



FURG

Tese de Doutorado

**PRODUÇÃO DE ÉSTERES METÁLICOS A PARTIR DE
BIOMASSA ÚMIDA DE DIFERENTES ESPÉCIES DE
MICROALGAS UTILIZANDO PROCESSO DE
HIDRÓLISE-ESTERIFICAÇÃO EMPREGANDO
SOLVENTE DISPERSOR**

Renata Rodrigues de Moura

PPGQTA

Rio Grande, RS – Brasil

2017

**PRODUÇÃO DE ÉSTERES METÍLICOS A PARTIR DE
BIOMASSA ÚMIDA DE DIFERENTES ESPÉCIES DE
MICROALGAS UTILIZANDO PROCESSO DE HIDRÓLISE-
ESTERIFICAÇÃO EMPREGANDO SOLVENTE DISPERSOR**

por

RENATA RODRIGUES DE MOURA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (RS), como requisito parcial para obtenção do título de DOUTOR EM QUÍMICA.

PPGQTA

Rio Grande, RS – Brasil

2017

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 Defesa de Tese

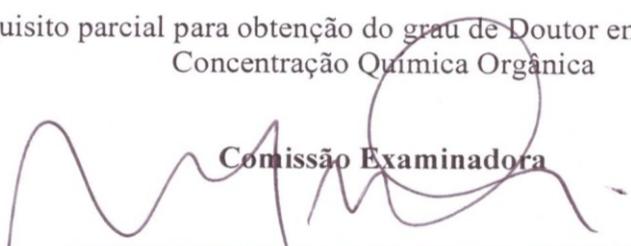
**PRODUÇÃO DE ÉSTERES METÁLICOS A PARTIR DE BIOMASSA
ÚMIDA DE DIFERENTES ESPÉCIES DE MICROALGAS
UTILIZANDO PROCESSO DE HIDRÓLISE-ESTERIFICAÇÃO
EMPREGANDO SOLVENTE DISPERSOR**

Elaborado por

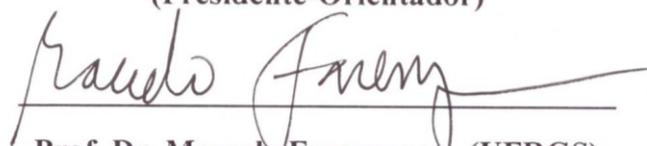
Renata Rodrigues de Moura

Como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química – Área de
Concentração Química Orgânica

Comissão Examinadora



Prof. Dr. Marcelo Gonçalves Montes D'Oca - (FURG)
(Presidente-Orientador)



Prof. Dr. Marcelo Farenzena - (UFRGS)



Prof. Dr. Rosana de Cássia De Souza Schneider - (UNISC)



Prof. Dr. Rosilene Maria Clementin - (FURG)



Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel - (FURG)

Rio Grande, 31 de julho de 2017

*“Se não puder se destacar pelo talento,
vença pelo esforço.”*

(Dave Weinbaum)

Dedico este trabalho à minha família,
principalmente aos meus pais, Neuza e Renato,
que não mediram esforços para que eu concluísse esta etapa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus** por estar viva, por ter colocado anjos em minha vida na forma de pais, irmãos, marido, familiares e amigos. Que me deram forças de diversas formas no decorrer do caminho até alcançar esta conquista.

A **FURG** e ao **PPGQTA** pela oportunidade de ter um ensino gratuito e de qualidade.

A **CAPES**, **FAPERGS** e **PETROBRAS** agradeço pelo apoio financeiro.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Gonçalves Montes D'Oca**, agradeço pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal, pela orientação, amizade e pelos inúmeros ensinamentos passados.

Ao **Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel**, sou muito grata por sua consideração e co-orientação, sempre com valiosas contribuições, tanto no decorrer destes 4 anos quanto no exame de qualificação e defesa da tese.

Aos professores **Dr^a. Rosilene**, **Dr^a. Rosana** e **Dr. Marcelo Farenzena** pela disponibilidade em compor a banca na defesa desta tese e pelas contribuições que enriqueceram este trabalho.

A **Rosane**, secretária do PPGQTA, sempre prestativa e disposta a ajudar.

Aos meus pais, **Neuza** e **Renato**, meus maiores incentivadores, pelos valores ensinados, amor, dedicação e força. Sem o apoio e cuidados de vocês eu não teria concluído este trabalho. Muito obrigada!

A minha irmã **Priscila** e primos **Patricia**, **Marcelo**, **Juliano**, **Ricardo** e **Leandro** pela forte presença mesmo que distantes, sempre me encorajando cada um ao seu modo, seja com um “Dale”, ou “tenho muito orgulho de ti” ou ainda “tô fazendo um churrasco para te esperar” e o unânime “tu é louca!”.

Ao **Diego**, pelo incentivo, força, companheirismo, cumplicidade, amor, infinita paciência e amizade. Essa vitória é nossa!

A minha família riograndina, **Irá**, **Homero**, **Lizi**, **Paulinha**, **Cae** e **Diego**, agradeço o carinho, o apoio, as orações e as moedinhas de queijo que motivaram a escrita desta tese.

Aos meus colegas do KOLBE pelos conhecimentos compartilhados, as discussões e os momentos de descontração. A **Mari** por florir meus cadernos e fazer

o chimarrão de cada manhã. A **Carol H.** sempre prestativa, me ensinou até estereoquímica. A **Tamara** pela parceria de muitos serões e verões. A **Caroline**, sempre empolgada, obrigada por me incentivar a ousar. A **Sabrina L.** obrigada por sua dedicação, responsabilidade e amizade.

A minha amiga **Dr^a. Tatiana** foram tantos momentos compartilhados, tantos ensinamentos passados, me faltam palavras para agradecê-la!

Aos meus colegas do LACOM aos quais eu convivia esporadicamente e mesmo assim sempre fizeram eu me sentir acolhida. Muito obrigada a todos!

A **Liziane**, sou muito grata por sua amizade e por sempre se fazer presente.

A **Sergi**, pelos inúmeros conhecimentos compartilhados, a paciência sempre prestativa, consideração e amizade. Muito obrigada!

A **Maris**, minha colega de mestrado e doutorado, foram muitos momentos compartilhados. Obrigada pelo coleguismo e amizade.

A **Elisane**, colega de doutorado, sempre querida e divertida, muito obrigada pela amizade e por me ensinar planejamento experimental.

A **Adri**, mesmo distante sempre presente me ouvindo, incentivando e auxiliando.

Aos meus amigos de anos, **Cacá, Gabe, Turra e Morel**, meus companheiros de madrugadas, sempre dispostos a me ouvirem e incentivarem “falta pouco” ou “vamos, só mais um pouco”.

E por fim, mas não menos importante, agradeço a minha filha **Isabela** por trabalhar com a mamãe até nascer e me ensinar o que é realmente ter força e perseverança. Tu foste o maior e melhor resultado deste doutorado, “nossa inovação”.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO

Artigos publicados:

- 1) LEMÕES, JULIANA S.; ALVES SOBRINHO, RUI C.M.; FARIAS, SABRINA P.; **DE MOURA, RENATA R.**; PRIMEL, EDNEI G.; ABREU, PAULO C.; MARTINS, AYRTON F.; MONTES D'OCA, MARCELO G. Sustainable production of biodiesel from microalgae by direct transesterification. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, v. 3, p. 33-38, **2016**.
- 2) ALVES SOBRINHO, RUI C. M.; VAUCHINSKI, LAÉRCIO; **DE MOURA, RENATA RODRIGUES**; PRIMEL, EDNEI G.; ABREU, PAULO C. V.; MONTES D'OCA, MARCELO G. FAME Production and Fatty Acid Profiles from Moist *Chlorella sp.* and *Nannochloropsis oculata* Biomass. *Journal of the American Oil Chemists' Society* ^{JCR}, v. 92, p. 423-430, **2015**.
- 3) **DE MOURA, RENATA RODRIGUES**; DIAS, ADRIANA NEVES; DE FREITAS GRANJÃO, VINÍCIUS; PRIMEL, EDNEI GILBERTO; D'OCA, MARCELO GONÇALVES MONTES. Determination of Acylglycerols and Glycerol in Castor:Soybean Biodiesel Blend Produced by a Base/Acid-Catalyzed Process. *Journal of the American Oil Chemists' Society (Online)*, v. 92, p. 1555-1565, **2015**.

Participação em eventos:

- 1) Green & Sustainable Chemistry Conference, **2016**, Berlim – Alemanha.
- 2) XXI SBQ-SUL, **2014**, Maringá-PR.
- 3) 13ª Mostra da Produção Universitária, Universidade Federal do Rio Grande, **2014**, Rio Grande-RS.

Resumos em congressos:

- 1) **MOURA, R. R.**; LUTKE, S. F.; MARTINS, T. G.; PRIMEL, E. G.; ABREU, PAULO C. V.; MARTINS, A. F.; D'OCA, M. G. M. FAME production from microalgae biomass cultivated using inexpensive commercial fertilizers. In: Green & Sustainable Chemistry Conference, **2016**, Berlim – Alemanha.
- 2) **MOURA, R. R.**; DIAS, A. N.; GRANJAO, V. F.; PRIMEL, E. G.; D'OCA, M. G. M. Determination of acylglycerols, free and total glycerol in

castor:soybean biodiesel blend produced by transesterification process. In: Green & Sustainable Chemistry, **2016**, Berlim – Alemanha.

- 3) ETGES, B. J. ; **DE MOURA, R. R.**; MARTINS, T. G.; PRIMEL, E. G.; D'OCA, M. G. M. Estudo do potencial de microalgas cultivadas com fertilizante comercial para produção de biodiesel. In: XXIII Encontro de Química da Região Sul, **2016**, Santa Maria-RS.
- 4) LUTKE, S. F.; **MOURA, R. R.**; MARTINS, T. G.; RAUPP, S.; D'OCA, M. G. M. Determinação do teor de lipídeos e perfil graxo da microalga *Nannochloropsis oculata* em meio de cultivo com e sem vitaminas. In: 14^a Mostra de Produção Universitária, **2015**, Rio Grande-RS
- 5) **MOURA, R. R.**; LUTKE, S. F.; MARTINS, T. G.; PRIMEL, E. G.; D'OCA, M. G. M. Determinação por GC-FID de glicerídeos, glicerol livre e total em ésteres metílicos de ácidos graxos da microalga *Chlorella sp.* In: 13^a Mostra da Produção Universitária, **2014**, Rio Grande-RS.
- 6) MARTINS, T. G.; **MOURA, R. R.**; LUTKE, S. F.; ABREU, P. C.; WASIELESKY JR., W. ; D'OCA, M. G. M. Avaliação do crescimento de *Chaetoceros gracilis* em meio fertilizante visando à produção de biodiesel. In: Simpósio Estadual de Agroenergia e V Reunião Técnica de Agroenergia - RS, **2014**, Pelotas-RS
- 7) LUTKE, S. F.; **MOURA, R. R.**; D'OCA, M. G. M. Otimização da reação de esterificação de ácidos graxos da microalga *Chlorella sp.* In: 13^a Mostra da Produção Universitária, **2014**, Rio Grande-RS.
- 8) **MOURA, R. R.**; LUTKE, S. F.; MARTINS, T. G.; PRIMEL, E. G.; D'OCA, M. G. M. Estudo do processo de hidrólise-esterificação de lipídeos a partir de biomassa úmida de *Chlorella sp.* In: XXI SBQ-SUL, **2014**, Maringá-PR.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XV
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XVI
RESUMO	XIX
ABSTRACT	XX
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo geral.....	4
2.2. Objetivos específicos	4
3. REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1. Microalgas	5
3.1.1. <i>Amphora coffeaeformis</i>	6
3.1.2. <i>Chaetoceros gracilis</i>	7
3.1.3. <i>Chlorella sp.</i>	8
3.1.4. <i>Isochrysis galbana</i>	8
3.2. Cultivo de microalgas	10
3.3. Biodiesel de microalgas	11
3.4. Métodos de produção de biodiesel	13
3.4.1. <i>Produção de biodiesel a partir de biomassa seca de microalgas</i>	13
3.4.2. <i>Extração de lipídeos a partir de biomassa úmida de microalgas</i>	15
3.4.3. <i>Transesterificação a partir da biomassa úmida de microalgas</i>	16
3.4.4. <i>Hidrólise-esterificação em biomassa umidificada de microalgas</i>	19
3.5. Acetona: solvente dispersor	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1. Equipamentos	24
4.2. Materiais e vidrarias	24
4.3. Reagentes e solventes	24
4.4. Padrões analíticos	25
4.5. Matéria-prima	25
4.6. Procedimento Experimental	25
4.6.1. <i>Cultivo e colheita das microalgas</i>	25
4.6.2. <i>Extração e determinação do teor de lipídeos</i>	28
4.6.3. <i>Determinação do perfil de ácidos graxos derivados das microalgas</i>	28
4.6.4. <i>Método de micro-ondas para extração de lipídeos</i>	29

