que as microalgas são a única fonte de biodiesel capaz de substituir completamente o diesel derivado do petróleo.<sup>4</sup>

Ademais, além da alta produtividade de biomassa e alto teor lipídico, a utilização de microalgas como fonte de biodiesel apresenta outras vantagens, tais como:

- o biodiesel obtido a partir de microalgas não contém enxofre, reduz a emissão de material particulado, CO, hidrocarbonetos e SOx;

- o dióxido de carbono atmosférico pode ser biofixado pelas microalgas, reduzindo os níveis desse poluente com o cultivo de biomassa para produção de biodiesel;

- as microalgas podem utilizar contaminantes de efluentes ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ) como nutrientes necessários ao crescimento;

- a biomassa resultante da extração pode ser processada para produção de etanol, metano, fertilizante orgânico e para geração de energia elétrica e térmica.<sup>31</sup>

Apesar das várias vantagens descritas acima, para que a produção de biodiesel a partir dessa matéria prima seja viável, é necessário ainda o desenvolvimento de

tecnologias adequadas para o cultivo, coleta, secagem, armazenamento, extração de lipídeos, transesterificação, transporte e armazenamento do produto obtido.<sup>28,32,33,34</sup>

### 2.3 Biodiesel de microalgas

Pesquisas na utilização de microalgas como matéria prima para produção de biodiesel vem sendo realizadas por diferentes pesquisadores com o objetivo de avaliar as variáveis que influenciam no rendimento e na qualidade do produto, assim como nos custos do processo.

Johnson e Wen<sup>6</sup> estudaram o potencial da utilização da microalga *Schizochytrium limacinum* para produção de biodiesel utilizando dois processos diferentes: a extração de óleo seguida da transesterificação (processo em duas etapas ou convencional) e a transesterificação direta da biomassa (processo em uma etapa ou *in situ*). Nos dois processos foi utilizado biomassa seca e úmida (**Tabela 6**).

**Tabela 6.** Métodos utilizados para produção de biodiesel de *Schizochytrium limacinum*

Processo	Biomassa	Extração	Transesterificação
Em duas etapas	úmida	clorofórmio, metanol	clorofórmio, metanol, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	seca	clorofórmio, metanol, água	clorofórmio, metanol, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Em etapa única	úmida	clorofórmio, metanol, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
		clorofórmio, metanol, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
	seca	hexano, metanol, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
		éter de Petróleo, metanol, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> metanol, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	

No processo em duas etapas a extração foi adaptada do método de Bligh e Dyer a partir de 1 grama de biomassa seca ou úmida (massa equivalente a 1 grama de

biomassa seca) e realizada pela mistura da biomassa e dos solventes, a transesterificação do óleo da microalga foi realizada a 90°C por 40 minutos. Após o término da reação as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e adicionado água destilada à mistura para separação das fases.

Neste trabalho de Johnson e Wen, pelo processo de extração-transesterificação da biomassa seca foi obtido 98,4% (em relação à massa de óleo) de biodiesel bruto, na transesterificação direta da biomassa seca também foram obtidos altos rendimentos quando esta foi realizada na presença de solventes, porém na ausência de solventes o rendimento foi muito baixo - 12,7% - indicando que a presença dos solventes no meio reacional foram essenciais para obtenção de bons rendimentos.<sup>6</sup>

Na Tabela 7 são apresentados os rendimentos em ésteres metílicos obtidos pelos autores, nos dois processos utilizando biomassa seca.<sup>6</sup>

**Tabela 7.** Rendimentos em ésteres metílicos obtidos por extração-transesterificação e transesterificação *in situ* a partir da biomassa seca.<sup>6</sup>

Rendimento de ésteres	Extração-transesterificação	Transesterificação <i>in situ</i>		
	Clorofórmio:Metanol	Clorofórmio	Hexano	Éter de petróleo
% a partir do óleo	63,7 ± 4,41	72,8 ± 3,68	10,5 ± 0,22	11,1 ± 0,12
% a partir da biomassa seca	36,8 ± 2,55	42,0 ± 2,12	6,06 ± 0,14	6,43 ± 0,08
Teor de ester	66,37	63,47	9,15	9,71

Ainda segundo os mesmos autores, na transesterificação direta com os solventes hexano e éter de petróleo o rendimento obtido foi significativamente menor do que o obtido com a utilização de clorofórmio e no processo de extração-transesterificação.<sup>6</sup> A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos na extração-transesterificação e na transesterificação direta da biomassa seca e úmida, sendo que nos dois processos foi utilizada a mistura de solventes clorofórmio:metanol.

**Tabela 8.** Rendimentos obtidos por extração-transesterificação e transesterificação *in situ* a partir da biomassa seca e úmida.<sup>6</sup>

Biomassa	Extração-transesterificação		Transesterificação <i>in situ</i>	
	Úmida	Seca	Úmida	Seca
% Teor de óleo	61,5 ± 0,72	57,8 ± 0,42		
Rendimento de Biodiesel				
% a partir do óleo	97,1 ± 0,70	96,0 ± 3,72	109 ± 2,67	115 ± 0,16
% a partir da biomassa seca	59,7 ± 0,45	55,4 ± 2,15	67,0 ± 1,70	66,2 ± 0,22
Redimento total de Esteres				
% óleo	51,1 ± 1,49	63,7 ± 4,41	8,45 ± 2,97	72,8 ± 3,68
% biomassa seca	31,4 ± 0,92	36,8 ± 2,55	5,20 ± 1,83	42,0 ± 2,12
Conteúdo de ester	52,66	66,37	7,76	63,47

Os resultados obtidos nos dois processos utilizando biomassa úmida e seca foram similares, porém, na transesterificação direta da biomassa úmida o teor de éster no produto foi significativamente menor do que o obtido utilizando biomassa seca.<sup>6</sup>

Ehimen e colaboradores<sup>35</sup> estudaram as variáveis que influenciam nos custos do processo de transesterificação *in situ* para produção de biodiesel a partir da microalga *Chlorella* avaliando a influência do volume de álcool, temperatura, tempo de reação, agitação e teor de umidade da biomassa no rendimento de reação. A Tabela 9 apresenta as condições de reação e as variáveis do processo para cada experimento. Neste estudo, a quantidade de catalisador, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, foi mantida constante em 100% (em relação à massa de óleo da microalga).

**Tabela 9.** Variáveis analisadas e condições experimentais para transesterificação *in situ* de *Chlorella*.

Variável analisada	Variáveis do Processo				
	Volume de álcool (mL)	Temp. (°C)	Tempo (h)	Agitação	Umidade (% m/m)
Volume de álcool e temperatura	20 a 100	23 a 90	8	Continua	0 (biomassa seca)
Tempo	60	23 a 90	0,25 a 12	Continua	0 (biomassa seca)
Umidade	60	60	0,25 a 8	Continua	72,5 a 0,7
Agitação	60	60	8	(1) Contínua; (2) 1 h agitação; (3) Intermitente (1 h agitação e 1 h repouso); (4) Sem agitação	0 (biomassa seca)

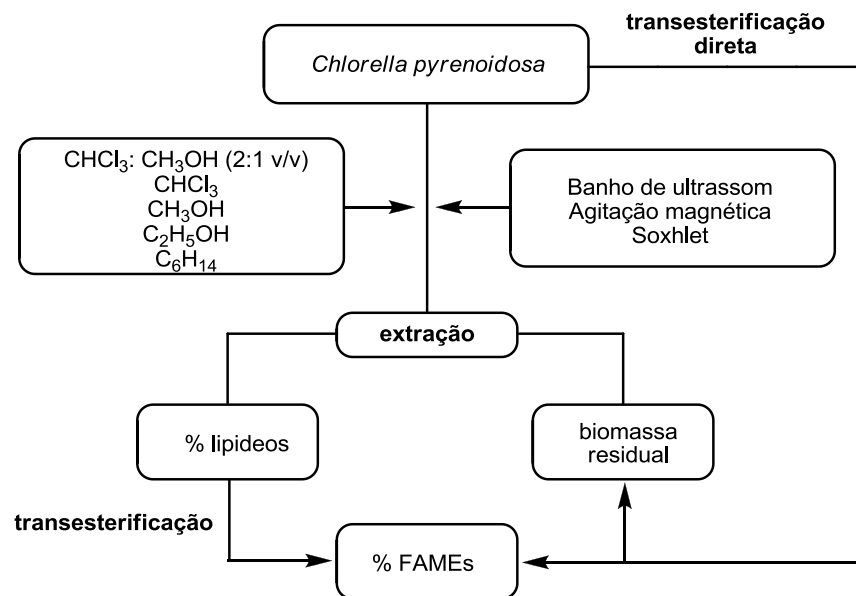
Ehimem e colaboradores<sup>35</sup> observaram que o rendimento do produto aumenta com o aumento da temperatura e do volume de álcool, porém, a partir de 60 mL de álcool (correspondente a razão molar álcool:óleo de 315:1) para a faixa de temperatura de 60°C a 90°C este aumento não foi significativo. À temperatura de 90°C os rendimentos foram de 70% e 92% após 15 minutos e 1 hora de reação, os autores observaram também, que após 2 horas de reação a 60 e 90°C não houve diferença significativa nos rendimentos e que o aumento do teor de umidade teve influência negativa no rendimento de biodiesel e a transesterificação *in situ* foi inibida quando o teor de água foi maior que 115% em relação à massa de óleo.

Ainda, na avaliação da influência da agitação, o rendimento foi significativamente menor quando a reação foi conduzida sem agitação comparada à reação continuamente agitada. No experimento realizado com agitação apenas na primeira hora de reação o rendimento foi de 91,3% do rendimento da reação com agitação contínua. Quando a agitação foi intermitente (1 hora de agitação, 1 hora de repouso) o

rendimento foi próximo, porém menor do que o obtido na reação continuamente agitada.

Miao e Wu<sup>5</sup> determinaram os efeitos da quantidade de catalisador, razão molar metanol:óleo, tempo e temperatura de reação no rendimento e nas propriedades do biodiesel produzido a partir do óleo de *Chlorella protothecoides*, para isso testaram quatro diferentes quantidades de catalisador (25%, 50%, 60% e 100% de ácido sulfúrico em relação à massa de óleo), três temperaturas de reação (30, 50 e 90°C) e seis diferentes razões molares (25:1, 30:1, 45:1, 56:1, 70:1 e 84:1). As melhores condições de reação foram 100% de catalisador, 56:1 razão molar metanol:óleo e a temperatura de 30°C em 4 horas de reação.

Em nosso grupo de pesquisa, D'Oca e colaboradores<sup>36</sup> avaliaram a utilização de diferentes solventes extratores e a influência da agitação magnética e do banho de ultrassom na extração de lipídeos de *Chlorella pyrenoidosa*, assim como compararam os processos de extração-transesterificação da fração lipídica com a transesterificação *in situ* para produção de ésteres metílicos de ácidos graxos, FAMEs (Figura 1).