4.6.5. Análise de dados.....	30
4.6.6. Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV	30
4.6.7. Hidrólise-Esterificação.....	30
4.6.7.1. Hidrólise da biomassa umidificada	30
4.6.7.2. Reação de esterificação	31
4.6.7.3. Hidrólise da biomassa úmida.....	31
4.6.7.4. Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para núcleos ^1H e ^{13}C	32
4.6.8. Transesterificação do extrato lipídico.....	32
4.6.9. Transesterificação “in situ”	32
4.6.10. Conversão de FAMES	33
4.7. Resumo dos processos para produção de FAMES derivado de microalgas empregados neste trabalho	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1. Cultivo de microalgas.....	35
5.1.1. Determinação do teor de lipídeos e perfil de ácidos graxos	38
5.2. Desenvolvimento do método de micro-ondas para extração de lipídeos de biomassa úmida	41
5.2.1. Delineamento composto central 2^2	41
5.3. Estudo do processo de Hidrólise-Esterificação.....	51
5.3.1. Otimização do processo de Hidrólise-Esterificação empregando biomassa algácea úmida	53
5.3.2. Aplicação do processo de hidrólise-esterificação a biomassa úmida das microalgas cultivadas e comparação com os processos convencional, por micro-ondas e transesterificação “in situ”	60
5.3.3. Perfil cromatográfico dos FAMES derivados dos ácidos graxos de microalgas obtidos por hidrólise-esterificação	67
5.3.4. Caracterização por RMN dos FAMES derivados dos ácidos graxos de microalgas obtidos por hidrólise-esterificação	67
6. CONCLUSÕES	69
7. TRATAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS	71
8. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	72
9. APÊNDICE	73
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biossíntese dos ácidos graxos	6
Figura 2. Cultivo de <i>Amphora coffeaeformis</i>	7
Figura 3. Células de <i>Chaetoceros gracilis</i>	7
Figura 4. Células de <i>Chlorella sp.</i>	8
Figura 5. Células de <i>Isochrysis galbana</i>	9
Figura 6. Células de <i>Nannochloropsis oculata</i>	9
Figura 9. Processos empregados para produção de FAMES de microalgas	34
Figura 10. Densidade celular do cultivo de <i>N. oculata</i> ($\times 10^6$ cel L ⁻¹) em meio fertilizante.....	36
Figura 11. Densidade celular do cultivo de <i>A. coffeaeformis</i> ($\times 10^6$ cel L ⁻¹) em meio fertilizante.....	36
Figura 12. Densidade celular do cultivo de <i>C. gracilis</i> ($\times 10^6$ cel L ⁻¹) em meio fertilizante.....	37
Figura 13. Densidade celular do cultivo de <i>I. galbana</i> ($\times 10^6$ cel L ⁻¹) em meio fertilizante.....	37
Figura 14. Microalga <i>A. coffeaeformis</i> : a) biomassa sem centrifugar; b) primeira centrifugação; c) biomassa com 50% de umidade (m/m).....	38
Figura 15. Microalga <i>C. gracilis</i> : a) biomassa sem centrifugar; b) primeira centrifugação; c) biomassa com 50% de umidade (m/m).....	38
Figura 16. Microalga <i>I. galbana</i> : a) biomassa sem centrifugar; b) primeira centrifugação; c) biomassa com 50% de umidade (m/m).....	38
Figura 17. Estimativas dos efeitos do tempo e da temperatura na extração lipídica. Efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) para a extração lipídica; *Interação entre as variáveis.	43
Figura 18. Imagens MEV da biomassa de <i>N. oculata</i> : A) biomassa seca, B) resíduo de biomassa após extração por ultrassom, C) resíduo de biomassa após extração por micro-ondas	47
Figura 19. Reação de esterificação e concorrente hidrólise do ácido sulfâmico	52
Figura 20. Microalga <i>N. oculata</i> : a) pasta com 50% de umidade (m/m); b) pasta sem dissolver após 4 h de hidrólise; c) pasta retirada da reação de hidrólise	53

Figura 21. Estimativas dos efeitos da acetona, catalisador e tempo na hidrólise da biomassa algácea úmida. Efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$)	55
Figura 22. Superfície de resposta acetona x H_2SO_4	56
Figura 23. Microalga <i>N. oculata</i> : a) pasta com 50% de umidade (m/m); b) pasta dispersa em acetona; c) pasta+acetona+hexano=meio homogêneo.	58
Figura 24. CCD's das reações de hidrólise (representadas por H) e esterificação (representadas por E). Placa 5 apresenta a condição de hidrólise de 5 mL de acetona, 10 mL de hexano e 10% de H_2SO_4 , placa 7 condição de hidrólise de 5 mL de acetona, 10 mL de hexano e 30% de H_2SO_4	58
Figura 25. Processo otimizado de hidrólise-esterificação para biomassa úmida de microalgas	59
Figura 26. Representação das etapas da transesterificação ácida com metanol.....	62
Figura 27. Gráfico das conversões em FAMES derivados de microalgas a partir de diferentes processos de produção	63
Figura 28. Perfil cromatográfico dos ésteres metílicos derivados dos ácidos graxos da microalga <i>A. coffeaeformis</i>	74
Figura 29. Perfil cromatográfico dos ésteres metílicos derivados dos ácidos graxos da microalga <i>C. gracilis</i>	75
Figura 30. Perfil cromatográfico dos ésteres metílicos derivados dos ácidos graxos da microalga <i>I. galbana</i>	76
Figura 31. Perfil cromatográfico dos ésteres metílicos derivados dos ácidos graxos da microalga <i>N. oculata</i>	77
Figura 32. RMN ¹ H ($CDCl_3$, 400MHz) dos FAMES derivado da microalga <i>N. oculata</i>	78
Figura 33. RMN ¹³ C ($CDCl_3$, 100MHz) dos FAMES derivados da microalga <i>N. oculata</i>	78
Figura 34. RMN HSQC ($CDCl_3$,400/100MHz) dos FAMES derivados da microalga <i>N. oculata</i>	79
Figura 35. RMN ¹ H ($CDCl_3$, 400MHz) dos FAMES derivados da microalga <i>A. coffeaeformis</i>	80
Figura 36. RMN ¹³ C ($CDCl_3$, 100MHz) dos FAMES derivados da microalga <i>A. coffeaeformis</i>	80
Figura 37. RMN HSQC ($CDCl_3$,400/100MHz) dos FAMES derivados da microalga <i>A. coffeaeformis</i>	81

Figura 38. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400MHz) dos FAMEs derivados da microalga <i>C. gracilis</i>	82
Figura 39. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100MHz) dos FAMEs derivados da microalga <i>C. gracilis</i>	82
Figura 40. RMN HSQC (CDCl ₃ ,400/100MHz) dos FAMEs derivados da microalga <i>C. gracilis</i>	83
Figura 41. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400MHz) dos FAMEs derivados da microalga <i>I. galbana</i>	84
Figura 42. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100MHz) dos FAMEs derivados da microalga <i>I. galbana</i>	84
Figura 43. RMN HSQC (CDCl ₃ ,400/100MHz) dos FAMEs derivados da microalga <i>I. galbana</i>	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Trabalhos empregando diferentes métodos para produção de biodiesel a partir de biomassa algácea seca.....	14
Tabela 2. Perfil dos ésteres metílicos de ácidos graxos (%) obtidos a partir da microalga <i>Nannochloropsis oculata</i> por hidrólise-esterificação e processo <i>in situ</i>	21
Tabela 3. Perfil graxo das microalgas cultivadas neste trabalho usando fertilizante comercial.....	40
Tabela 4. Matriz do delineamento composto central 2 ² com valores codificados, os valores reais (entre parênteses) e respectivos rendimentos.	42
Tabela 5. Perfil de ácidos graxos (%) da fração lipídica da microalga <i>N. oculata</i> extraído pelos métodos micro-ondas (em diferentes condições) e por ultrassom.....	44
Tabela 6. Rendimento de lipídeos de <i>N. oculata</i> extraídos, médias com desvio padrão e teste de Tukey.....	46
Tabela 7. Aplicação do método por micro-ondas para a extração de lipídeos da biomassa úmida de microalgas. Rendimento de lipídeos extraídos, médias com desvio padrão e teste de Tukey	49
Tabela 8. Perfil de ácidos graxos (%) das microalgas <i>A. coffeaeformis</i> , <i>C. gracilis</i> e <i>I. galbana</i> pelos métodos de extração de micro-ondas e ultrassom.....	50
Tabela 9. Rendimentos e teores de ésteres obtidos a partir das reações de esterificação com diferentes catalisadores, temperaturas e tempos de reação	52
Tabela 10. Matriz do delineamento composto central 2 ³ com valores codificados, valores reais (entre parênteses), rendimentos e teor de ésteres.	54
Tabela 11. Análise de variância para o rendimento em ésteres	56
Tabela 12. Resultados das replicas das condições 5 e 7, rendimento, médias com desvio padrão e teste de Tukey.	57
Tabela 13. Resultados das reações de hidrólise-esterificação a partir da biomassa úmida das microalgas <i>A. coffeaeformis</i> , <i>C. gracilis</i> e <i>I. galbana</i>	60
Tabela 14. Comparação entre os rendimentos (%) de ésteres metílicos empregando diferentes métodos de produção de ésteres de microalgas	62
Tabela 15. Perfil de ácidos graxos das microalgas <i>A. coffeaeformis</i> , <i>C. gracilis</i> , <i>I. galbana</i> e <i>N. oculata</i> após o processo de hidrólise-esterificação.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ , letra grega delta (minúsculo), representa a escala (ppm) em espectros de RMN

ACP, proteína carreadora de acila, do inglês *acyl carrier protein*

AG, ácido graxo

ASTM, Sociedade Americana de Testes e Materiais, do inglês *American Society for Testing and Materials*

BFT, sistema de biofloco, do inglês *Biofloc Technology*

CCD, cromatografia em camada delgada

CDCl_3 , clorofórmio deuterado

cel L^{-1} , células por litro

CN, número de cetano, do inglês *cetane number*

CoA, coenzima A

D, Debye (medida de momento dipolar)

DHA, ácido docosahexaenóico, do inglês *Docosahexaenoic acid*

EI, ionização por Impacto de Elétrons, do inglês *electrons impact*

EMA, Estação Marinha de Aqüicultura

E (MW)-T, extração (por micro-ondas)-transesterificação

EN, Norma Européia, do inglês *European Norm*

EPA, ácido eicosapentaenóico, do inglês *Eicosapentaenoic acid*

E (US)-T, extração (por ultrassom)-transesterificação

eV, elétron-Volt

FAAEs, ésteres alquílicos de ácidos graxos, do inglês *fatty acids alkyl esters*

FAEEs, ésteres etílicos de ácidos graxos, do inglês *fatty acid ethyl esters*

FAMEs, ésteres metílicos de ácidos graxos, do inglês *fatty acids methyl esters*

FFA, ácido graxo livre, do inglês *free fatty acid*

g/g, grama por grama

GC-FID, cromatografia gasosa com detector por ionização em chama, do inglês *gas chromatography with flame ionization detector*

GC-MS, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, do inglês *gas chromatography with mass spectrometry detector*

h, hora

H-E, hidrólise-esterificação

HSQC, Coerência Heteronuclear de Simples Quantum, do inglês *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

Hz, hertz

J, constante de acoplamento

LCA, avaliação do ciclo de vida, do inglês *Life-Cycle Assessment*

LC-PUFA, ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, do inglês *long chain polyunsaturated fatty acids*

kJ, quilojoule

M, mol/L

MEV, microscopia eletrônica de varredura

MHz, mega hertz

min, minutos

MJ/L, megajoule por litro

m/m, massa por massa

mg/mg, miligrama por miligrama

NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

PEG, Polietilenoglicol

pH, potencial hidrogeniônico

ppm, partes por milhão

PSU, unidade de salinidade prática, do inglês *Practical Salinity Unit*

RMN, Ressonância Magnética Nuclear

RMN de ^{13}C , Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

RMN de ^1H , Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

SHE, hidrólise-esterificação simultânea, do inglês *simultaneous hydrolysis-esterification*

T *“in situ”*, transesterificação *“in situ”*

TBHQ, terc-butil-hidroquinona

TG, triacilgliceróis

TMS, tetrametilsilano

v/v, volume por volume

W, watts

RESUMO

Título: PRODUÇÃO DE ÉSTERES METÁLICOS A PARTIR DE BIOMASSA ÚMIDA DE DIFERENTES ESPÉCIES DE MICROALGAS UTILIZANDO PROCESSO DE HIDRÓLISE-ESTERIFICAÇÃO EMPREGANDO SOLVENTE DISPERSOR

Autor: Renata Rodrigues de Moura

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

O uso de biomassa algácea para produção de biodiesel tem sido investigado, uma vez que essa matéria-prima apresenta elevado rendimento de óleo quando comparado com oleaginosas convencionais. Todavia, para viabilizar a produção comercial de biodiesel a partir de microalgas é necessária a pesquisa e o desenvolvimento de métodos efetivos de produção empregando a biomassa úmida de microalgas, evitando a secagem desta. Dentro desse contexto, o objetivo do presente trabalho foi usar a biomassa algácea úmida no processo de hidrólise-esterificação *“in situ”* para produção de ésteres graxos de microalgas. Também foi desenvolvido um método rápido, fácil e eficiente de extração de lipídeos de biomassa úmida de microalgas assistido por micro-ondas.

Inicialmente, para o desenvolvimento do método de extração foi empregada biomassa umidificada de *Nannochloropsis oculata*, para obter a melhor condição de extração foi aplicado um delineamento composto central 2², a melhor condição foi 1 min de irradiação de micro-ondas a 80 °C. Em seguida, o método foi aplicado à biomassa úmida das microalgas *Amphora coffeaeformis*, *Chaetoceros gracilis* e *Isochrysis galbana*, cultivadas em meio fertilizante, obtendo os respectivos rendimentos de lipídeos de 16,27±1,5, 22,31±2,5 e 19,87 ±2,4 %. O teor de lipídeos e o perfil graxo das frações lipídicas extraídas utilizando micro-ondas foi muito semelhante ao perfil das frações extraídas pelo método convencional que utiliza ultrassom, mostrando a eficiência do método.

Para investigar a produção *“in situ”* de ésteres utilizando biomassa úmida das microalgas *N. oculata*, *A. coffeaeformis*, *C. gracilis* e *I. galbana* foi realizada a hidrólise-esterificação na presença de um solvente dispersor acetona. Para obter a melhor condição de hidrólise foi aplicado um delineamento composto central 2³, a condição ideal de hidrólise foi 5 mL de acetona (solvente dispersor), 10 mL hexano (solvente extrator), 10% H₂SO₄ a 100 °C em refluxo por 4 h. Já a melhor condição de esterificação foi utilizando a razão molar metanol: ácido graxo (30:1), 10% H₂SO₄ a 100 °C em refluxo por 1 h. De forma inédita o processo de hidrólise-esterificação utilizando acetona como solvente dispersor foi aplicado com êxito à biomassa úmida de diferentes microalgas com paredes celulares distintas alcançando rendimentos superiores a 85%. Além disso, quando comparado com os processos de extração-transesterificação e transesterificação *“in situ”* o processo de hidrólise-esterificação na presença do solvente dispersor apresentou rendimentos e conversão de FAMES superiores aos demais métodos.

Palavras-chaves: biomassa úmida, extração, hidrólise-esterificação, microalgas, micro-ondas, solvente dispersor

ABSTRACT

Title: METHYL ESTERS PRODUCTION AS OF WET BIOMASS OF DIFFERENT MICROALGAE SPECIES EMPLOYING HYDROLYSIS-ESTERIFICATION PROCESS USING DISPERSER SOLVENT

Author: Renata Rodrigues de Moura, M.Sc.

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

The use of algal biomass for biodiesel production has been investigated, since this raw material presents high oil yield when compared to conventional oilseeds. However, to enable the commercial production of biodiesel from microalgae is necessary to research and development of effective production methods employing the wet biomass of microalgae, avoiding drying it. In this context, the objective of the present work was to use the wet algal biomass in the process "in situ" hydrolysis-esterification for the production of fatty esters of microalgae. It was also developed a fast, easy and efficient extraction of wet biomass of microalgae lipid assisted by microwave.

Initially, for the development of the extraction method was used humidified biomass of *Nannochloropsis oculata*, to obtain the best extraction condition was applied a central compound design 2^2 , the best condition was 1 min of microwave irradiation at 80 °C. Then, the method was applied to the wet biomass of the microalgae *Amphora coffeaeformis*, *Chaetoceros gracilis* and *Isochrysis galbana*, cultivated in fertilizer medium, obtaining the respective lipid yields of 16.27 ± 1.5 , 22.31 ± 2.5 and $19.87 \pm 2.4\%$. The lipid content and fatty lipid profile fractions extracted using microwave was very similar to the profile of the fractions extracted by the conventional method using ultrasound, showing its efficacy.

To investigate the "in situ" production of esters using wet biomass of the microalgae *N. oculata*, *A. coffeaeformis*, *C. gracilis* and *I. galbana* hydrolysis-esterification was performed in the presence of a dispersing solvent acetone. To obtain the best hydrolysis condition a central composite 2^3 design was applied, the ideal hydrolysis condition was 5 mL of acetone (dispersing solvent), 10 mL hexane (extractive solvent), 10% H_2SO_4 at 100 ° C at reflux for 4 h. The best esterification condition was the molar ratio methanol: fatty acid (30: 1), 10% H_2SO_4 at 100 ° C at reflux for 1 h. In an unprecedented way the hydrolysis-esterification process using acetone as a dispersing solvent was successfully applied to the wet biomass of different microalgae with distinct cell walls achieving yields greater than 85%. In addition, when compared to the in extraction-transesterification and transesterification "in situ" processes, the hydrolysis-esterification process in the presence of the dispersing solvent showed higher yields and FAME conversion than the other methods.

Keywords: dispersing solvent, extraction, hydrolysis-esterification, microalgae, microwave, wet biomass

1. INTRODUÇÃO

As microalgas são uma alternativa promissora e uma fonte de matéria-prima renovável para os biocombustíveis devido à sua alta eficiência fotossintética e ciclo de desenvolvimento curto.^{1,2} Além disso, uma vez que o cultivo de microalgas não precisa de terras aráveis, este pode ser realizado sem competir com alimentos ou culturas forrageiras, sendo o combustível derivado deste um biocombustível de "terceira geração".³

O cultivo de microalgas pode ser realizado em sistemas abertos ou fechados na presença de nutrientes e iluminação solar ou artificial. O rendimento máximo, a taxa de crescimento e a composição das microalgas podem ser otimizados de acordo com as condições de cultivo, tais como temperatura, pH, intensidade de luz e concentração de nutrientes.⁴ Um dos principais problemas relativos à produção de biomassa algácea em larga escala é o custo do meio de cultura.⁵ Na Estação Marinha de Aqüicultura da Universidade Federal de Rio Grande (EMA-FURG) vem sendo aplicado com sucesso a combinação de água do mar e fertilizante comercial de baixo custo no cultivo em média escala de microalgas marinhas. Os fertilizantes agrícolas constituem um mercado gigantesco no Brasil, de forma que sua produção é muito elevada, acarretando preços finais relativamente baixos, viabilizando o cultivo de microalgas.⁵

As microalgas apresentam elevada produção de biomassa e alto teor lipídico, variando de 20 a 50% de lipídeos em relação à biomassa seca, matéria-prima para síntese de biodiesel.^{1,6} Na maioria das microalgas estes lipídeos encontram-se no interior das células que estão envolvidas por uma parede celular composta de uma ampla variedade de substâncias tais como celulose, quitina, mureína (peptidoglicano), proteína, sílica e CaCO_3 .⁷ Isto implica que, dependendo da natureza da parede da célula, haverá a necessidade do estudo de métodos a serem aplicados para quebrar a parede celular antes e/ou simultaneamente a extração com solventes.^{7,8} Portanto, métodos rápidos e eficientes para extração de lipídeos, preferencialmente a partir de biomassa úmida de microalgas, não são importantes somente como pré-tratamento para produção de biodiesel mas também são uma

ferramenta fundamental para investigar o potencial lipídico de microalgas pois a grande diversidade de espécies de microalgas existentes é um desafio que dificulta a escolha destas para a produção de biodiesel, pois cada espécie possui um teor de lipídeos e uma composição química diferente.

O biodiesel é definido como uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos (FAAEs, *Fatty Acids Alkyl Esters*). O metanol tem sido o álcool comumente usado para produzir biodiesel, devido sua viabilidade econômica, deste modo, o biodiesel é freqüentemente denominado como uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMEs, *Fatty Acids Methyl Esters*).^{1,9} A composição do biodiesel varia de acordo com os ácidos graxos que as compõe, no biodiesel de microalgas há presença de ácidos graxos poliinsaturados em sua composição que podem não ser tão adequada para a produção de biodiesel em comparação com os óleos vegetais convencionais.¹⁰ No entanto, há relatos de que o óleo de microalgas foi transformado com sucesso em gasolina, diesel e querosene sendo indistinguíveis dos combustíveis equivalentes derivados do petróleo.¹¹

É notável que a produção de biodiesel a partir de microalgas divide opiniões dentro da comunidade científica. Segundo Chisti¹ as microalgas parecem ser a única fonte de biodiesel renovável capaz de satisfazer a demanda global por combustíveis para transporte. No entanto, os altos custos de cultivo e produção limitam a aplicação industrial de microalgas para a produção de biodiesel. Usando o método tradicional para a produção de biodiesel, as microalgas são secas após a colheita, e os lipídeos são extraídos e transesterificados. Tanto a secagem como a extração requerem grande demanda de energia.¹²

Embora a produção de biodiesel a partir de microalgas seja promissora, ainda há um grande gargalo tecnológico para a conversão rápida e econômica da fração lipídica de microalgas em biodiesel. Portanto, estudos recentes têm se concentrado no uso de biomassa úmida de microalgas como matéria-prima para a produção de biodiesel, pois muitos autores indicam que o caminho para viabilizar economicamente a produção de biodiesel de microalgas seja a partir da biomassa algácea úmida.^{12,13}

Processos *“in situ”* a partir de biomassa úmida de microalgas reduziria o gasto energético com a etapa de secagem da biomassa e extração dos lipídeos, uma vez

que os lipídeos seriam extraídos concomitantemente à transesterificação/esterificação a ésteres graxos. Entretanto, na transesterificação *“in situ”* a conversão da fração lipídica em ésteres é drasticamente afetada pela presença de água na reação, independente da natureza do catalisador ser ácida ou básica, ocorrendo reações concorrentes de hidrólise e saponificação, respectivamente.^{14,15,16}

Estudos indicam que a hidrólise-esterificação aplicada à biomassa úmida pode ser um processo eficaz na conversão da fração lipídica de biomassa úmida de microalgas em biodiesel sendo menos dispendiosa energeticamente frente à transesterificação *“in situ”*.^{13,17,18} Porém, é importante salientar que até o momento os trabalhos referentes ao estudo do processo de hidrólise-esterificação foram realizados a partir da biomassa seca umidificada com água, simulando desta forma a biomassa úmida de microalgas. Deste modo as reais dificuldades em manipular a pasta algácea úmida na presença de diferentes solventes, catalisadores, enfim, em diferentes condições reacionais não condiz com a realidade.