**Figura 1.** Métodos de extração de lipídeos e produção de ésteres metílicos de *Chlorella pyrenoidosa*.

Neste trabalho os menores rendimentos na extração de lipídeos foram obtidos com hexano, porém os rendimentos de ésteres metílicos obtidos a partir da fração lipídica extraída com metanol e clorofórmio:metanol foram semelhantes, ficando em torno de 10% em relação a biomassa seca. Os resultados também mostraram rendimento maior de ésteres quando foi utilizado o processo de extração-transesterificação quando comparado com a transesterificação *in situ* utilizando metanol. Neste caso, a reação foi conduzida a temperatura de 100 °C utilizando 10% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em relação à fração lipídica e 20% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em relação à biomassa seca, para os processos de extração-transesterificação e transesterificação *in situ*, respectivamente. Como resultado final também foi observado que o uso de metanol como solvente extrator e reagente no processo de extração-transesterificação poderia ser vantajoso evitando a recuperação do solvente extrator quando comparado com o uso de outros solventes. Tendo em vista os trabalhos anteriormente citados, e com base nos resultados obtidos no nosso grupo de pesquisa, este trabalho visa sintetizar ésteres graxos a partir da biomassa e da fração lipídica extraída da microalga *Chlorella sp.* avaliando os efeitos do tipo de álcool e da temperatura de reação no rendimento de ésteres metílicos e etílicos bem como determinar o teor de ésteres obtidos pelos processos de extração-transesterificação e transesterificação *in situ* de *Chlorella sp.*

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Realizar estudo comparativo dos processos de extração-transesterificação e transesterificação *in situ* para a síntese de ésteres metílicos e etílicos a partir da microalga *Chlorella sp.*

#### 3.2 Específicos

- Determinar o teor lipídico presente na microalga utilizando os solventes extratores clorofórmio:metanol, metanol e etanol por agitação magnética a frio e a quente.
- Determinar o perfil graxo da fração lipídica da microalga *Chlorella sp.*
- Determinar o índice de acidez das frações lipídicas por titulação potenciométrica.
- Produzir ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos a partir da fração lipídica de microalga extraída com clorofórmio:metanol, metanol e etanol utilizando catálise ácida.
- Produzir ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos a partir da biomassa de microalga pelo processo de transesterificação *in situ* utilizando catálise ácida.
- Avaliar o efeito da temperatura nos rendimentos de ésteres metílicos e etílicos obtidos pelo processo de transesterificação *in situ*.
- Determinar o teor de ésteres nos produtos obtidos por ambos os processos.
- Caracterizar os co-produtos gerados na extração de lipídeos e na síntese de ésteres pelo processo extração-transesterificação e *in situ*.



## 4. EXPERIMENTAL

Para os dois processos de obtenção de ésteres graxos utilizou-se a biomassa seca de *Chlorella sp.* obtida comercialmente.

Todos os reagentes e solventes utilizados neste trabalho foram obtidos de fontes comerciais. As reações foram monitoradas por Cromatografia de Camada Delgada em sílica gel Merck 60GF<sub>254</sub> e os produtos purificados por cromatografia em coluna utilizando sílica gel (ACROS 0,035-0,070 mm, 60A) e alumina (óxido de alumínio neutro 90, 0,05-0,2 mm, 70-270 mesh ASTM)

### 4.1 Extração de lipídeos de microalga

#### 4.1.1 Extração em pequena escala

A biomassa de microalga foi previamente seca em estufa a 60°C até peso constante e a extração de lipídeos foi baseada no método descrito por Zhu e colaboradores.<sup>37</sup>

As extrações foram realizadas em balão de 50 mL a partir de 1 g da biomassa e 6 mL de solvente, os solventes de extração utilizados foram etanol, metanol e a mistura de clorofórmio:metanol (2:1 v/v), respectivamente. Após a adição de solvente, as extrações foram conduzidas submetendo as amostras a agitação magnética por 2 horas.

A fase do solvente contendo a fração lipídica foi separada da biomassa por filtração, a biomassa foi lavada com o solvente extrator, após o solvente foi evaporado e a fração lipídica seca até peso constante em estufa a 60°C.

Os ensaios foram realizados em triplicata à temperatura ambiente e o rendimento da extração foi determinado em porcentagem em relação à massa seca.

O mesmo protocolo foi realizado com aquecimento utilizando os solventes etanol e metanol, para etanol a temperatura utilizada foi de 65 °C e para metanol de 53 °C. As extrações foram realizadas em sistema composto por balão de 50 mL, condensador de refluxo e agitador magnético com aquecimento.

#### 4.1.2 Extração em média escala

A extração lipídica foi realizada em erlenmeyer de 500 mL a partir de 100 g de biomassa previamente seca e 300 mL de solvente (clorofórmio:metanol, 2:1, metanol e etanol) sob agitação magnética por 2 horas a temperatura ambiente. Após, a biomassa foi separada da fração lipídica por filtração a vácuo utilizando funil sinterizado e o solvente evaporado em evaporador rotatório.

O rendimento da extração foi determinado em porcentagem em relação à massa seca.

### 4.2 Determinação do perfil graxo

#### 4.2.1 Derivatização da amostra

A derivatização da fração lipídica foi conduzida de acordo com metodologia proposta por Metcalfe e Schmitz.<sup>38</sup> À fração lipídica foi adicionado 3 mL de BF<sub>3</sub> em metanol e a mistura aquecida em banho maria a 70 °C por 20 minutos. Após resfriamento da amostra a temperatura ambiente, foi adicionado à mistura derivatizada 20 mL de água destilada e 15 mL de hexano 95% (*ultra resi analysis*) em funil de separação. As fases orgânicas e aquosas foram separadas e a fase orgânica contendo os ésteres graxos foi seca e o solvente evaporado em evaporador rotatório.

#### 4.2.2 Análise cromatográfica

As análises foram realizadas em sistema cromatográfico GCMS-QP2010Plus (Shimadzu), equipado com injetor split/splitless acoplado com detector de massas. Temperaturas de operação do detector: interface, 280 °C; e fonte a 230 °C. Detecção no modo *full scan* com varredura m/z 30 até m/z 500, em um tempo de varredura de 0,2 segundos. O modo de ionização utilizado foi o impacto de elétrons a 70 eV. As condições de operação do cromatógrafo foram: injetor, 250 °C; coluna, 80 °C (temperatura inicial, 0 min); seguido de gradiente de 10 °C/min até 180 °C e depois 7°C/min até a temperatura final de 330 °C; fluxo de gás He, 1,3 mL/min; pressão, 88,5

kPa; velocidade linear média, 42 cm/s; volume de injeção de 1 µL com razão de split de 1:100. A coluna utilizada foi Crossbond 5% difenil / 95% dimetil polisiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Restek). Os compostos foram identificados pelo tempo de retenção e também foi realizada a confirmação pelo espectro de massas.

### 4.3 Determinação da massa molar da fração lipídica

A massa molecular média foi determinada a partir do perfil graxo, os ácidos graxos foram considerados como lipídeos simples (triacilglicerol) e a massa molecular individual foi calculada pela expressão

$$M = 42.078n - 6.048l + 134.042$$

Pela regra das misturas proposta por Kay,<sup>39</sup> a massa molecular média foi calculada pelas massas moleculares individuais dos triacilglicerídeos pela expressão abaixo (onde x corresponde à fração molar e z à fração mássica).

$$\bar{M} = x_1 M_1 + x_2 M_2 + x_3 M_3 + \dots = \frac{1}{\frac{z_1}{M_1} + \frac{z_2}{M_2} + \frac{z_3}{M_3} + \dots}$$

onde:

n: Número médio de carbonos nos ácidos graxos

l: Número médio de insaturações presentes em cada ácido graxo

M: Massa molecular média do triacilglicerídeo

### 4.4 Determinação do índice de acidez das frações lipídicas

A determinação do índice de acidez foi realizada a partir das frações extraídas com clorofórmio:metanol, metanol, etanol e hexano (conforme procedimento descrito no item 4.1.1) utilizando o método de titulação potenciométrica (ASTM D 664).

Para esta determinação utilizou-se titulador automático da marca Metrohm® Titrino Plus 848, solução titulante de KOH 0,1 mol/L em isopropanol, e tolueno:isopropanol:água (1:0,95:0,5) para a solubilização da amostra.

A solução titulante foi padronizada utilizando 200 mg de padrão primário biftalato de potássio. Realizou-se uma leitura em branco na qual titulou-se 50 mL da solução para solubilização da amostra (tolueno:isopropanol:água).

Para a realização das leituras dos índices de acidez das frações lipídicas, foi pesado 250 mg da amostra e o volume foi elevado a 50 mL com a solução de tolueno:isopropanol:água (1:0,95:0,5).

O índice de acidez foi calculado a partir da equação abaixo:

$$IA = \frac{(EP1 - CV01) \cdot 5,61 \cdot Titter}{C00}$$

onde:

5,61 = massa molar de KOH multiplicado pela concentração de KOH (0,1 mol/L)

EP1 = volume de titulante gasto

CV01 = volume de titulante gasto para titulação do branco

Titter = fator de correção da concentração de KOH

C00 = massa da amostra

#### 4.5 Transesterificação da fração lipídica

A fração lipídica foi transesterificada em sistema composto por agitador magnético com aquecimento, banho de silicone, balão de 100 mL e condensador de refluxo.

Ao balão contendo a fração lipídica extraída previamente com os diferentes solventes (conforme item 4.1.2) foi adicionado metade do volume de álcool correspondente a razão molar álcool:lipídeo de 30:1.

O ácido sulfúrico (10% em relação à massa lipídica) foi diluído no volume restante de álcool e a mistura foi adicionada ao balão de reação, sendo a mistura mantida sob agitação por 4 horas a 100 °C. A reação foi acompanhada por cromatografia em

camada delgada utilizando como fase estacionária sílica e como eluente a mistura hexano e éter etílico 8:2, a placa cromatográfica foi exposta a vapores de iodo em recipiente fechado para a visualização do produto.

Ao final da reação o álcool foi evaporado em evaporador rotatório e o produto da reação foi tratado com 100 mL de hexano sob agitação magnética por 1 hora, após, a fração solúvel em hexano (produto) foi separada da fração insolúvel (resíduo) por filtração a vácuo e o bruto reacional foi purificado por cromatografia em coluna.

#### **4.6 Transesterificação *in situ***

A transesterificação da biomassa seca foi realizada em sistema composto por agitador magnético com aquecimento, banho de silicone, balão de 250 mL e condensador de refluxo. A reação foi realizada utilizando 50 g de biomassa, 5,2 mL de catalisador (20% de ácido sulfúrico em relação à biomassa) e 150 mL de álcool, permanecendo a mistura de reação a 60 °C e 100 °C, durante 4 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada utilizando como fase estacionária sílica e como eluente a mistura hexano e éter etílico 8:2. A placa cromatográfica foi exposta a vapores de iodo em recipiente fechado para a visualização do produto.

Ao final da reação a biomassa foi separada por filtração a vácuo e o álcool evaporado em evaporador rotatório. O produto da reação e a biomassa residual foram tratados separadamente com 200 mL de hexano sob agitação magnética por 1 hora.

A biomassa foi novamente separada do solvente por filtração a vácuo em funil sinterizado. Do produto bruto tratado, separou-se a fração solúvel em hexano (produto) da fração insolúvel (resíduo) por filtração a vácuo.

Após o tratamento, juntaram-se as duas frações contendo os ésteres graxos e o solvente foi evaporado em evaporador rotatório.

#### **4.7 Purificação**

O produto bruto foi purificado em coluna cromatográfica de dimensões 4,5 cm de diâmetro e 32 cm empacotada com 20 g de sílica gel (0,035-0,07 mm, 60 A) e 60 g de

alumina (óxido de alumínio neutro 90, 0,05-0,2 mm, 70-270 mesh ASTM). A purificação foi realizada a partir de 5 g de amostra e o eluente utilizado foi hexano e a mistura hexano e acetato de etila 1% (v/v). A eluição do produto foi acompanhada por cromatografia em camada delgada.