Dessa forma, o desafio deste trabalho foi manipular a biomassa úmida de diferentes espécies de microalgas no desenvolvimento e no aprimoramento do processo *“in situ”* de hidrólise-esterificação colaborando assim com o desenvolvimento de tecnologia para possível produção de biodiesel em escala comercial. No estudo do processo de hidrólise-esterificação pela primeira vez foi empregada a biomassa algácea úmida e o uso da acetona como solvente dispersor, a acetona favorece a dispersão do solvente extrator (apolar) na fase aquosa (biomassa úmida) aumentando a eficiência do processo e obtendo altos rendimentos de ésteres.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver um processo de hidrólise-esterificação na presença de um solvente dispersor empregando a biomassa úmida de diferentes espécies de microalgas para a produção de ésteres metílicos de ácidos graxos. Para determinar o teor de lipídeos e o perfil graxo, também foi desenvolvido um método rápido de extração empregando irradiação por micro-ondas.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver método rápido para extração de lipídeos a partir da biomassa umidificada da microalga *Nannochloropsis oculata* empregando irradiação por micro-ondas;
- Comparar o método de extração assistida por micro-ondas (biomassa úmida) com o método convencional de extração (biomassa seca);
- Desenvolver o método de hidrólise-esterificação na presença de um solvente dispersor para biomassa úmida de *N. oculata*;
- Aplicar o método de hidrólise-esterificação à biomassa úmida para as microalgas *A. coffeaeformis*, *C. gracilis* e *I. galbana*, compostas por diferentes paredes celulares;
- Comparar o método desenvolvido de hidrólise-esterificação empregando a biomassa algácea úmida com os métodos de extração-transesterificação e transesterificação "in situ" empregando biomassa seca.
- Comparar o perfil graxo dos ésteres obtidos pelos diferentes processos de produção de biodiesel utilizados;
- Comparar a conversão da fração lipídica das microalgas em ésteres transesterificada ou esterificada pelos diferentes processos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Microalgas

As microalgas são microrganismos autótrofos fotossintetizantes que habitam os mares, lagos e rios.¹ As três classes mais importantes de microalgas em termos de abundância são as diatomáceas (Bacillariophyceae), as algas verdes (Chlorophyceae) e as algas douradas (Chrysophyceae).³ Utilizam CO₂ da atmosfera como fonte primária de carbono na conversão da energia solar em energia bioquímica armazenada na forma de lipídeos, hidrocarbonetos, proteínas e polissacarídeos. Portanto, são potenciais candidatas a matéria-prima renovável na produção de bicompostíveis e produtos químicos. Além da alta eficiência fotossintética e elevada produção de biomassa as microalgas apresentam alto teor lipídico comumente variando de 20 a 50% de lipídeos em relação à biomassa seca.^{1,6,19}

Os lipídeos de microalgas são classificados em neutros e polares. Os lipídeos neutros são considerados produtos de armazenamento de energia e correspondem aos ésteres, os triacilgliceróis e os ácidos graxos. Os ácidos graxos principais são os saturados e os isômeros *cis* dos insaturados, com 12 a 22 átomos de carbono e até seis ligações duplas. Dentre os lipídeos polares estão os glicolipídeos e fosfolipídeos, ambos são lipídeos estruturais contidos nas paredes celulares.^{20,21}

Resumidamente, a biossíntese dos ácidos graxos trata-se de uma sequência repetitiva de reações catalisadas por um complexo enzimático, a ácido graxo sintase. O acetil-CoA e o malonil-CoA são convertidos em tioésteres ligados a enzimas, o éster malônico é carregado por meio da proteína carreadora de acila (ACP) (**Figura 1**). Logo, ocorre uma condensação de Claisen dos grupos acetil e malonil para formar um grupo acetoacetil-ACP. Que é reduzido a β -hidroxi éster via NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato). Em seguida, ocorre a eliminação de água obtendo o éster *E* (trans) α,β -insaturado-ACP. A redução da ligação dupla novamente utiliza NADPH e gera um acil-ACP saturado. Este pode retornar ao sistema, condensando novamente com malonil-ACP e passando por sucessivas etapas de redução e desidratação, aumentando gradualmente o

comprimento da cadeia em dois carbonos para cada ciclo, até que se obtenha o comprimento de cadeia necessário.^{22,23}

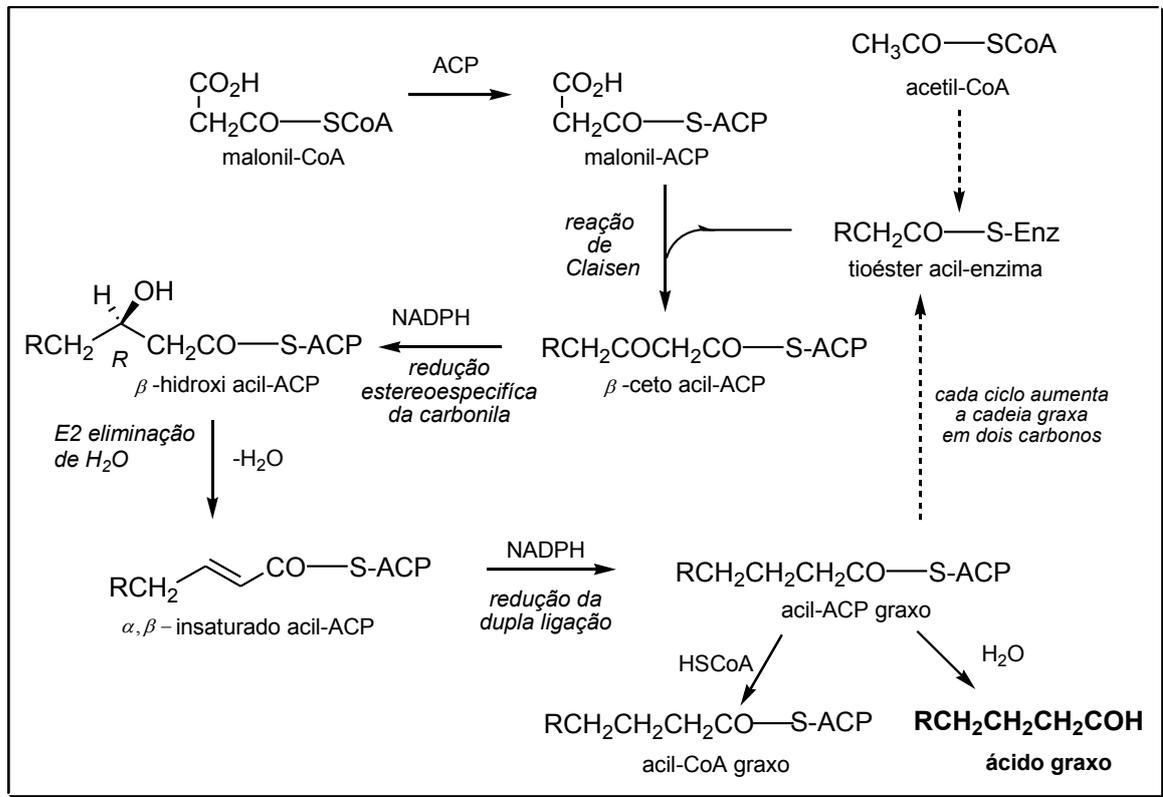


Figura 1. Biossíntese dos ácidos graxos²³

3.1.1. *Amphora coffeaeformis*

A microalga *Amphora coffeaeformis* é uma diatomácea penada (Figura 2). Pertence à divisão Ochrophyta, classe Bacillariophyceae. Apresenta como produto de reserva crisolaminarina e lipídeos. As diatomáceas apresentam como principal característica sua parede celular (frústulas) silicosa, as quais fundamentam sua classificação devido a seus ricos detalhes de forma e ornamentação.⁵

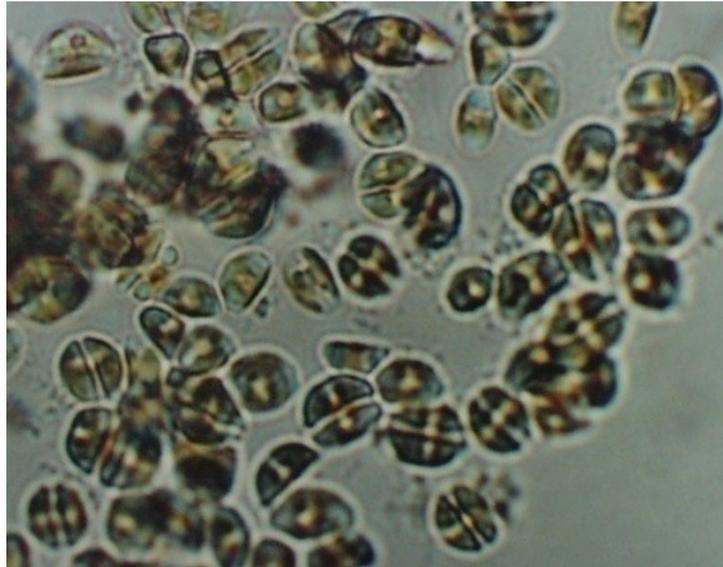


Figura 2. Cultivo de *Amphora coffeaeformis*
(<http://www.aquicultura.furg.br/index.php/pt/producao/teses/44-2013/253-tatiana-germano-martins-machado>)

3.1.2. *Chaetoceros gracilis*

Assim como a microalga *A. coffeaeformis*, a *Chaetoceros gracilis* é também uma diatomácea (**Figura 3**). Pertence à divisão Ochrophyta, classe Bacillariophyceae. Apresenta como produto de reserva crisolaminarina e lipídeos. E apresentam parede celular compostas de sílica amorfa hidratada.⁵

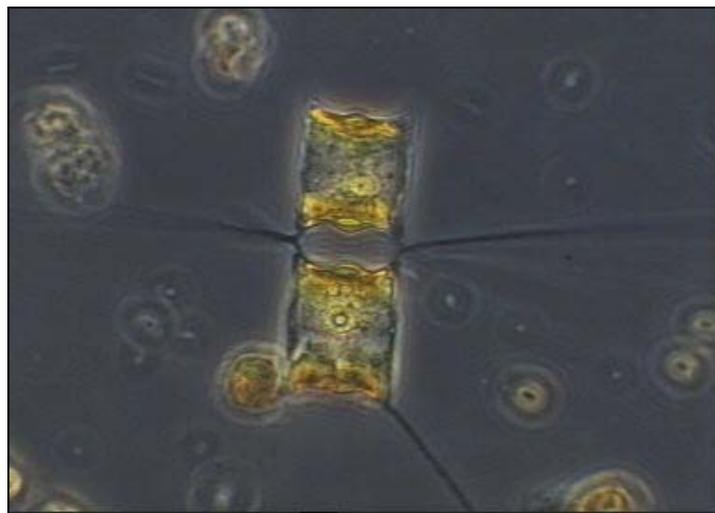


Figura 3. Células de *Chaetoceros gracilis*
(https://scienceofearth.files.wordpress.com/2011/02/chaetoceros_gracilis.jpg)

3.1.3. *Chlorella* sp.