## 4.8 Caracterização dos ésteres graxos

### 4.8.1 Determinação do teor de ésteres

Para determinação do teor de ésteres foi utilizado um cromatógrafo 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  $\mu$ m, Restek), hélio como gás de arraste, modo de injeção split, razão split 1:50, velocidade linear 45 cm/s, temperatura do injetor 250°C, temperatura do detector 250°C e volume de injeção de 1  $\mu$ L.

As condições de análise foram realizadas segundo recomendações da DIN EN14103<sup>40</sup>.

O teor de éster foi calculado através da soma de todos os picos entre C14 e C24 e relacionando-os com o padrão interno heptadecanoato de metila.

### 4.8.2 Espectrometria de Infra-vermelho

Os produtos obtidos, após purificação, foram analisados por espectrometria de infra-vermelho, sendo utilizado equipamento Shimadzu<sup>®</sup> - IR PRESTIGE 21 com software IR Solution para controle do equipamento e célula de NaCl como acessório para suporte da amostra. A faixa de comprimento de onda foi de 1000-4000  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### 4.8.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN de  $^1\text{H}$  foram realizadas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em um aparelho Varian VNMRS, operando a 300 MHz. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são registrados em ppm e as constantes de acoplamento

(J) em Hz. Os espectros de RMN-<sup>1</sup>H têm seus dados expressos como: multiplicidade (s, singleto; d, dubleto; dd, duplo-dubleto; t, tripleto; q, quarteto; m, mutipleto e sl, singleto largo), constante de acoplamento e número relativo de hidrogênios.

## 4.9 Caracterização dos co-produtos

### 4.9.1 Determinação de Proteína Bruta

Determinou-se o teor de proteína na biomassa de *Chlorella sp.*, nas tortas de extração de lipídeos (procedimento descrito no item 4.1.2) e na biomassa residual do processo de transesterificação *in situ* (procedimento descrito no item 4.6).

A determinação de proteína foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS.

O método utilizado foi Kjeldahl através da determinação de nitrogênio protéico. Foi pesado aproximadamente 250 mg de amostra e transferido para tubo de digestão, sendo adicionado 15 g da mistura catalítica (10 partes de sulfato de sódio e 1 parte de sulfato de cobre), pérolas de vidro e 20 mL de ácido sulfúrico p.a. Após, foi iniciada a digestão a baixa temperatura com elevação até 380°C.

Após resfriamento da amostra, foi adicionado de 250 a 350 mL de água destilada com agitação até a dissolução da amostra.

Foram adicionados 5 grânulos de zinco para controle da ebulição e 150 mL de hidróxido de sódio a 50%. Então a mistura foi agitada, procedendo-se a destilação de modo que o condensado fosse obtido a temperatura ambiente.

Foram recolhidos cerca de 200 mL do destilado em erlenmeyer de 300 mL contendo 30 mL de ácido bórico 4% com 10 gotas de indicador misto (solução alcoólica de vermelho de metila e verde de bromocresol).

O destilado foi titulado com ácido clorídrico 0,1N até a viragem do indicador verde para rosa e então o teor de proteína foi calculado conforme equação:

$$\% \text{prot. Bruta} = \frac{100 \cdot 0,014 \cdot 6,25 \cdot (V_a - V_b) \cdot F \cdot N}{P}$$

Onde:

$P$ = massa da amostra em g

$V_a$ = volume de HCl gasto na titulação

$V_b$ = volume de HCl gasto na titulação da prova em branco

$F$ = fator de correção da solução de HCl

$N$ = normalidade do HCl

6,25= fator de transformação de nitrogênio em proteína, considerando 16% de nitrogênio

0,014= miliequivalente grama do nitrogênio

#### 4.9.2 Determinação de cinzas

O teor de cinzas na biomassa de *Chlorella sp.* foi determinado nas tortas de extração de lipídeos (procedimento descrito no item 4.1.2) e na biomassa residual do processo de transesterificação *in situ* (procedimento descrito no item 4.6). A análise foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Embrapa Clima Temperado.

Para determinação de cinzas foi pesado aproximadamente 3 g de amostra em cadinho de porcelana, sendo a amostra carbonizada em chama de bico de Bunsen até o desaparecimento de fumaça.

Os cadinhos com as amostras carbonizadas foram colocados em forno mufla a temperatura de 550°C – 600°C até a obtenção de cinzas claras. Após, os cadinhos foram colocados em dessecador até resfriamento, e pesados. O teor de cinzas foi calculado pela equação:

$$\% \text{ cinzas} = \frac{\text{massa final} - \text{massa inicial}}{P}$$

#### 4.9.3 Determinação de Elementos por ICP-OES e ICP-MS

A concentração de 24 elementos foi determinada na biomassa de *Chlorella sp.* e na torta da extração de lipídeos, utilizando clorofórmio:metanol (conforme descrito no item 4.1.2), pelas técnicas de espectrometria de massas com fonte de plasma



indutivamente acoplada (ICP-MS) e espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). As análises foram realizadas na Universidade de Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS.

Para o preparo de amostras foi utilizado um forno microondas Multiwave 3000 (Anton Paar, Graz, Austria) equipado com 8 frascos de quartzo de alta pressão (pressão máxima 80 bar e temperatura máxima de 280 °C), volume interno de 80 mL e vazão de pressão de 0,8 bar s<sup>-1</sup>.

Para decomposição, 500 mg de amostra foram pesadas em frascos de quartzo e 6 mL de ácido nítrico concentrado foram adicionados. O rotor com oito frascos foi colocado na cavidade do forno microondas e a programação da irradiação, conduzida de acordo com recomendações do fabricante, foi 1400 W (15 min de rampa), 1400 W por 10 min, e 0 W por 20 min (resfriamento). Após resfriamento as amostras digeridas foram diluídas com água a 30 mL em tubos de polipropileno para as determinações por ICP-MS e ICP-OES.

As análises foram realizadas em espectrômetro de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado, (PerkinElmer, Model ELAN DRC II, Thornhill, Canada) equipado com nebulizador concêntrico (Meinhard Associates, Golden, USA), câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, Inc., West Melbourne, Australia) e tocha de quartzo com tubo injetor de quartzo (2 mm d.i) e um espectrômetro de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado com configuração de vista axial (Model Spectro Ciros CCD, Spectro Analytical Instruments, Kleve, Germany) equipado com nebulizador de fluxo cruzado acoplado a uma câmara de nebulização de duplo passo, as condições operacionais dos equipamentos para as análises são apresentadas na Tabela 10.

Para os experimentos utilizou-se ácido nítrico concentrado (65%) destilado, água ultra pura (18,2 MΩ cm) e reagentes grau analítico para o preparo de todos os reagentes e padrões (Merck, Darmstadt, Germany).

Solução estoque multielementos (SCP33MS, SCP Science, Quebec, Canada) foi usada para preparar soluções analíticas de referência pela diluição em HNO<sub>3</sub> 5% (v/v) na faixa de concentração de 0,025 - 10 µg L<sup>-1</sup> para ICP-MS e de 5 - 100 µg L<sup>-1</sup> para ICP-OES.

A determinação das concentrações dos elementos As, Pb, Co, Ni, Li, Mo, Ag, Be, Cd por ICP-MS, K, Fe, Ba, Mg, Ca, Al, Na, S, P foi feita por ICP-OES, e os elementos Mn, Sr, Ti, Zn, Cu e Cr foram determinados pelas duas técnicas.

**Tabela 10.** Condições de Operação para ICP-MS e ICP-OES.

<b>Parâmetros</b>	<b>ICP-MS</b>	<b>ICP-OES</b>
Potência RF (W)	1400	1500
Vazão do gás do plasma (L min <sup>-1</sup> )	15	14
Vazão do gás auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	1,2	0,2
Vazão do gás nebulizador (L min <sup>-1</sup> )	1,15	1,0
Camara de nebulização	Ciclônica	Duplo passo
Nebulizador	Concêntrico	Fluxo cruzado
m/z	<sup>75</sup> As, <sup>107</sup> Ag, <sup>9</sup> Be, <sup>111</sup> Cd, <sup>59</sup> Co, <sup>65</sup> Cu, <sup>52</sup> Cr, <sup>7</sup> Li, <sup>55</sup> Mn, <sup>96</sup> Mo, <sup>58</sup> Ni, <sup>208</sup> Pb, <sup>64</sup> Zn, <sup>46</sup> Ti, Sr	-
		Al 396,152
		Ba 230,424
		Ca 315,887
		Cr 267,716
		Cu 327,396
		Fe 238,204
		K 766,491
		Mg 279,553
		Mn 260,569
		Na 589,592
		P 178,287
		S 180,731
		Sr 421,552
		Ti 336,121
		Zn 206,191
Comprimento de onda (nm)	-	

#### 4.10 Análise estatística

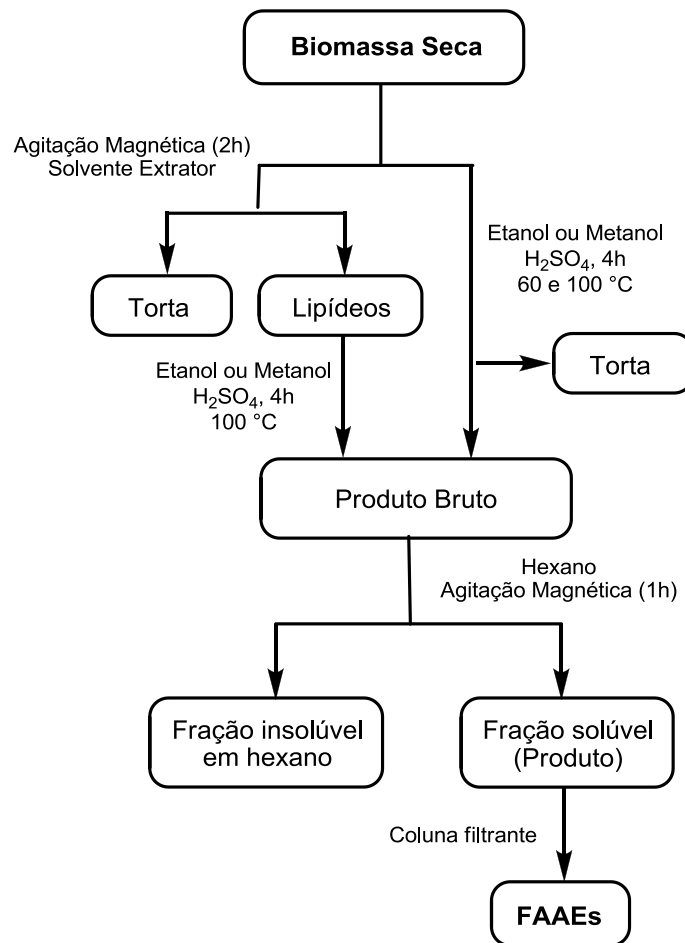
Para avaliação dos rendimentos de ésteres obtidos pelos processos de extração-transesterificação e transesterificação *in situ* foi realizada análise estatística utilizando o programa SAS (*Statistical Analysis System*), com delineamento experimental completamente casualizado com quatro repetições em esquema fatorial 2x3 (álcool x solvente) para o processo de extração-transesterificação e fatorial 2x2 (álcool x temperatura) para o processo de transesterificação *in situ*.

Foi realizada análise de variância (ANOVA), as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de F quando o fator apresentava dois níveis e pelo teste de Duncan ( $\alpha=0,05$ ) quando o fator apresentava três níveis.<sup>41,42</sup>

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para investigar os dois processos, extração-transesterificação e transesterificação *in situ*, na síntese de ésteres graxos, foi necessário determinar o teor de lipídeos da biomassa seca de *Chlorella sp.*, para isso foi realizado o estudo do melhor solvente extrator e da temperatura de extração dos lipídeos.