Neste caso, a microalga *Chlorella* sp. não tem espécie determinada (**Figura 4**). Compreendem as algas verdes, pertence à divisão Chlorophyta e classe Chlorophyceae. As paredes celulares são constituídas por estrutura fibrilar de celulose. A microalga *Chlorella* sp. produz amido como produto de reserva. O gênero *Chlorella* apresenta crescimento rápido e alta tolerância às condições de cultivo.⁵

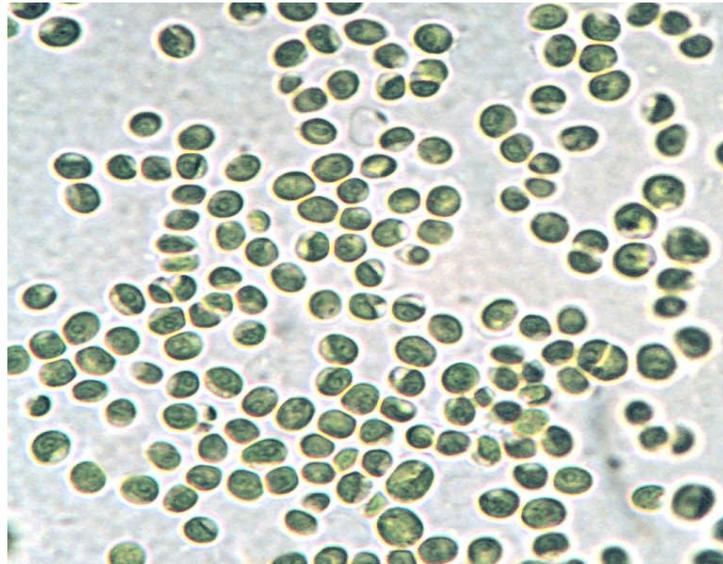


Figura 4. Células de *Chlorella* sp. (<http://aslee.scot/resources/>)

3.1.4. *Isochrysis galbana*

A microalga *Isochrysis galbana* (**Figura 5**) pertence à divisão Prymnesiophyta, classe Prymnesiophyceae. O produto de reserva é um polissacarídeo, a crisolaminarina, mas lipídeos também são acumulados pelo citoplasma como produto de reserva. Suas células são recobertas com escamas CaCO_3 .⁵

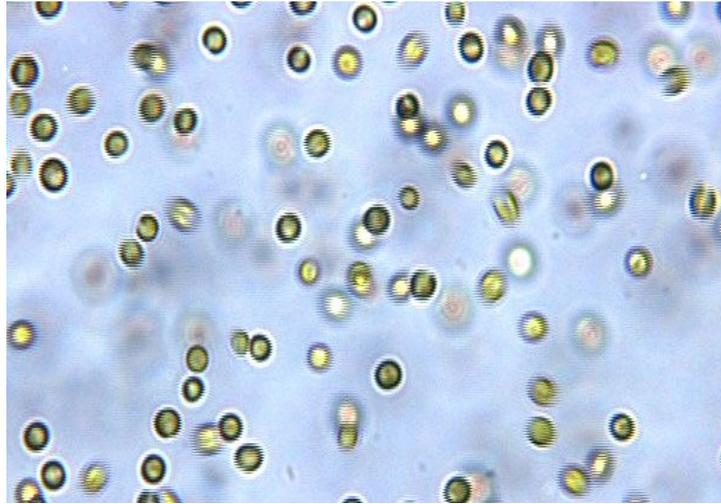


Figura 5. Células de *Isochrysis galbana* (<https://alchetron.com/Isochrysis-galbana-3079136-W>)

3.1.5. *Nannochloropsis oculata*

A microalga *Nannochloropsis oculata* (**Figura 6**) pertencem à divisão Ochrophyta, classe Eustigmatophyceae. O gênero *Nannochloropsis* é conhecido por possuir parede celular rígida (celulose). Seus produtos de reserva são crisolaminarina e lipídeos.⁵

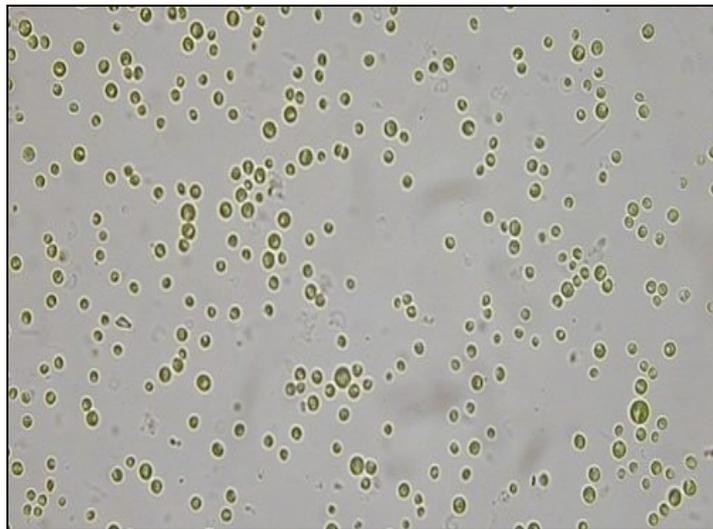


Figura 6. Células de *Nannochloropsis oculata* (<http://aslee.scot/resources/>)

3.2. Cultivo de microalgas

A composição bioquímica das microalgas depende de inúmeros fatores tais como composição e concentração de nutrientes do meio de cultivo.²⁴ São elementos químicos essenciais para o crescimento e composição química das microalgas marinhas os macronutrientes carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, fósforo e magnésio; os micronutrientes cobre, zinco e molibdênio. O carbono é necessário em maior concentração para as algas, pois é o principal componente de todas as substâncias orgânicas sintetizadas pelas células. As concentrações de nitrogênio, fósforo e minerais são os fatores que mais influenciam nos teores de proteína, carboidrato, lipídeos e pigmentos. As microalgas podem sintetizar diversas vitaminas, entretanto, em cultivos, é efetivamente importante adicionar as vitaminas B₁, B₆ e B₁₂.^{5,25}

Para realizar uma cultura além da escala laboratorial a escolha do meio de cultivo a ser utilizado é o passo chave no processo. É necessário alcançar uma relação favorável entre custo e benefício. Portanto, os meios de cultura comumente usados no laboratório como Conway e Guillard 'f/2' tornam-se inviáveis para o cultivo em massa. Desta forma, o estudo de fertilizantes sobre o cultivo de microalgas na aquicultura teve êxito, resultando em culturas com preços finais relativamente baixos e produção de biomassa satisfatória.^{25,26} Gonzalez-Rodriguez & Maestrini²⁶ estudaram a influência de 12 diferentes fertilizantes agrícolas no crescimento de 16 algas marinhas e compararam com o meio de cultivo Conway, todas as algas cultivadas comportaram-se de forma semelhante multiplicando-se rapidamente em todos os meios. Simental & Sánchez-Saavedra²⁷ investigaram o cultivo de três estirpes de diatomáceas bentônicas em meio fertilizante e meio 'f/2', não houve diferenças significativas na concentração celular média e na taxa de crescimento das três diatomáceas cultivadas com fertilizante agrícola em comparação com o meio padrão 'f/2', porém, o custo para meios de cultura não convencionais é 1/8 do custo do meio 'f/2'.

Além dos cuidados com o meio nutritivo para garantir produtividade à microalgas é relatado que o gargalo para a produção comercial de microalgas está na coleta, que pode representar até 30% do custo total da produção.^{5,28} A coleta, na sua maioria, é realizada principalmente por centrifugação, processo que envolve alto

consumo de energia. Como alternativa vem sendo muito estudada a floculação, uma alternativa mais econômica comparada à centrifugação para concentrar biomassa. As paredes celulares das microalgas têm carga negativa, basicamente o floculante age neutralizando a carga negativa da parede celular das microalgas e reduzindo a repulsão elétrica entre elas, causando assim a agregação de células e formando aglomerados pesados que sedimentam no fundo dos tanques.^{5,28} Roselet *et al.*²⁸ avaliaram a eficiência de 25 floculantes entre sintéticos e naturais para concentrar cultivos de *Nannochloropsis oculata* e *Chlorella vulgaris*, apenas Tanfloc apresentou alta eficiência para as duas espécies estudadas, demonstrando que a eficiência deste polímero catiônico natural de baixo peso molecular não é afetada pela salinidade do meio de cultura, cabe salientar que Tanfloc também se mostrou o floculante mais econômico.

3.3. Biodiesel de microalgas

O biodiesel de microalgas é considerado um combustível de terceira geração sendo produzido a partir de lipídeos acumulados nas células das microalgas.³ Todo biodiesel é considerado sustentável e ecologicamente amigável por não conter compostos aromáticos, enxofre ou outras substâncias químicas que são prejudiciais ao meio ambiente, possuir ciclo de carbono fechado e alta biodegradabilidade.¹⁰ O diferencial do biodiesel de microalga é atribuído as microalgas serem facilmente cultivadas, possuírem taxas de crescimento rápido e alto rendimento de óleo (cerca de 130 vezes maior que a soja).^{1,3}

A composição em ácidos graxos nas cadeias dos triacilgliceróis, matéria-prima para produção de biodiesel, determinam em grande parte muitas propriedades importantes deste combustível, dentre elas: número de cetano (CN, *cetane number*), fluxo a frio, estabilidade oxidativa, viscosidade cinemática, lubricidade e densidade.⁹ O perfil graxo de muitas microalgas possui peculiarmente uma quantidade substancial de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LC-PUFA, *long chain polyunsaturated fatty acids*) incluindo o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA).¹

Dentro deste contexto, Knothe²⁹ investigou as propriedades combustíveis (número de cetano, viscosidade cinemática e estabilidade oxidativa) de ésteres

graxos puros com mais de três duplas ligações com intuito de prever o desempenho do biodiesel derivado de microalgas frente a estas propriedades. Este autor observou que para a propriedade número de cetano foram obtidos valores para o C20:4 e o C22:6 ligeiramente mais elevados do que o linolenato de metila (C18:3), uma observação geral derivada destes resultados é que dois átomos de carbono adicionais na cadeia compensam uma ligação dupla adicional em termos de CN. Portanto, os CN de outros poliinsaturados derivados dos C20 e C22 também são provavelmente mais elevados do que se poderia esperar.²⁹

Os valores de viscosidade cinemática de C20:4 e C22:6 a 40 °C foram 3,11 e 2,97 mm².s⁻¹, respectivamente. Esses valores estão próximos do valor para C18:3. Segundo Knothe²⁹, ocorre um efeito semelhante ao do CN, o aumento da viscosidade devido ao maior comprimento da cadeia é compensado pelo efeito de redução da viscosidade provocado pelas ligações duplas *cis*. Concluiu-se que a viscosidade cinemática do biodiesel de microalgas é provavelmente menor do que aqueles obtidos a partir de óleos vegetais com perfis de ácidos graxos mais convencionais.²⁹

Por sua vez, a estabilidade oxidativa medida por tempo de indução Rancimat dos ésteres metílicos derivados do C20:4 e C22:6 foram inferiores a 0,1 h a 110 °C.²⁹ Estes são valores baixos, porém dentro do esperado pelo autor, pois a estabilidade oxidativa diminui com o número de ligações duplas.²⁹ Antioxidantes teriam de ser adicionados a qualquer biodiesel de microalgas. No entanto, é o caso também do biodiesel de óleos vegetais comercializado, o qual é adicionado antioxidante antes mesmo de ser analisado para atender aos requisitos mínimos exigidos pelas normas ASTM (*American Society for Testing and Materials*) e EN (*European Norm*).^{9,29}

Outro estudo verificou que um aditivo de combustível contendo terc-butil-hidroquinona (TBHQ) foi muito eficaz no aumento da estabilidade oxidativa dos compostos modelo de éster metílico de microalgas. Especificamente, verificou-se que a adição de apenas 0,03% e 0,06% de TBHQ são suficiente para ésteres metílicos de ácidos graxos de *Nannochloropsis sp.* passassem nas especificações ASTM e EN, respectivamente, sem remover nenhum EPA ou DHA.³⁰

3.4. Métodos de produção de biodiesel

3.4.1. Produção de biodiesel a partir de biomassa seca de microalgas

A produção de biodiesel a partir de microalgas inclui cultura, colheita, secagem, extração e transesterificação.³¹ Entretanto, um dos principais gargalos para a viabilidade econômica da produção de biodiesel de microalgas é a secagem da mesma. Em estudo realizado por Song *et al.*¹³ foi constatado que 44% da energia consumida no processo convencional (secagem, extração e transesterificação) foi atribuído a secagem da biomassa. A avaliação do ciclo de vida (*Life-Cycle Assessment - LCA*) realizado por Lardon *et al.*¹² indicaram que o elevado custo de produção do biodiesel de microalgas é provocado principalmente pela secagem da biomassa e extração de lipídeos, o que representou 90%.

Na produção de biodiesel a partir de lipídeos de microalgas, convencionalmente ocorre à extração da fração lipídica da biomassa seca de microalgas por processos mecânicos e/ou químicos seguida da transesterificação dos lipídeos em ésteres, mas também é muito empregada a transesterificação “*in situ*” da biomassa algácea seca.^{6,32} A Tabela 1 apresenta diferentes métodos para produção de biodiesel empregando biomassa algácea seca.