No processo extração-transesterificação foi realizada a extração de lipídeos em média escala da qual foi obtida a fração lipídica e a torta da extração. Após foi realizada a transesterificação da fração lipídica. No processo *in situ* foi feita a transesterificação direta da biomassa seca. O fluxograma dos processos estudados é mostrado na figura 2.



**Figura 2.** Fluxograma do processo de síntese de ésteres graxos a partir de *Chlorella sp.*

A extração de lipídeos em pequena escala, a partir de 1 g de biomassa seca, foi realizada com três diferentes solventes a temperatura ambiente e com aquecimento. Os solventes foram a mistura clorofórmio:metanol, comumente utilizada para extração de lipídeos totais (método de Bligh e Dyer<sup>38</sup>) e metanol e etanol por serem os álcoois mais utilizados nas reações de esterificação e transesterificação.<sup>34,43</sup>

Os resultados obtidos na extração de lipídeos, média das triplicatas, são apresentados na Tabela 11, expressos em porcentagem em relação a massa seca.

**Tabela 11.** Teor de lipídeos de *Chlorella sp.* utilizando diferentes solventes e temperaturas.

<b>Solvente</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Rendimento (%)</b>	<b>Desvio padrão</b>
Clorofórmio:Metanol (2:1)	20	12,34	0,50
Metanol	20	12,20	0,73
Etanol	20	6,44	0,35
Metanol	53	11,81	0,68
Etanol	65	10,38	0,71

Na extração de lipídeos à temperatura ambiente, o maior rendimento obtido foi de 12,34% com a mistura de solventes (clorofórmio:metanol), com metanol foi obtido rendimento similar, 12,20%, já com a utilização de etanol o teor de lipídeos extraídos foi significativamente menor, porém com aquecimento o teor de lipídeos teve aumento significativo para etanol, de 6,44% para 10,38%.

As frações lipídicas extraídas com diferentes solventes e diferentes temperaturas foram derivatizadas com BF<sub>3</sub> em metanol para determinação do perfil graxo, a Tabela 12 apresenta os ésteres metílicos das frações lipídicas e os percentuais relativos a cada éster obtidos por cromatografia gasosa e a massa molar média obtida a partir do perfil graxo.

**Tabela 12.** Perfil graxo e massa molar calculada das frações lipídicas de *Chlorella sp.* extraídas com diferentes solventes a temperatura ambiente e com aquecimento.

FAME	Metanol		Etanol		Clorofórmio Metanol
	20°C	53°C	20°C	65°C	20°C
Miristoato de metila - C14:0	0,33	0,32	0,36	0,40	0,47
Hexadecadienoato de metila - C16:2	9,98	11,94	11,00	9,86	8,53
Hexadecatrienoato de metila - C16:3	15,82	14,45	17,20	15,20	11,58
Palmitoato de metila - C16:0	20,30	23,26	19,15	22,59	27,68
Margarinato de metila - C17:0	0,54	0,38	0,70	0,72	-
Linoleato de metila - C18:2	19,89	19,60	20,52	18,44	18,83
Linolenato de metila - C18:3	27,53	22,98	26,14	25,91	26,33
Estearato de metila - C18:0	5,62	7,07	4,94	6,88	6,59
Massa Molar (g/mol)	837,46	835,50	836,63	836,07	837,38

De acordo com a Tabela 12, foram identificados oito ácidos graxos principais nas frações lipídicas de *Chlorella sp.*, dos quais quatro saturados e quatro insaturados. Os ácidos graxos majoritários identificados nas frações lipídicas foram o linolênico (C18:3) que variou de 22,98-27,53%, o linoléico (C18:2) de 18,83-20,52% e o palmítico (C16:0) de 19,15-27,68%. Os percentuais relativos dos ésteres identificados tiveram variação inferior a 10% com a mudança de solventes e aquecimento.

Com a utilização de metanol e etanol como solvente extrator foi identificado em pequena quantidade o ácido graxo margárico (C17:0).

A composição de ácidos graxos obtida neste estudo foi similar a das frações lipídicas de *Chlorella pyrenoidosa* extraídas com diferentes métodos de extração<sup>36</sup> e a outras três espécies de *Chlorella* cultivadas em diferentes condições nas quais foram

confirmadas a presença dos ácidos graxos 14:0, 16:0, 16:1, 16:2, 16:3, 18:0, 18:1, 18:2 e 18:3. Para as três espécies os ácidos graxos majoritários foram o linolênico (17 a 27%), o linoléico (18 a 27%) e o palmítico (12 a 26%).<sup>44</sup>

As massas molares de cada fração lipídica foram determinadas utilizando a regra de Kay<sup>39</sup> a partir do perfil graxo e são apresentadas na Tabela 12. A extração com metanol a 53°C resultou em fração lipídica com menor massa molar, 835,50 g/mol, e a extração com metanol a temperatura ambiente resultou em maior massa molar, 837,46 g/mol.

### 5.1 Determinação do índice de acidez das frações lipídicas

Índice de acidez é definido como a quantidade de mg de hidróxido de potássio necessária para neutralizar ácidos graxos livres presentes em 1g de amostra.<sup>9,45</sup> De acordo com a literatura para produção de biodiesel por transesterificação alcalina não é indicado que a matéria prima apresente índice de acidez superior a 2,0 mg KOH/g em função da formação de sabão no meio reacional.

Em matérias primas que apresentam altos índices de acidez é usualmente realizada a esterificação dos ácidos graxos livres na presença de catalisador ácido antes da transesterificação alcalina, porém a esterificação de ácidos graxos ocorre com formação de água que inibe as reações de esterificação e transesterificação causando a hidrólise dos ésteres formados.<sup>1,3,8,9</sup>

Para a escolha do catalisador para realizar as reações de transesterificação foi necessária a determinação do índice de acidez das frações lipídicas extraídas com clorofórmio:metanol, metanol, etanol. A determinação do índice de acidez também foi realizada para frações extraídas com hexano com objetivo de comparar os resultados obtidos.

A determinação do índice de acidez das frações lipídicas de *Chlorella sp.* foi realizada pelo método de titulação potenciométrica e os dados obtidos estão apresentados na Tabela 13. Este método foi escolhido em função das características das frações lipídicas, que apresentam coloração escura o que impossibilita a visualização do ponto de viragem na titulação convencional.

**Tabela 13.** Índice de acidez e teor de ácidos graxos livres das frações lipídicas de *Chlorella sp.*

<b>Solvente</b>	<b>IA (mg KOH/g)</b>
Clorofórmio:Metanol	39,39
Metanol	58,23
Etanol	82,48
Hexano	112,76

Diferente dos óleos vegetais que são constituídos por mais de 95% de triacilglicerídeos,<sup>45</sup> lipídios neutros, os lipídeos extraídos de microalgas são constituídos principalmente de ácidos graxos, fosfolipídeos, glicolipídeos e outros lipídeos polares.<sup>46,47,48</sup>

A fração lipídica extraída com hexano a temperatura ambiente apresentou maior índice de acidez, 112,76 mg KOH/g, neste caso, sendo composta na sua maior parte por ácidos graxos livres (AGL), compatível com a polaridade do hexano que o torna mais seletivo para triacilgliceróis (TG) e ácidos graxos livres (AGL).

Com o aumento da polaridade dos solventes, aumenta o conteúdo de lipídeos polares extraídos, diminuindo a quantidade de ácidos graxos com relação à massa total de amostra e, conseqüentemente, o índice de acidez total. Em razão disto, o menor índice de acidez, 39,39 mg KOH/g, foi obtido com a utilização de clorofórmio:metanol como solventes extratores.

Independente do solvente extrator as frações lipídicas de *Chlorella sp.* apresentaram índices de acidez superiores aos indicados para a realização da transesterificação alcalina favorecendo neste caso a transesterificação em meio ácido.

## **5.2 Produção de ésteres graxos de *Chlorella sp.* utilizando extração-transesterificação e transesterificação *in situ*.**

Os experimentos para produção de ésteres graxos a partir de *Chlorella sp.* foram desenvolvidos conforme a Tabela 14.



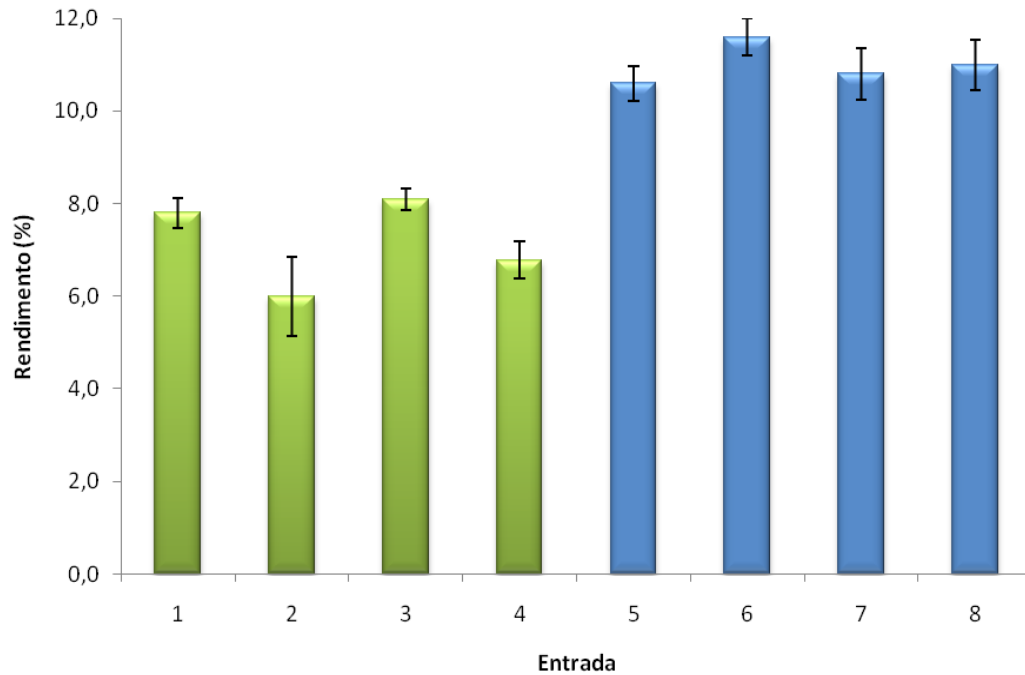
**Tabela 14.** Delineamento experimental dos processos de transesterificação de *Chlorella sp.*

Entrada	Extração		Transesterificação	
	Solvente	Temp. (°C)	Álcool	Temp. (°C)
1	Clorofórmio:Metanol	20	metanol	100
2	Metanol	20	metanol	100
3	Clorofórmio:Metanol	20	etanol	100
4	Etanol	20	etanol	100
5	-	-	metanol	60
6	-	-	metanol	100
7	-	-	etanol	60
8	-	-	etanol	100

O processo realizado em duas etapas foi conduzido a partir da extração lipídica utilizando 100 g de biomassa seca e 300 mL de solvente sob agitação magnética a temperatura ambiente seguida da transesterificação da fração lipídica obtida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10% em relação à massa lipídica) e razão molar álcool:lipídeo de 30:1. Já o processo de transesterificação *in situ* foi realizado a partir de 50 g de biomassa seca na presença de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20% de ácido em relação à biomassa seca) e 150 mL de álcool.