Tabela 1. Trabalhos empregando diferentes métodos para produção de biodiesel a partir de biomassa algácea seca

Referência	Microalga	Método	Solvente	Método selecionado	OBS
Lee <i>et al.</i> ³³	<i>Botryococcus sp.</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Scenedesmus sp.</i>	Extração por autoclave, moinho de bolas, micro-ondas, ultrassom e solução de NaCl a 10%	Clorofórmio:metanol (1:1 v/v)	Micro-ondas	comparação entre os métodos
D'Oca <i>et al.</i> ⁸	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	(1)extração (Soxhlet, agitação magnética e banho de ultrassom)- transesterificação(2), (3) transesterificação “ <i>in situ</i> ”	(1) clorofórmio: metanol (2:1 v/v), metanol, clorofórmio, etanol e hexano (2) e (3) metanol	(1) agitação magnética e banho de ultrassom com clorofórmio: metanol (2:1 v/v)	Maior rendimento em ésteres por extração- transesterificação
Dong <i>et al.</i> ³⁴	<i>Chlorella sorokiniana</i>	pré-esterificação com Amberlyst-15 seguido da transesterificação “ <i>in situ</i> ” com KOH	Metanol	recuperação total de FAMEs até 94,87 ± 0,86%	reciclagem de Amberlyst-15 (8 ciclos)
Martinez-Guerra <i>et al.</i> ³⁵	<i>Chlorella sp.</i>	Extração-transesterificação assistida por micro-ondas	(1) etanol (solvente/reagente); e (2) etanol (reagente) e hexano (co-solvente)	(1) etanol (solvente/reagente)	Comparação com Bligh & Dyer
Lemões <i>et al.</i> ³⁶	<i>Chlorella sp.</i>	(1)extração - transesterificação, (2) transesterificação “ <i>in situ</i> ”	Etanol e Metanol	transesterificação “ <i>in situ</i> ” com etanol	

3.4.2. Extração de lipídeos a partir de biomassa úmida de microalgas

A busca por diminuir os altos custos provenientes da secagem da microalga, mostra a homogeneização de alta pressão como uma técnica eficaz para romper a parede celular de *N. oculata*, além de ser tolerante a ambientes de alta umidade.³⁷ Outro estudo relata que a homogeneização de alta pressão mostrou melhores resultados quando comparado com outras técnicas de ruptura celular como ultrassom, moinho de bolas e tratamento com ácido sulfúrico, para *Chlorococcum sp.*, em escala laboratorial. O desempenho de cada método de ruptura celular foi examinado através de reduções nas contagens celulares intactas e reduções em diâmetros médios de colônias, o resultado obtido foi homogeneização a alta pressão (73,8% de ruptura), tratamento com ácido sulfúrico (33,2%), moinho de bolas (33,2%) e ultrassom (4,5%).³⁸

O tratamento por micro-ondas tem sido indicado potencialmente mais econômico em comparação com outros métodos, porque menos tempo de tratamento é necessário e é eficiente energeticamente.³⁹ O estudo para ruptura celular da biomassa úmida de *N. oculata* por micro-ondas, ultrassom, banho d'água (tratamento térmico convencional), misturador (ação de cisalhamento) e tratamento a laser confirmam esta afirmação. Os resultados revelaram que o tratamento térmico por micro-ondas obteve a maior eficácia na ruptura das células de microalgas (94,92%) em comparação com o tratamento térmico convencional com banho d'água (87,7%). O valor de mérito calculado para cada método foi definido como a ruptura celular por unidade de energia aplicada e por unidade de fração volumétrica do dispositivo utilizado, mostrando que o maior valor de mérito foi com o tratamento por micro-ondas (3,50) comparado ao tratamento térmico convencional com água (2,18) e o menor valor foi com tratamento a laser (0,006) devido à sua maior demanda de energia e menor volume de tratamento.³⁹

Ali & Watson⁴⁰ investigaram o efeito do tempo de tratamento e potência de micro-ondas 635 W (50%) e 1021 W (100%) na extração lipídica da biomassa algácea úmida de *N. oculata*, associada a solvente convencional. A quantidade de lipídeos extraídos foi correlacionada com a ruptura celular das células de microalgas. O maior teor lipídico extraído, após 5 minutos, foi de 0,036 g por grama de microalga seca (g/g) para 635 W (68,86% de ruptura celular), enquanto que com 1021 W o

rendimento foi de 0,052 g/g (92,81%). A amostra controle, que não recebeu qualquer tratamento por micro-ondas, obteve apenas 0,016 g/g. Uma análise detalhada dos requisitos adicionais de energia para o tratamento por micro-ondas e o aumento no rendimento lipídico foi conduzida para determinar a viabilidade de processos adicionais intensivos em energia ao processo de extração. Para 5 minutos de tratamento, a quantidade de lipídeo extraído por número total de Joules consumidos foi encontrado para cada potência de micro-ondas; obtendo-se valores de 1.889×10^{-4} g/g/kJ (635 W) e 1.697×10^{-4} g/g/kJ (1021 W). Os principais ácidos graxos livres presentes na composição dos lipídeos extraídos de *N. oculata* foram os ácidos oléico (C18:1), palmítico (C16:0) e linoléico (C18:2).⁴⁰

Teo & Idris⁴¹ adaptaram quatro diferentes métodos de extração por solventes (Hara e Radin, Folch *et al.*, Chen *et al.* e Bligh&Dyer) à irradiação por micro-ondas. Foi utilizada biomassa úmida das microalgas *Nannochloropsis sp.* e *Tetraselmis sp.*, temperatura fixada em 65 °C e radiação de microondas a 500 W por 5 minutos. O método de Hara e Radin assistido por irradiação com micro-ondas apresentou o maior rendimento de extração de lipídeos para *Tetraselmis sp.* (8,19%) enquanto Folch *et al.* assistido por micro-ondas provou ser mais eficiente para *Nannochloropsis sp.* (8,47%).

Chen *et al.*³² usou um micro-ondas doméstico (Samsung MW630WA) no pré-tratamento de *Chlamydomonas sp.* JSC4 com teor de água de 68,7% em relação a biomassa seca, a partir de 100 g da microalga adicionou-se 100 mL de metanol ao frasco e misturou-se durante 20 minutos a 400 rpm para aumentar a fluidez da biomassa. A mistura de microalgas-metanol foi então submetida à irradiação de micro-ondas a 350 W durante 10 minutos para conseguir a ruptura da parede celular. Segundo os autores, o processo de pré-tratamento transformou microalgas úmidas em bolo de microalgas mais concentrado, permitindo a operação em grande escala da extração de óleo de microalgas.

3.4.3. Transesterificação a partir da biomassa úmida de microalgas

Existem relativamente menos estudos em que a biomassa de microalgas úmidas é aplicada e alguns destes partem ainda da biomassa em pó^{14,15} a qual é adicionada água até obter o teor de umidade desejado, ou seja, a biomassa é

umidificada. Além disso, é necessário um alto volume de solvente^{42,43} e catalisador⁴² em relação à biomassa, muitas vezes é necessária uma elevada temperatura¹⁵ de reação quando comparado com um processo comercial de biodiesel.⁴⁴

Velasquez-Orta *et al.*¹⁴ realizou a transesterificação “*in situ*” de *Nannochloropsis oculata* e *Chlorella sp.*, trabalhou com teores de umidade de 1,5% e 0% para as células de *Chlorella sp.*, e para obter biomassa com 10% de umidade foi adicionada água ao pó de *Chlorella sp.* Obtiveram-se teores de umidade de 10%, 1,5% e 0% para as células de *N. oculata*, secando primeiro as células durante aproximadamente 24 horas em um incubador ajustado a 50 ° C e 100 rpm. Avaliaram a utilização de biomassa de algas úmidas empregando três catalisadores homogêneos (ácido sulfúrico, hidróxido de sódio e metóxido de sódio) e um catalisador heterogêneo (peneira molecular A). A conversão máxima de lipídeos foi obtida tanto para as microalgas *N. oculata* como para *Chlorella sp.* secas usando ácido sulfúrico como catalisador. Obteve-se um rendimento de FAMES de 73% ± 5% para *N. oculata* a uma razão molar catalisador: lipídeo de 0,8: 1; enquanto que 92 ± 2% foi obtido para *Chlorella sp.* a uma razão molar de catalisador: lipídeo de 0,35: 1. Portanto, o rendimento não foi dependente da salinidade da biomassa e diminuiu com o aumento da umidade.

A fim de investigar os efeitos do teor de água na produção de biodiesel Cao *et al.*¹⁵ adicionou água destilada à biomassa liofilizada de *Chlorella pyrenoidosa* para formar pasta úmida usada para otimizar as condições de reação da produção de biodiesel diretamente da microalga. A 90 ° C o rendimento de biodiesel diminuiu de 91,4% para 10,3%, com o aumento do teor de água de 0% para 90%. Quando a temperatura atingiu 150 ° C, o rendimento de biodiesel foi superior a 100%, isto foi provavelmente por causa de outras moléculas (por exemplo, fosfolipídeos), também foram convertidos em biodiesel. A partir das variáveis fixadas, 100 mg de biomassa seca foi umidificada até obter um teor de umidade de 90%, 4 mL de metanol, 6 mL de hexano e 0,5 mol L⁻¹ de H₂SO₄ foram testadas as seguintes condições: 90, 120, 180, 240 e 300 min; 90, 120 e 150 ° C. A condição determinada como ideal pelos autores e aplicada à pasta algal úmida de *C. pyrenoidosa* foi 120 ° C e 180 min de tempo de reação e o rendimento de biodiesel chegou a 92,5%. O significativo efeito

negativo da água na transesterificação “*in situ*” poderia ser compensado por uma temperatura mais elevada.

Sathish *et al.*¹⁶ discutiu os efeitos da inibição da água na transesterificação “*in situ*”, investigou se a temperatura de secagem da biomassa de microalgas afetou o rendimento do biodiesel e buscou reduzir o impacto negativo da umidade na reação de transesterificação “*in situ*” da biomassa úmida de *Chlorella sp.* e *Scenedesmus sp.* A biomassa das microalgas foram submetidas a temperaturas de secagem de 65, 85, 105 °C por 1, 2, 4, 8, 20 ou 32 h para obter biomassa com diferentes teores de umidade. As amostras foram transesterificadas utilizando 1 mL de uma solução a 5 e 10% de H₂SO₄ em metanol, a 90 °C por 30 min de aquecimento e 15 min de agitação. Este estudo mostrou que a presença de umidade maior que 20% em massa na biomassa de microalgas diminuiu significativamente a recuperação de biodiesel quando se utilizou transesterificação “*in situ*”. O aumento da quantidade de metanol e/ou catalisador na reação melhorou a recuperação do biodiesel (81%) a partir da biomassa úmida (84% de umidade).

Im *et al.*⁴² relataram a transesterificação “*in situ*” de microalgas úmidas, *Nannochloropsis oceanica*, com um teor de umidade de 65%. Os experimentos para determinar o melhor co-solvente orgânico foram realizados com benzeno, tetracloreto de carbono, clorofórmio, n-hexano e tolueno. Misturaram 0,2 g da pasta de *N. oceanica* úmida (equivalente a 0,07 g da biomassa seca) com 0,3 mL de ácido sulfúrico e 3 mL de mistura 2:1 v/v de co-solvente e metanol à temperatura ambiente. Após a mistura, cada amostra foi submetida a 95 °C durante 2 h. O clorofórmio mostrou a maior eficiência (90,6% de conversão em FAMES). Foram variados os parâmetros de reação: temperatura (65-95 °C), volume de catalisador (0,1-0,4 mL) e tempo de reação (30-120 min). A condição escolhida como ótima foi 0,2 g de biomassa úmida, 0,3 mL de H₂SO₄, 90 min de reação a 95 °C a qual alcançou conversão de 91,1% em FAMES.

Suh *et al.*⁴³ propôs um pré-tratamento da biomassa úmida de microalgas seguido por transesterificação “*in situ*”, trata-se da desidratação da biomassa úmida de *Ettlia sp.* através de lavagens com etanol a 80 °C durante 30 min. A condição estudada de pré-tratamento consistiu em 1 a 3 lavagens com etanol na proporção 3:1 v/v etanol:biomassa, estudaram também a proporção etanol:biomassa que variou

1:1 até 10:1 empregando lavagem única. Para a transesterificação *“in situ”* foi adicionado 3 mL de etanol, para as demais variáveis testaram-se diferentes valores: volume de H₂SO₄ foi de 3,3 a 16,7% v/v, temperatura de 60 a 120 °C e tempo de reação de 10 a 120 min. Quanto à transesterificação da fração de etanol recuperada do pré-tratamento, adicionou-se 10% de H₂SO₄, reagiu a 120 °C durante 2 h. Uma única lavagem utilizando a proporção 1:1(v/v) etanol:biomassa resultou num baixo rendimento de 3,18 mg de FAEE, mas este foi aumentado para 18,29 mg quando a proporção foi aumentada para 10:1 etanol:biomassa. Segundo os autores a utilização de um volume maior de etanol no pré-tratamento remove uma maior porção da água intracelular na microalga.