O catalisador H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi escolhido em função do alto índice de acidez da fração lipídica da microalga, sendo, neste caso, mais adequada a utilização de catálise ácida.<sup>3,9,49</sup>

Os rendimentos de ésteres metílicos e etílicos, média de quatro repetições, obtidos pelo processo extração-transesterificação (barras em verde) e *in situ* (barras em azul) são apresentados no Gráfico 1 e foram expressos em porcentagem em relação à biomassa seca de *Chlorella sp.*

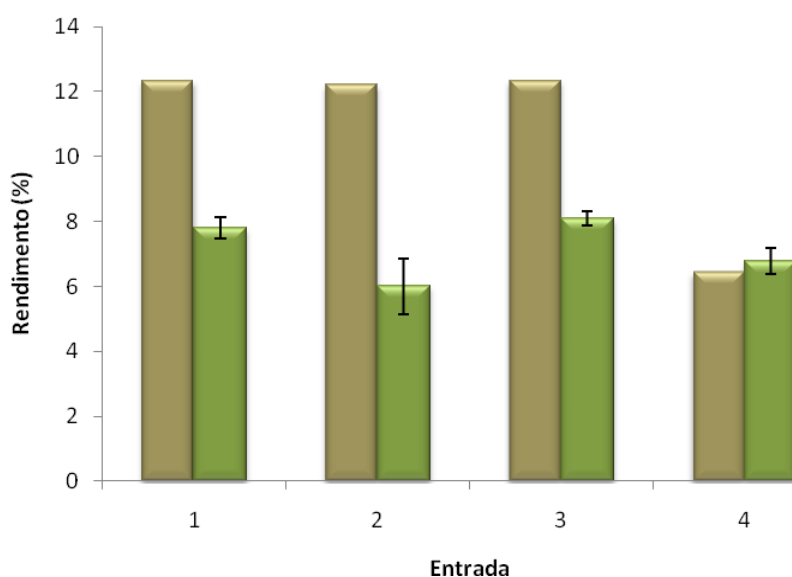


**Gráfico 1.** Rendimento de ésteres metílicos e etílicos purificados obtidos pelo processo extração-transesterificação (barras verdes) e *in situ* (barras azuis), expressos em porcentagem em relação a biomassa seca.

De acordo com os resultados os rendimentos do processo de transesterificação *in situ* (**Entradas 5 a 8, Gráfico 1**), na presença de  $H_2SO_4$ , foram superiores aos obtidos pelo processo extração-transesterificação (**Entradas 1 a 4, Gráfico 1**).

Segundo Johnson e colaboradores<sup>6</sup> e Wahlen e colaboradores,<sup>33</sup> pela transesterificação direta de biomassa de microalgas obtêm-se maiores rendimentos de ésteres quando comparado ao processo de extração seguido da transesterificação. Em trabalho anterior realizado em nosso grupo de pesquisa, utilizando biomassa seca de *Chlorella pyrenoidosa*, os rendimentos de ésteres metílicos graxos utilizando os dois processos favoreceram a extração-transesterificação.<sup>36</sup>

A partir dos teores de lipídeos extraídos da biomassa seca de *Chlorella sp.* com diferentes solventes (ver Tabela 11) foi possível calcular a taxa de conversão de lipídeos em ésteres graxos obtidos no processo de extração-transesterificação (**Gráfico 2**).



**Gráfico 2.** Teores lipídicos de *Chlorella sp.* extraídos com diferentes solventes (barras em marrom) e rendimento de ésteres metílicos e etílicos purificados obtidos pelo processo de extração-transesterificação (barras verdes).

Da fração lipídica extraída com clorofórmio:metanol (12,34% de lipídeos em média) apenas 63,3% foram convertidos em ésteres metílicos e 65,6% em ésteres etílicos, o que corresponde a um rendimento 7,8% de ésteres metílicos e 8,1% de ésteres etílicos calculados a partir de biomassa seca (**Entradas 1 e 3, Gráfico 2**).

Com a utilização de metanol como solvente extrator obteve-se 12,2% de lipídeos e pela transesterificação apenas 49,2% desses lipídeos foram convertidos rendendo 6,0% de ésteres metílicos (**Entrada 2, Gráfico 2**).

A fração lipídica extraída com etanol apresentou menor rendimento na extração de lipídeos, 6,44% em média, porém a taxa de conversão desses lipídeos em ésteres etílicos, 105,3%, foram as maiores obtidas no processo de extração-transesterificação

(**Entrada 4, Gráfico 2**), neste caso o rendimento em massa foi superior devido a formação do éster etílico.

A partir dos dados obtidos no processo de extração-transesterificação foi realizada análise de variância dos rendimentos de ésteres purificados e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan.

Os maiores rendimentos de ésteres no processo de extração-transesterificação foram obtidos a partir da fração lipídica extraída com a mistura de solventes clorofórmio:metanol (**Tabela 15**).

**Tabela 15.** Avaliação do efeito do solvente extrator no rendimento de ésteres graxos produzidos por extração-transesterificação.

<b>Solvente</b>	<b>Rendimento médio (%)</b>
Clorofórmio:metanol	8,16 A
Etanol	6,38 B
Metanol	6,00 B

Médias com mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Duncan.

A utilização de etanol e metanol foi menos eficiente na extração de lipídeos quando comparada com a mistura clorofórmio:metanol, porém entre etanol e metanol não houve diferença significativa no rendimento de lipídeos.

Na avaliação do efeito do álcool no rendimento de ésteres graxos também não houve diferença significativa entre etanol e metanol, a avaliação dos dados são apresentados na Tabela 16.

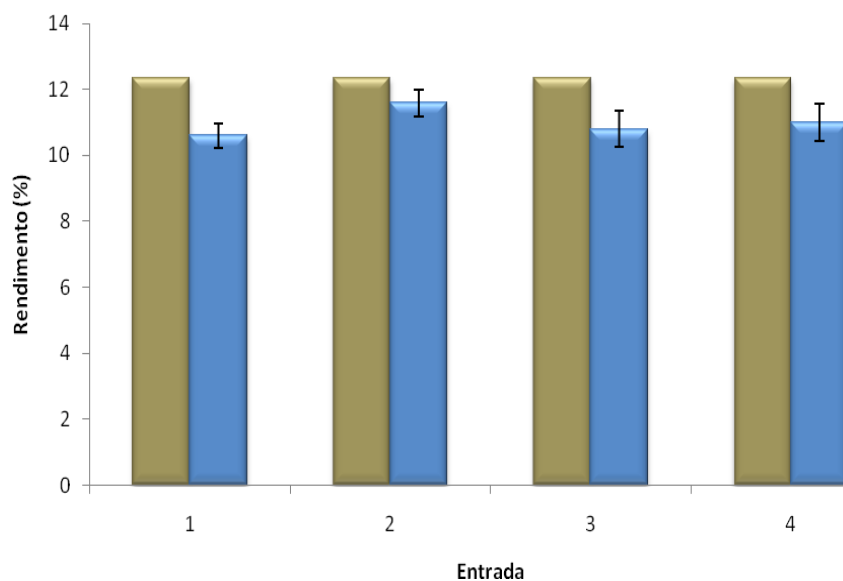
**Tabela 16.** Avaliação do efeito do álcool no rendimento de ésteres graxos produzidos por extração-transesterificação.

<b>Álcool</b>	<b>Rendimento médio (%)</b>
Etanol	7,45 A
Metanol	6,90 A

Médias com mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Duncan.

De acordo com o gráfico 1 (veja página 36), pelo processo de transesterificação *in situ* obteve-se os maiores rendimentos de ésteres e altas taxas de conversão, as quais foram calculadas a partir dos rendimentos médios de ésteres obtidos e do teor máximo de lipídeos extraídos da biomassa seca (12,34%, ver Tabela 11, página 31), obtido utilizando a mistura clorofórmio:metanol.

A conversão de lipídeos em ésteres produzidos a 60 °C foi de 89,8% e 98,2% quando a temperatura de reação foi de 100 °C, rendendo 10,6% e 11,6% de ésteres metílicos a partir da biomassa seca, respectivamente (**Entradas 1 e 2, Gráfico 3**). Com o uso de etanol as taxas de conversão foram de 85,9% e 93,9% a temperatura de 60°C e 100°C, rendendo 10,8% e 11,0% de ésteres etílicos, respectivamente.



**Gráfico 3.** Teor de lipídeo de *Chlorella sp.* extraído com clorofórmio:metanol (2:1 v/v) (barras em marrom) e rendimento de ésteres etílicos e metílicos obtidos pelo processo de transesterificação *in situ*.

No processo de transesterificação *in situ*, assim como no processo de extração-transesterificação, não houve diferença significativa nos rendimentos obtidos em relação ao tipo de álcool utilizado na reação (**Tabela 17**).

**Tabela 17.** Avaliação do efeito do álcool no rendimento de ésteres graxos produzidos pelo processo de transesterificação *in situ*.

Álcool	Rendimento médio (%)
Etanol	11,20 A
Metanol	10,91 A

Médias com mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Duncan.

A temperatura é uma variável que afeta o rendimento de formação de ésteres graxos, um exemplo do efeito da temperatura foi observado na butanólise do óleo de soja catalisada por ácido sulfúrico que foi completada em 3 horas a 117°C enquanto a 77°C foi necessário 20 horas para atingir rendimentos similares.<sup>22</sup>

Foi realizado também o estudo da variação da temperatura no processo de transesterificação *in situ* de *Chlorella sp.*, os rendimentos de ésteres metílicos e etílicos a temperatura de 60 °C e 100 °C são apresentados na Tabela 18.

**Tabela 18.** Avaliação do efeito da temperatura no rendimento de ésteres graxos produzidos pelo processo de transesterificação *in situ*.

Álcool	Temperatura (°C)	Rendimento médio (%)
Etanol	100	11,02 A
	60	10,80 A
Metanol	100	11,41 A
	60	10,70 A

Médias com mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Duncan.

Neste estudo não houve diferença significativa nos rendimentos obtidos a temperatura de 60 °C e 100 °C para ésteres metílicos e etílicos obtidos a partir da transesterificação *in situ* de *Chlorella sp.*

### 5.3 Caracterização dos ésteres graxos

#### 5.3.1 Teor de Ésteres

A resolução ANP nº7/2008<sup>50</sup> estabelece as especificação do biodiesel a ser comercializado pelos diversos agentes econômicos autorizados em todo o território nacional e, entre outros parâmetros, determina que o teor de ésteres no biodiesel seja de no mínimo 96,5% da massa do produto.

Após a purificação dos produtos por coluna cromatográfica filtrante foi determinado o teor de éster segundo a norma DIN EN 14103 que são apresentados na Tabela 19.

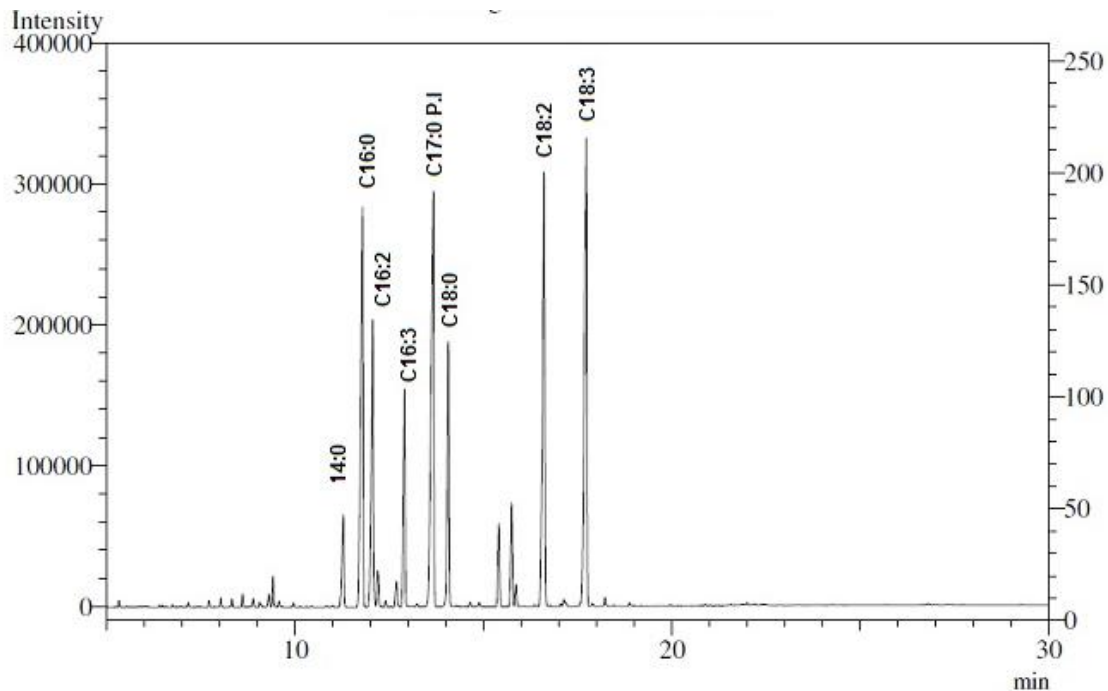
**Tabela 19.** Teor de ésteres metílicos e etílicos obtidos nos processos de transesterificação de *Chlorella sp.*

Entrada	Processo	Solvente	Álcool	Temperatura	Teor de éster
1		Clorofórmio:metanol	metanol	100°C	87,5%
2	Extração- transesterificação	metanol	metanol	100°C	83,7%
3		Clorofórmio:metanol	etanol	100°C	75,4%
4		etanol	etanol	100°C	96,4%
5		-	metanol	60°C	92,9%
6	<i>In situ</i>	-	metanol	100°C	86,8%
7		-	etanol	60°C	95,0%
8		-	etanol	100°C	99,8%

A análise mostrou que, pelos dois processos utilizados, apenas uma das amostras apresentou teor de ésteres exigido pela resolução ANP nº7/2008.

Os teores de ésteres obtidos neste trabalho variaram de 75,4% a 99,8% que, apesar de estarem abaixo do valor especificado pela resolução são altos comparados aos obtido por Johnson e Wen<sup>6</sup> a partir da microalga *Schizochytrium limacinum* (Tabelas 7 e 8).

A Figura 3 apresenta o cromatograma relativo à análise do teor de ésteres no produto obtido pelo processo de transesterificação *in situ* a temperatura de 60°C.



**Figura 3.** Cromatograma da análise do teor de ésteres metílicos obtidos pelo processo de transesterificação *in situ* a 60°C.

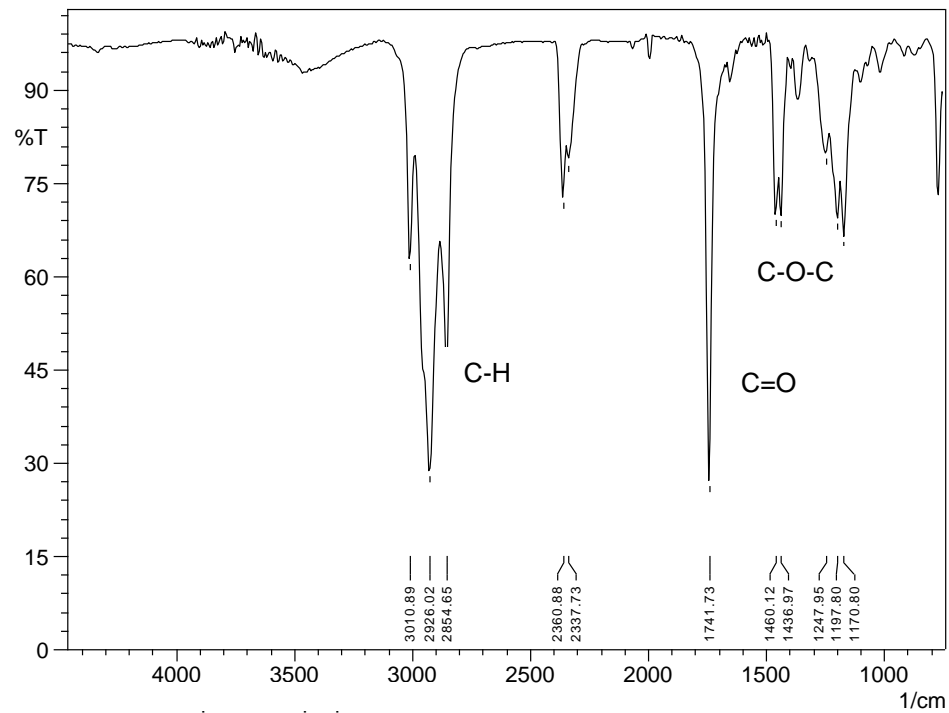
### 5.3.2 Espectrometria de infra-vermelho

Com objetivo de comprovar a presença dos ésteres metílico e etílicos nas amostras obtidas dos processos de extração-transesterificação e transesterificação *in situ*, através da identificação dos principais grupos funcionais, os produtos obtidos foram analisados por espectrometria de infra-vermelho.

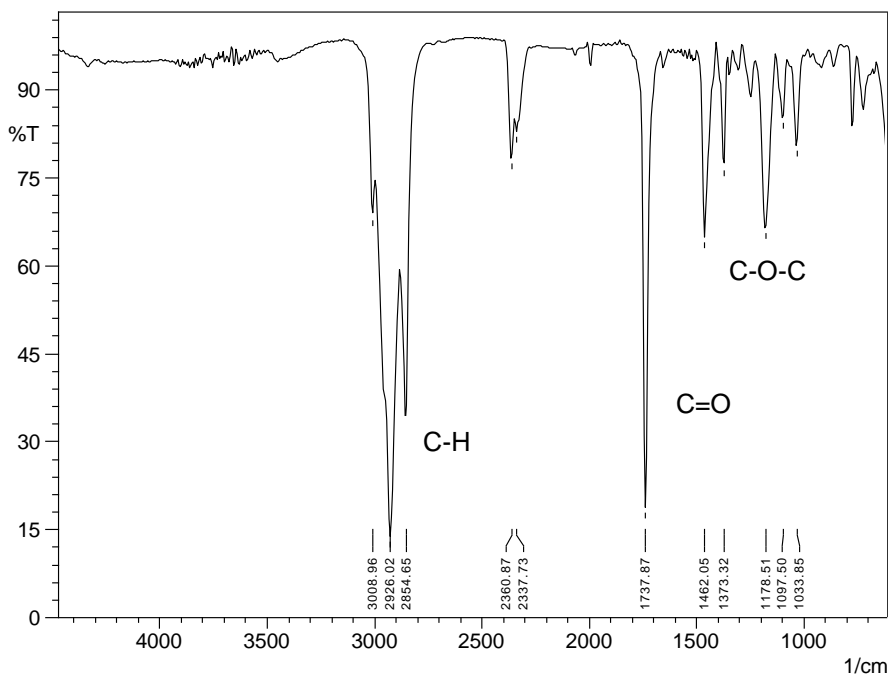
Através das análises foi possível identificar bandas típicas de carbonila de éster C=O em  $1741\text{ cm}^{-1}$  para éster metílico obtido pelo processo de extração-transesterificação (**Figura 4**) e  $1737\text{ cm}^{-1}$  para o éster etílico obtido pelo processo de transesterificação *in situ* a 100°C (**Figura 5**). Nos espectros analisados foram identificados também os estiramentos de C–O–C na faixa de  $1300 - 1000\text{ cm}^{-1}$  e os estiramentos de C–H nas regiões de  $2965 - 2850\text{ cm}^{-1}$ ,  $1450$  e  $700\text{ cm}^{-1}$ . Todas as



amostras analisadas de ésteres etílicos e metílicos obtidas pelos dois processos apresentaram a mesmas características espectroscópicas.



**Figura 4.** Espectro de Infravermelho do éster metílico de *Chlorella sp.* obtido a partir da extração lipídica com metanol.



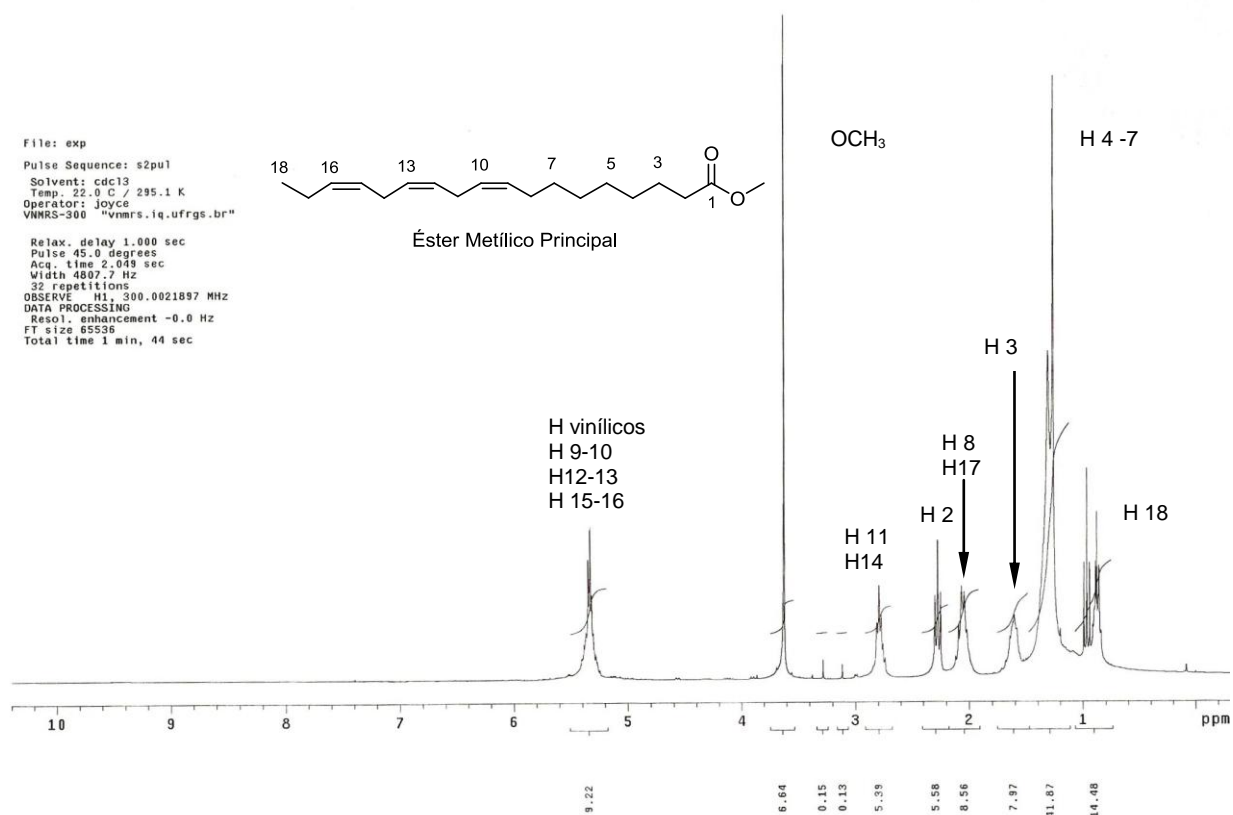
**Figura 5.** Espectro de Infravermelho do éster etílico de *Chlorella sp.* obtido pela transesterificação *in situ* a 100°C.