Outros autores também sugerem o pré-tratamento da biomassa úmida como alternativa para viabilizar o processo de produção de biodiesel de microalgas. Neste caso a irradiação por micro-ondas com potência de 350 W por 10 min é aplicada como pré-tratamento visando a ruptura e pré-concentração da pasta de microalga, assim que a mesma é submetida ao pré-tratamento existem as opções de transesterificação *“in situ”*, ou ainda, a extração com adição de hexano e metanol seguido de transesterificação da fração lipídica.³²

Enfim, vários trabalhos relatam o efeito negativo da água no rendimento e/ou conversão de lipídeos de microalgas em ésteres graxos por transesterificação *“in situ”*.^{14,15,16} Estudos apontam até como indispensável à secagem da biomassa de microalga antes da produção de biodiesel via por transesterificação *“in situ”*.¹⁷

3.4.4. Hidrólise-esterificação em biomassa umidificada de microalgas

A hidrólise-esterificação também é uma opção de processo para produção de biodiesel de microalgas. Estudos demonstram que a esterificação de ácidos graxos é mais favorecida do que a transesterificação de triacilgliceróis (TG) na presença de elevado teor de água, este fato deve-se a maior solubilidade dos ácidos graxos em álcool, o que remete a hidrólise *“in situ”* de microalgas em pasta como vantajosa frente à transesterificação *“in situ”*.¹⁸ Song *et al.*¹³ avaliou a viabilidade técnico-econômica do processo de produção de biodiesel via hidrólise-esterificação a partir de microalgas úmidas e comparou com o processo de produção de biodiesel convencional (isto é, secagem, extração lipídica, esterificação e transesterificação).

A análise de energia e materiais indicou um alto consumo de energia (5,42 MJ/L de biodiesel) da rota convencional, atribuídos principalmente a secagem e transesterificação, 2,36 e 1,89 MJ/L de biodiesel, respectivamente. Em contraste, o consumo de energia do processo de hidrólise-esterificação foi reduzido, 1,81 MJ/L de biodiesel, o equivalente a 33,39% do processo convencional.

Levine *et al.*⁴⁵ demonstrou pela primeira vez a possibilidade de realizar a hidrólise “*in situ*” de lipídeos celulares em biomassa de algas úmidas, reter esses lipídeos dentro de um sólido filtrável e então produzir biodiesel por esterificação “*in situ*” supercrítica usando etanol. Os experimentos referentes à hidrólise supercrítica partiram de biomassa seca de *Chlorella vulgaris* (1 g) e umidificada com água (4 g), os tempos e temperaturas de reação estudados foram 15, 30, 45 e 60 minutos e 250, 225 e 300 °C, respectivamente. O produto da hidrólise não foi seco antes da esterificação “*in situ*” e continham aproximadamente 46% em peso de água. Na esterificação “*in situ*” supercrítica foram investigados os efeitos do tempo de reação (60 ou 120 min), temperatura (275 ou 325 °C) e proporção de etanol (aproximadamente 2-8:1 p/p de Etanol: sólidos). As variáveis para hidrólise foram fixadas em 250 °C durante 45 min; os sólidos recuperados por filtração continham entre 77-90% dos lipídeos originalmente presentes na biomassa de *C. vulgaris*, principalmente na forma de ácidos graxos. Quanto à esterificação, tempo mais longo, maior temperatura e maior carga de etanol tenderam a aumentar o biodiesel bruto e os rendimentos de FAEEs, que variaram de 56-100% e 34-66%, respectivamente.

Com o intuito de evitar a secagem de biomassa, este trabalho investigou a produção de FAMES via hidrólise-esterificação da biomassa úmida das microalgas *Chlorella sp.* e *Nannochloropsis oculata*.⁴⁶ Os experimentos de hidrólise foram realizados a partir de 20 g de biomassa seca (cada reação), umidificada até alcançar teores de 50 ou 100% m/m de água (em relação à biomassa seca) e adição de 100 mL de hexano como co-solvente. Testaram-se as concentrações de catalisador (H₂SO₄) de 20, 40 e 60% p/p a 100 °C sob agitação constante durante 4 h. As condições de esterificação foram: metanol a uma razão molar de 30:1 (álcool:ácido graxo), 10% de H₂SO₄ a 100 °C por 4 h. Também foi avaliado o perfil de ácidos graxos antes e após o processo de hidrólise-esterificação. Os melhores resultados

em FAMEs foram obtidos para *Chlorella sp.* contendo 50 % de umidade, a partir do processo de esterificação com 20, 40 e 60% de catalisador, 6,8 ($\pm 0,3$), 6,9 ($\pm 0,2$) e 7,3 ($\pm 0,8$)%, respectivamente; para *N. oculata*, nas mesmas condições (exceto 20% de H₂SO₄) foram 4,8 ($\pm 0,3$) e 5,1 ($\pm 0,2$)%. A determinação dos perfis de ésteres graxos não revelou qualquer degradação do FFA a partir da biomassa de microalgas sob as condições de hidrólise-esterificação (**Tabela 2**). Ao comparar os resultados com os resultados dos processos de extração-transesterificação e transesterificação “*in situ*” usando biomassa seca, os processos de extração-transesterificação e de hidrólise-esterificação resultaram em rendimentos de FAMEs e perfis graxos semelhantes, porém cabe ressaltar que o processo de hidrólise-esterificação consome menos energia devido ao menor número de operações unitárias, que correspondem à secagem da biomassa e extração da fração lipídica, ambas as operações são as mais dispendiosas energeticamente.

Tabela 2. Perfil dos ésteres metílicos de ácidos graxos (%) obtidos a partir da microalga *Nannochloropsis oculata* por hidrólise-esterificação e processo *in situ*.

Entrada	Éster Graxo	Hidrólise-esterificação (40% H ₂ SO ₄ , 50% água)	Hidrólise-esterificação (60% H ₂ SO ₄ , 50% água)	Processo <i>in situ</i>
1	C14:0	7,29	6,88	7,28
2	C16:0	19,04	18,10	17,35
3	C16:1	14,57	15,82	14,99
4	C18:0	4,17	4,28	4,33
5	<i>cis</i> -C18:1	8,44	8,41	7,85
6	<i>trans</i> -C18:1	7,5	6,64	6,72
7	C18:2	5,91	5,3	5,38
8	C20:1	3,57	3,79	4,09
9	C20:4	7,09	7,49	7,76
10	C20:5	15,51	15,06	14,65

A partir de padrões analíticos tripalmitina e ácido palmítico Takisawa *et al.*¹⁸ avaliou o efeito da água nos processos de transesterificação e esterificação, respectivamente. Os rendimentos obtidos na transesterificação de TG foram 89,6%, 64,7%, 15,0% e 4,4% quando os volumes de água adicionados foram 0,2, 0,4, 0,8 e 1,6 mL, respectivamente. Os rendimentos referentes à esterificação de FFA foram

99,6%, 91,1%, 84,8% e 79,0% quando os volumes de água adicionados foram 0,2, 0,4, 0,8 e 1,6 mL, respectivamente. Portanto, a reação de esterificação é mais favorecida, uma vez que se tem somente uma etapa para obter os FAMES, ou seja, da reação dos FFA com H_2SO_4 obtém-se diretamente éster e água. Na seqüência, utilizando a microalga *Chlorella sp.*, foi adicionada água à biomassa seca até alcançar 80% de umidade, avaliaram-se os efeitos da temperatura e volume de ácido sulfúrico na hidrólise; o efeito da hidrólise no rendimento de FAMES; e depois esterificou os hidrolisados com elevado teor de água. Os FFA atingiram o valor máximo a 140, 150 e 160 °C em 40, 20 e 10 min, respectivamente. Em relação ao volume de H_2SO_4 , os FFA atingiram o valor máximo em 200, 300 e 400 mL/kg de microalgas secas durante 40, 30 e 20 min, respectivamente. Finalmente, o rendimento de FAMES por esterificação dos hidrolisados foi aumentado em 181,7% em comparação com a transesterificação *“in situ”* com a mesma quantidade de água (80%).

Outro estudo realizado por Takisawa *et al.*⁴⁷ desenvolveu a hidrólise-esterificação simultânea (SHE, *simultaneous hydrolysis-esterification*), usando ácido sulfúrico e clorídrico em um processo com etapa única. Empregando novamente pó de *Chlorella* seca comercialmente disponível, adicionou-se água destilada ao pó de microalgas para reproduzir microalgas colhidas e concentradas onde o teor de água microalgal foi assumido como 70-90%. Foi conduzido o estudo utilizando o design ortogonal L_{27} e os efeitos do teor de água, volume de ácido sulfúrico, volume de metanol, temperatura e tempo em SHE foram examinados. Verificou-se que o teor de água foi o fator mais influente através da experiência com o design ortogonal L_{27} . Quantidades equimolares de ácido sulfúrico e ácido clorídrico mostraram resultados semelhantes; pode considerar-se que a falta de metanol provoca a inibição da esterificação e o excedente de metanol leva à hidrólise mais lenta; o aumento da temperatura acelerou a taxa inicial de produção de FAMES, porém, os conteúdos de FAMES a vários níveis de temperatura durante 6 h são semelhantes (exceto 150 °C, pois o aquecimento excessivo pode resultar na degradação de FFA no processo de hidrólise¹⁸). O aquecimento excessivo pode resultar na degradação de FFA no processo de hidrólise. Segundo os autores, este método tem grande potencial em

termos de produção de biodiesel a partir de microalgas, uma vez que não são utilizados solventes orgânicos.

3.5. Acetona: solvente dispersor

O uso de solvente dispersor surgiu a partir da técnica de Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*), proposta em 2006 por Rezaee *et al.*⁴⁸ A DLLME baseia-se no processo de partição dos analitos entre duas fases líquidas imiscíveis, sendo uma delas a fase aquosa e a outra uma fase orgânica. Utiliza um solvente dispersor, miscível no solvente extrator (fase orgânica) e na amostra (fase aquosa), bem como um solvente extrator, imiscível na fase aquosa, sendo baseada em um sistema ternário de solventes.^{49,50}

Segundo Maeda *et al.*⁵¹ a acetona pode ser empregada como co-solvente ideal para produção de biodiesel a partir da transesterificação de diversos óleos com metanol na presença de catalisadores básicos. Como a acetona apresenta polaridade intermediária, é solúvel tanto em solventes apolares quanto polares. Além disso, uma importante propriedade da acetona, como um solvente aprótico, é a sua capacidade de estabilizar o íon metóxido, que é o intermediário para a reação de transesterificação, de acordo com o mecanismo SN2.⁵²

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Equipamentos

Para a realização deste trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos: placa de aquecimento e agitação magnética da marca Fisatom MOD 752; balança analítica marca Shimadzu modelo AY220; balança semi-analítica Shimadzu modelo BL 3200H; bomba de vácuo marca Quimis, vazão 60 L min^{-1} , potencia 1/SHP; rota evaporador marca Fisatom modelo 801; balança analítica Bioprecisa modelo FA 2104N; agitador de tubos de ensaio vortex marca B. Braun Biotech Internacional modelo Certomat MV; agitador mecânico marca Fisatom modelo 7130; centrífuga refrigerada marca Cientec modelo CT5000R; banho de ultrassom marca Quimib model 03350; centrífuga clínica 4000 rpm marca CENTRIBIO; estufa de esterilização e secagem modelo 400/ND marca NOVA ÉTICA; micro-ondas de síntese com potência de 300W Discovery CEM Discovery & Explorer SP.

4.2. Materiais e vidrarias

Para os processos de extração, transesterificação e hidrolise-esterificação foram utilizados balões de 3 bocas de fundo redondo com capacidade de 250 mL, balões de fundo redondo com capacidade de 25 e 50 mL; erlenmeyers com capacidade de 125, 250 e 500 mL; funil de vidro sinterizado; Kitassato com capacidade de 250 e 500 mL; pinças, pipetas de Pasteur; funil de separação com capacidade de 125 e 250 mL; condensador, e banho de silicone.

4.3. Reagentes e solventes

Todos reagentes e solventes utilizados neste trabalho foram adquiridos comercialmente. São eles: formiato de amônio 97% grau reagente, Sigma Aldrich; álcool metílico P.A., Synth; clorofórmio P.A, Synth; hexano P.A, Brenntag; ácido sulfúrico 98% P.A, Merck; acetona 99,8% grau HPLC, Merck; heptano, grau HPLC, J.T.Baker; hexano 95% grau HPLC, Mallinckrodt; hidróxido de sódio P.A, Synth; sulfato de magnésio P.A, Synth; água destilada; e sílica gel F254.