### 5.3.3 Ressonância Magnética Nuclear

A partir dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 6 e 7**) também foi possível confirmar a formação de ésteres metílicos e etílicos nas amostras obtidas dos processos de extração-transesterificação e transesterificação *in situ*. Na Figura 6 o sinal que comprova a formação de éster metílico é um singleto em 3,7 ppm característico de metoxila de éster. Já para ésteres etílicos (**Figura 7**) os sinais característicos encontram-se em 4,1 ppm na forma de um quarteto para os hidrogênios do grupo metilênico  $\text{CH}_2$   $\alpha$ -oxigênio e um triplete em 2,3 ppm referente aos três hidrogênios  $\text{CH}_3$ .

Os sinais que comprovam a formação dos ésteres metílicos e etílicos são diferentes dos esperados para os triacilglicerídeos que apresentam sinais em aproximadamente 5 ppm referente ao hidrogênio metínico (CH) e dois duplos dubletos em 4,4-4,2 ppm referente aos hidrogênios metilênicos ( $\text{CH}_2$ )<sup>51,52</sup> assim como os sinais esperados para ácidos graxos em aproximadamente 10 ppm característico de hidrogênio carboxílico.

Os demais sinais encontrados nos espectros (**Figuras 6 e 7**) são referentes a composição estrutural das cadeias graxas dos ésteres. Em 5,4 ppm observa-se um multipletto relativo aos hidrogênios vinílicos, um tripleto em 2,8 ppm referente aos hidrogênios bisalílicos, um tripleto em 2,3 ppm referente aos hidrogênios do CH<sub>2</sub>  $\alpha$ -carbonila, um multipletto em 2,1 ppm referentes aos hidrogênios alílicos e um multipletto em 1,6 ppm referente aos hidrogênios  $\beta$ -carbonila. O hidrogênios metilênicos foram observados em um multipletto em 1,3 ppm e em 0,8 ppm um multipletto referente CH<sub>3</sub> terminal da cadeia graxa.



**Figura 6.** Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H dos ésteres metílicos de *Chlorella* sp.

File: exp  
 Pulse Sequence: s2pu1  
 Solvent: cdcl3  
 Temp: 19.0 C / 292.1 K  
 Operator: Joyce  
 VNMR-300 "vnmr3.lq.ufrgs.br"  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Pulse 45.0 degrees  
 Acq. time 2.049 sec  
 Width 4807.7 Hz  
 32 repetitions  
 OBSERVE H1, 300.0022161 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Resol. enhancement -0.0 Hz  
 FT size 65536  
 Total time 1 min, 44 sec

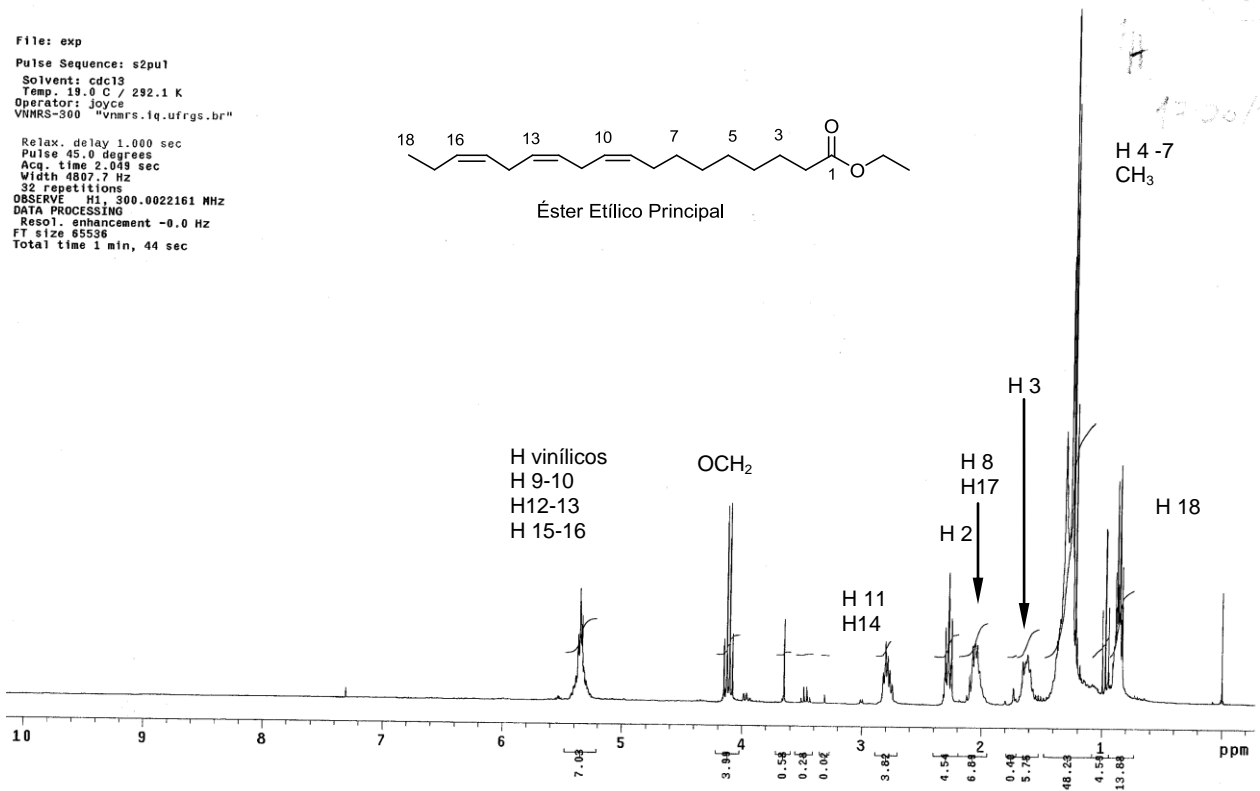


Figura 7. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H dos ésteres etílicos de *Chlorella* sp.

## 5.4 Caracterização dos co-produtos

### 5.4.1 Determinação de Proteína Bruta

A extração de lipídeos e a transesterificação *in situ* da biomassa para produção de biodiesel geram quantidades significativas de tortas, a composição desses resíduos depende das características da biomassa como teor de óleo, proteína, cinzas e dos processos utilizados como, extração por prensagem e por solvente e transesterificação direta da biomassa.<sup>53</sup>

A principal aplicação de tortas e farelos de oleaginosas são para a alimentação animal, fertilizantes orgânicos e ainda para produção de proteínas, enzimas, antibióticos, etanol, vitaminas e antioxidantes. Algumas tortas estão sendo utilizadas como matéria prima para produção de energia através da combustão, pirólise e produção de biogás<sup>48, 54</sup>.

Neste trabalho determinou-se o teor de proteínas e cinzas na biomassa de *Chlorella sp.*, na biomassa resultante do processo de extração de lipídeos e na biomassa residual da transesterificação *in situ*. Os teores de proteínas e cinzas são apresentados na Tabela 20 e são expressos em porcentagem em relação à massa seca.

**Tabela 20.** Teor de proteína bruta e cinzas na biomassa inicial e residual dos processos de extração de lipídeos e transesterificação *in situ* de *Chlorella sp.*

	<b>Solvente</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Proteína (%)</b>	<b>Cinzas (%)</b>
Biomassa	-	-	45,00	6,09
Torta da Extração	Clorofórmio:metanol	Ambiente	65,98	6,47
	Metanol	Ambiente	76,60	6,77
	Etanol	Ambiente	56,52	8,44
Torta do processo	Metanol	60°C	47,52	2,97
	Metanol	100°C	53,75	3,97
<i>In Situ</i>	Etanol	60°C	46,71	4,91

Os teores de cinzas na biomassa e nas tortas de *Chlorella sp.* variaram de 2,97% a 8,44%, as tortas da extração de lipídeos apresentaram maiores teores de cinzas 7,23% em média.

A biomassa de *Chlorella sp.* apresentou alto teor de proteína bruta, 45,5% em massa, após a extração de lipídeos por solvente o teor protéico foi em média 66,37%, já a biomassa residual do processo de transesterificação *in situ* apresentou menor teor de proteína 49,33% em média comparado a torta de extração de lipídeos.

Tortas de oleaginosas com potencial para produção de biodiesel no Brasil apresentam teores de proteína na faixa de 35% a 45%, a torta de soja, principal matéria prima para produção de biodiesel no país, apresenta de 42 a 47 % de proteína.<sup>53,54</sup>

Os teores de proteína bruta nas biomassas residuais de *Chlorella sp.* obtidas pelos dois processos apresentaram teores superiores a de outras matérias primas para produção de biodiesel no país, o que indica o potencial da utilização desses resíduos, porém estudos mais detalhados devem ser realizados antes do emprego na alimentação animal e na agricultura.

#### 5.4.2 Determinação de elementos por ICP-OES e ICP-MS

Foi determinada a concentração de 24 elementos na biomassa de *Chlorella sp.* e na torta da extração de lipídeos com clorofórmio:metanol.

Os elementos As, Pb, Co, Ni, Li, Mo, Ag, Be, Cd foram analisados por ICP-MS, K, Fe, Ba, Mg, Ca, Al, Na, S, P por ICP-OES, os elementos Mn, Sr, Ti, Zn, Cu e Cr foram determinados pelas duas técnicas, as concentrações de cada elemento são apresentadas na Tabela 21 e são expressas em ppm.

**Tabela 21.** Concentração de elementos na biomassa e torta de extração de lipídeos com clorofórmio:metanol de *Chlorella sp.* determinados por ICP-MS e ICP-OES expressas em ppm e ppb.

Analito	ICP-OES				ICP-MS			
	Biomassa		Torta		Biomassa		Torta	
	Média	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD
Mn	51,5	0,6	47,1	1,7	57,90	3,40	48,50	2,30
Sr	19,6	0,20	19,0	0,60	24,40	1,0	20,1	0,9
Ti	10,8	0,34	10,02	0,41	10,86	1,02	9,92	0,24
Zn	21,8	0,4	20,9	0,7	25,90	1,3	21,20	1,1
Cu	2,80	0,43	2,48	0,56	3,29	0,19	2,60	0,09
Cr	1,02	0,10	1,02	0,21	1,16	0,15	0,88	0,05
As	-	-	-	-	0,84	0,04	0,43	0,04
Pb	-	-	-	-	0,69	0,07	0,69	0,09
Co	-	-	-	-	0,25	0,02	0,20	0,01
Li	-	-	-	-	0,43	0,04	0,17	0,02
Ni	-	-	-	-	1,00	0,11	0,61	0,05
Mo	-	-	-	-	0,28	0,02	0,22	0,01
Ag*	-	-	-	-	2,6	0,4	2,4	0,4
Be*	-	-	-	-	11,8	1,8	10,3	1,2
Cd	-	-	-	-	39,0	1,5	29,6	1,8
P	13036	188	12052	498	-	-	-	-
S	6419	173	5937	240	-	-	-	-
Na	810	15,0	687	26,0	-	-	-	-
Al	122	4,00	112	3,00	-	-	-	-
Ca	2234	78,0	2199	81,0	-	-	-	-
Mg	2719	69,0	2562	123	-	-	-	-
Ba	35,30	0,1	34,3	1,0	-	-	-	-
Fe	514	5,0	478	16,0	-	-	-	-
K	8425	145	7628	274	-	-	-	-

- não determinado, \*Concentração expressa em ppb

A biomassa de *Chlorella sp.* apresentou concentração inferior a 1 ppm dos analitos Pb, Co, Mo, Ag e Be e a maior parte desta permaneceu na biomassa residual após a extração de lipídeos.

Os analitos As, Li e Ni apresentaram concentração menor ou igual a 1 ppm, porém, após a extração lipídica, as concentrações detectadas na torta da extração foram menores, a concentração de arsênio na biomassa foi de 0,84 ppm após a extração de lipídeos apenas 0,43 ppm permaneceu na biomassa, já a concentração de lítio foi reduzida de 0,43 ppm para 0,17 ppm.

O metal Cd apresentou concentração, 39,0 ppm na biomassa e 26,9 ppm após a extração de lipídeos.

A concentração dos analitos K, Fe, Ba, Mg, Ca, Al, Na, S, P foram determinadas por ICP-OES, dentre estes destacam-se os analitos de interesse para aplicações como substratos e fertilizantes orgânicos como potássio, fósforo, enxofre, cálcio, magnésio, os quais apresentaram altas concentrações na biomassa inicial e residual de *Chlorella sp.* (**Tabela 21**).

Na biomassa a concentração de sódio foi de 810 ppm e na biomassa residual 687 ppm, já a concentração de ferro foi de 514 ppm e 478 ppm na biomassa e na torta da extração de lipídeos respectivamente.

Os elementos Mn, Sr, Ti, Zn, Cu e Cr foram determinados pelas duas técnicas, para os analitos Cr, Cu e Ti não houve diferença nas concentrações determinadas pelas duas técnicas, já para Mn, Sr e Zn houve pequena diferença nas concentrações dos analitos na biomassa, esta diferença não foi observada na análise da biomassa residual.

A biomassa inicial e residual de *Chlorella sp.* apresentaram concentrações significativas de elementos de interesse para o cultivo de plantas o que indica o potencial da utilização do resíduo, porém estudos mais detalhados para a aplicação devem ser realizados.



## 6. CONCLUSÃO

Neste estudo foi realizada a extração de lipídeos a partir da biomassa seca de *Chlorella sp.* com clorofórmio:metanol (2:1 v/v), etanol e metanol, sendo que os maiores rendimentos foram obtidos com a mistura de clorofórmio:metanol como observado para outras microalgas em trabalhos anteriores desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa.

As frações lipídicas extraídas com diferentes solventes apresentaram altos índices de acidez, com a mistura clorofórmio:metanol obteve-se o menor índice, 39,39 mg KOH/g e o maior índice, 112,76 mg KOH/g, foi referente à fração extraída com hexano devido a menor polaridade do solvente extrator que o torna mais seletivo para ácidos graxos livres.

Apesar dos maiores rendimentos na extração de lipídeos com clorofórmio:metanol, a taxa de conversão de lipídeos em ésteres graxos foi de apenas 63,3%, o menor rendimento de lipídeos foi obtido com a utilização de etanol, porém a taxa de conversão desses lipídeos em ésteres etílicos foram quantitativos.

Pelo processo de transesterificação *in situ* obteve-se maiores rendimentos de ésteres graxos do que pelo processo de extração da fração lipídica seguido da transesterificação. Para os dois processos foi determinado o teor de ésteres dos produtos purificados, sendo obtido alto teor de ésteres que variou de 75,4% a 99,8%.

Nos dois processos para obtenção dos ésteres graxos de *Chlorella* não foi observada diferença significativa nos rendimentos utilizando metanol ou etanol como agente transesterificante. A temperatura de reação na transesterificação *in situ* de *Chlorella* não influenciou significativamente nos rendimentos de ésteres metílicos e etílicos.

Os teores de proteína bruta e cinzas foram determinados para a biomassa inicial e residual dos processos de extração e transesterificação *in situ*, assim como a concentração de 24 elementos na biomassa inicial e na torta da extração de lipídeos utilizando clorofórmio:metanol. Os resultados obtidos indicam o potencial da utilização dos resíduos dos processos que apresentaram altos teores de proteínas e altas concentrações de elementos de interesse para a agricultura.

## 7. REFERÊNCIAS

---

1. Ma, F.; Hanna, M.A. *Bioresource Technol* **1999**, *70*, 1-15.
2. Alcântara, R.; Amores, J.; Canoira, L.; Fidalgo, E.; Franco, M. J.; Navarro, A. *Biomass Bioenerg* **2000**, *18*, 515-527.
3. Marchetti, J. M.; Miguel, V. U.; Errazu, A. F. *Renew Sust Energ Rev* **2007**, *11*, 1300-1311.
4. Chisti, Y. *Biotechnol Adv* **2007**, *25*, 294-306.
5. Miao, X.; Wu, Q. *Bioresource Technol* **2006**, *97*, 841-846.
6. Johnson M. B.; Wen, Z. *Energ Fuel* **2009**, *23*, 5179.
7. Gioielli, L. A. *Rev bras Farmacogn* **1996**, *5*, 211-232.
8. Demirbas, A. *Energ Convers and Manage* **2009**, *50*, 14–34.
9. Sharma, Y. C.; Singh, B.; Upadnyay, S. N. *Fuel* **2008**, *87*, 2355-2373.
10. Rashid, U.; Anwar, F.; Moser, B.R.; Ashraf, S. *Biomass Bioenerg* **2008**, *32*, 1202-1205.
11. Sun, H.; Ding, Y.; Duan, J.; Zhang, Q.; Wang, Z.; Lou, H.; Zheng, X. *Bioresource Technol* **2010**, *101*, 953-958.

- 
12. Quintella, C. M.; Teixeira, L. S. G.; Korn, M. G. A.; Costa Neto, P. R.; Torres, E. A.; Castro, M. P.; Jesus, C. A. C. *Quim Nova* **2009**, *32*, 793-808.
  13. Zhang, Y.; Dubé, M.A.; Mclean, D.D.; Kates, M. *Bioresource Technol* **2003**, *89*, 1.
  14. Mbaraka, I. K.; Radu, D.R.; Lin, V.S.Y.; Shankas, B.H. *J Catal* **2003**, *219*, 329-336.
  15. Canakci, M.; Van Gerpen, J. *Trans. ASAE* **1999**, *42*, 1203-1210.
  16. Canakci, M.; Van Gerpen, J. *Trans. ASAE* **2001**, *44*, 1429-1436.
  17. Demirbas, A. *Energ Convers Manage* **2006**, *47*, 2271-2282.
  18. Zhang, J.; Jiang, L. *Bioresource Technol* **2008**, *99*, 8995-8998.
  19. Leung, D.Y.C.; Wu, X.; Leung, M.K.H. *Appl Energ* **2010**, 1083-1095.
  20. Fukuda, H.; Kondo, A.; Noda, H. *J. Biosci Bioeng* **2001**, *92*, 405–416.
  21. Schuchardt, U.; Sercheli, R.; Vargas, R.M. *J Braz Chem Soc* **1998**, *9*, 199-210.
  22. Freedman, B.; Butterfield, R.O.; Pryde, E.H. *J Am Oil Chem Soc* **1986**, *63*, 1375-1380.
  23. Georgogianni, K.G.; Kontominas, M.G.; Pomonis, P.J.; Avlontis, D.; Gergis, V. *Fuel Process Technol* **2008**, *89*, 503-509.
  24. Meneghetti, S.M.P.; Meneghetti, M.R.; Wolf, C.R.; Silva, E.C.; Lima, G.E.S.; De Lira Silva, L.; Serra, T.M.; Cauduro, F.; De Oliveira, L.G. *Energ Fuel* **2006**, *20*, 2262-2265.

- 
25. Sridharan, R., Mathai, I.M. *J Sci Ind Res* **1974**, *33*, 178-187.
26. Kulkarni, M.G.; Dalai, A.K.; Bakhshi, N.N. *Bioresource Technol* **2007**, *98*, 2027–2033.
27. Metting Jr, F. B. *J Ind Microbiol* **1996**, *17*, 477-489.
28. Li, Y; Horsman, M.; Wu, N.; Lan, C. Q.; Dubois-Calero, N. *Biotechnol Prog* **2008**, *24*, 815-820.
29. Mata, T. M.; Martins, A. A.; Caetano, N. S. *Renew Sust Energ Rev* **2010**, *14*, 217-232.
30. Spolaore, P; Joannis-Cassan, C.; Duran, E.; Isambert, A. *J. Biosci Bioeng* **2006**, *101*, 87-96.
31. Umdu, E. S., Tuncer, M., Seker, E. *Bioresource Technol* **2009**, *100*, 2828-2831.
32. Lee, D. H. *Bioresource Technol* **2011**, *102*, 43-49.
33. Wahlen, B. D.; Willis, R. M.; Seefeldt, L. C. *Bioresource Technol* **2011**, *102*, 2724-2730.
34. Griffiths, M. J.; van Hille, R. P.; Harrison, S. T. L. *Lipids* **2010**, *45*, 0153-1060.
35. Ehimen, E. A.; Sun, Z. F.; Carrington, C. G. *Fuel* **2010**, *89*, 677-684.
36. D'Oca, M. G. M.; Viêgas, C. V.; Lemões, J. S.; Miyasaki, E. K.; Villarreyes, J. A. M.; Primel, E. G.; Abreu, P. C. *Biomass Bioenerg* **2011**, *35*, 533-538.

- 
37. Zhu, M., Zhou, P. P., Yu, L. J. *Bioresource Technol* **2002**, *84*, 93-95.
38. Metcalfe, L. D.; Schmitz, A. A.; Pelka, J. R. *Anal Chem* **1966**, *38*, 514-515.
39. Kay, WB. *Ind Eng Chem* **1936**, *28*, 1014-1019.
40. SHIMADZU Nota de Aplicação nº1 – Controle de qualidade de biodiesel de acordo com a norma DIN EN 14103 – Determinação de Teor de ésteres.
41. Ribeiro Jr.; J. I. *Análise estatística no Excel*, Editora UFV: Viçosa, 2004, cap.7.
42. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Fundamentos de Química Analítica*, Cengage Learning: São Paulo, 2008, cap.7.
43. Meher, L. C.; Vidya Sagar, D.; Naik, S. N. *Renew Sust Energ Rev* **2006**, *10*, 248-268.
44. Petkov, G.; Garcia, G. *Biochemical Syst Ecol* **2007**, *35*, 281-285.
45. Moretto, E.; Fett, R.; *Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos*, Livraria Varela: São Paulo, 1998, cap.1.
46. Alonso, D. F.; Belarbi, E.; Rodriguez-Ruiz, J.; Segura, C. I.; Gimenez, A. *Phytochemistry* **1998**, *47*, 1473-1481.
47. Allard, B.; Templier, J. *Phytochemistry* **2001**, *57*, 459-467.
48. Bigogno, C.; Khozin-Goldberg, I.; Boussiba, S.; Vonshak, A.; Cohen, Z. *Phytochemistry* **2002**, *60*, 497-503.

- 
49. Lotero, E.; Liu, Y.; Lopez, D. E.; Suwannakarn, K.; Bruce, D. A.; Goodwin, J. G. *Ind Eng Chem Res* **2005**, *44*, 5353-5363.
50. Resolução ANP nº7, de 19/03/2008, *Diário Oficial da União*, 20/03/2008.
51. Samios, D.; Pedrotti, F.; Nicolau, A.; Reiznautt, Q. B.; Martini, D. D.; Dalcin, F.M. *Fuel Process Technol* **2009**, *90*, 599–605.
52. Soriano Jr., N. U.; Venditti, R.; Argyropoulos, D. S. *Fuel* **2009**, *88*, 560–565.
53. Kolesárová, N.; Hutnan, M.; Bodik, I.; Spalková, V. *J. Biomed Biotechnol* **2011**, 1-15.
54. Souza, A. D. V.; Fávaro, S. P.; Ítavo, L. C. V.; Roscoe, R. *Pesq Agropec Bras* **2009**, *10*, 1328-1335.