4.4. Padrões analíticos

Para as análises realizadas por cromatografia gasosa foram utilizados os seguintes padrões da Sigma-aldrich ou Fluka, com pureza $\geq 99\%$: nonanoato de metila, decanoato de metila, undecanoato de metila, dodecanoato de metila, miristato de metila, pureza $\geq 99.5\%$, Fluka, USA; mistoleato de metila, pentanoato de metila, palmitato de metila, palmitoleato de metila, heptadecanoato de metila, pureza $\geq 99\%$, Fluka, U.S.A; estearato de metila, oleato de metila, elaidato de metila, linoleato de metila, linolenato de metila, nonadecanoato de metila, eicosanoato de metila, eicosenoato de metila, eicosatrienoato de metila, eicosatetranoato de metila, eicosapentanoato de metila, heneicosanoato de metila, docosanoato de metila, docosenoato de metila, docosahexaenoato de metila, tricosanoato de metila, tetracosanoato de metila, pureza $\geq 99\%$, Fluka, U.S.A.; tetracosenoato de metila.

4.5. Matéria-prima

A microalga *Chlorella sp.* foi adquirida comercialmente (Purifarma, São Paulo, Brasil). As espécies de microalgas *Nannochloropsis oculata* (*Eustigmatophyceae*), *Amphora coffeaeformis* (*Bacillariophyceae*), *Chaetoceros gracilis* (*Bacillariophyceae*), *Isochrysis galbana* (*Prymnesiophyceae*), respectivamente catalogadas como NANN OCUL-1, AMPHCOFF, CHAEGRAC ISOCCALB. Foram obtidas da coleção do Laboratório de Ecologia de Fitoplâncton e Microrganismos Aquáticos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

4.6. Procedimento Experimental

4.6.1. Cultivo e colheita das microalgas

Todas as microalgas foram cultivadas em água do mar e fertilizante agrícola de baixo custo (marca Ouro Fértil) na Estação Marinha de Aqüicultura (EMA) da FURG. As células de *N. oculata* foram cultivadas em tanques de cultura de 1600 L. O meio de cultura utilizado nestes estudos consistiu em fertilizante comercial contendo sulfato de amônio, uréia, superfosfato de cálcio, cloreto férrico e vitaminas B1, B6 e B12.⁵³ Foram utilizadas as seguintes condições de cultura: salinidade de 28 PSU, temperatura média de 20 ° C e luz natural; o foto período utilizado para essas experiências foi de 12 h de luz e 12 h de escuridão. As células foram misturadas

borbulhando ar atmosférico através dos tanques, e as células foram concentradas por floculação utilizando um floculante comercial (copolímero catiônico sintético de acrilamida, Flopam® 4880, SNF Floerger, França) após 15 dias de crescimento.⁵⁴ As espécies de microalgas *A. coffeaeformis*, *C. gracilis* e *I. galbana* foram cultivadas a partir de seus respectivos inóculos em meio F/2-Guillard⁵⁵ no volume inicial de 200 mL, depois de 24 horas é repicado (adicionar meio nutritivo e aumentar o volume) para um Erlenmeyer de 2 litros que por sua vez foi repicado para um recipiente de 20 litros (**Figura 7a**), o volume de 20 litros de cultivo foi dividido para 4 recipientes de 20L e adicionado meio nutritivo (**Figura 7b**), cada recipiente de 20 L foi transferido para um tanque de 200L e adicionado fertilizante agrícola como meio nutritivo (**Figura 7c**) os quais foram monitorados como descrito no item 4.6.1 até o final do período de cultivo (**Figura 7d**). O meio de cultivo utilizado foi o mesmo empregado para a *N. oculata*.⁵³ Cinco tanques de 200 L, para cada espécie, foram mantidos em ambiente com condições controladas de iluminação constante (24 h), temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e salinidade de 25 PSU, foram cultivados por 15 dias (exceto para *I. galbana* que foram 21 dias de cultivo). Temperatura, pH, salinidade foram verificados duas vezes ao dia, utilizando multiparâmetro (YSI model ® 556 MPS-USA). A cada três dias amostras foram coletadas para quantificar: nitrogênio amoniacal total, fosfato e densidade celular. A determinação da densidade celular foi realizada com auxílio de uma Câmara de Neubauer e microscópio binocular Nikon E200 em 400 vezes.



Figura 7. Scaling-up do cultivo de microalgas

As células das três espécies foram concentradas por floculação da mesma forma descrita acima para *N. oculata*. As microalgas *A. coffeaeformis* e *I. galbana* foram floculadas com Tanfloc um polímero orgânico-catiônico de baixo peso molecular (**Figura 8**).

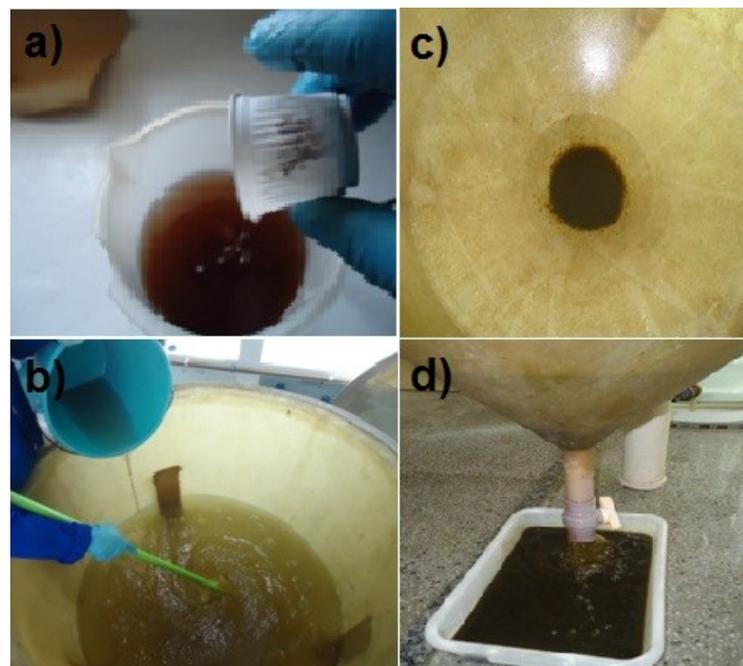


Figura 8. Colheita de microalgas por floculação

Após a colheita das quatro espécies, todas foram encaminhadas ao laboratório Kolbe da Escola de Química e Alimentos da FURG. Neste, todas as microalgas foram lavadas com solução de formiato de amônio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para remoção do sal do espaço intracelular das células, impedindo que a quantidade de sal fosse somada ao peso seco da biomassa total. Em seguida, as microalgas foram centrifugadas sucessivamente até 50% de umidade, e armazenadas em freezer a $-4 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.6.2. *Extração e determinação do teor de lipídeos*

As microalgas foram previamente secas a $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em estufa com circulação de ar. Em seguida, $0,5 \text{ g}$ de amostra e $1,5 \text{ mL}$ de $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (2:1 v/v) foram adicionados em um tubo de ensaio e colocado em banho de ultrassom por 20 min e centrifugado por 5 min. A fase orgânica foi coletada e o solvente evaporado a pressão reduzida até massa constante para obtenção da massa da fração lipídica e cálculo do teor de lipídeos (equação 1).^{8,56} Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

$$\text{Teor de lipídeos (\%)} = (\text{massa de lipídeos} \times 100) / \text{massa de amostra} \quad (1)$$

4.6.3. *Determinação do perfil de ácidos graxos derivados das microalgas*

A derivatização da fração lipídica das microalgas foi realizada de acordo com um estudo anterior.⁵⁷ Em um balão de 25 mL contendo fração lipídica (200 mg) foram adicionados 3 mL da solução de trifluoreto de boro/metanol. A mistura foi aquecida em banho de silicone a $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e mantida sob refluxo e agitação magnética durante 20 min. Em um funil de separação, a mistura derivatizada foi lavada com 15 mL de hexano e 20 mL de água destilada. As fases orgânica e aquosa foram então separadas. A fase orgânica contendo os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) foi seca e o solvente foi evaporado a $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Os perfis de ácidos graxos foram determinados por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (GC-MS, *Gas Chromatography with Mass Spectrometry*). Para as análises foi empregado um cromatógrafo a gás com detector de massa, modelo GC-MS-QP2010 Plus da Shimadzu, equipado com um injetor

split/splitless, fonte de ionização por Impacto de Elétrons (EI, *Electrons impact*), analisador de massa quadrupolo. Para separação cromatográfica usou-se uma coluna capilar de sílica fundida: 5% Crossbond difenil/95% de dimetil polisiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) RTX-5MS, marca Restek. A fase móvel utilizada foi gás Hélio (marca White Martins) grau 5.0 analítico (99,999% de pureza). Para aquisição dos dados foi obtida através do software *Shimadzu GC solution*. As condições cromatográficas empregadas foram: injeção de 1 µL a alta pressão (300 kPa); *razão split* 1: 100; *scan* de 30 a 500 m/z em 0,2 segundos; ionização por impacto de elétrons a 70 eV; temperatura do injetor de 250 °C; temperatura inicial do forno 80 °C (0 min), seguida por gradiente de 10 °C/min a 180 °C e depois 7 °C/min a 330 °C, com tempo de análise total de 32,43 min; interface 280 °C; fonte de íons 230 °C. Os analitos foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos seus respectivos padrões de referência e foram quantificados por normalização das áreas.⁴⁶

4.6.4. Método de micro-ondas para extração de lipídeos

Cada experimento foi realizado com 0,5 g de biomassa seca umidificada com água destilada (50% m/m em relação à biomassa) em um tubo apropriado de 35 mL e 1,5 mL de uma mistura de clorofórmio: metanol (2:1 v/v) foi adicionada a cada extração, o tubo foi submetido a irradiação de micro-ondas (300 W de potência) no modo Power Max. Em seguida, a fase orgânica foi cuidadosamente recolhida. O mesmo processo (adição de solvente e irradiação) foi realizado três vezes, e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida até peso constante. A fração lipídica total foi calculada conforme equação 1.^{8,56}

Um delineamento composto central 2² foi realizado para determinar a melhor condição de extração.⁵⁸ As variáveis foram tempo (1, 5,5 e 10 min) e temperatura (40, 60 e 80 °C). A melhor condição foi repetida triplicando a quantidade de biomassa para avaliar se a melhor condição seria mantida variando a massa de microalgas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata para a aplicação do teste de múltipla comparação de Tukey.

4.6.5. Análise de dados

O software Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA) foi utilizado para o planejamento experimental e análise estatística dos dados experimentais. A análise de variância (ANOVA) foi empregada para estimar os parâmetros estatísticos.

4.6.6. Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

As amostras de *N. oculata* analisadas por MEV foram os respectivos resíduos sólidos de microalgas após processos de extração por ultrassom e micro-ondas, conforme descrito nos itens 4.6.2 e 4.6.4. Além disso, também foi analisada uma amostra controle de *N. oculata* seca.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica da Zona Sul (CEME-SUL) da Universidade Federal do Rio Grande – FURG, com o espectrômetro (JEOL JSM 6010 LV) operando a 20 kV, com magnificação de 30k. As amostras foram depositadas num *stub* através de fita adesiva dupla face e em seguida recobertas com carbono. Para o revestimento, foi utilizado um equipamento da Dentun Vacuum, onde as amostras foram expostas durante 120 s a uma corrente de 19 mA.

4.6.7. Hidrólise-Esterificação

O processo de hidrólise-esterificação foi baseado no método desenvolvido por Alves-Sobrinho *et al.*⁴⁶ Primeiramente, foi aplicada a etapa de hidrólise à microalga *Chlorella sp.* umidificada com água até obter 50% (m/m em relação a biomassa seca) de umidade e otimizada as condições de esterificação. Em um segundo momento, foi otimizada as condições de hidrólise utilizando a biomassa úmida de *N. oculata*.

4.6.7.1. Hidrólise da biomassa umidificada

Em um total de 40 g de *Chlorella sp.* seca foi adicionada 20 g de água destilada, foi misturado num balão de 3 bocas; 20% de ácido sulfúrico (m/m de biomassa seca) foi usado como catalisador; 200 mL de hexano foi adicionado como co-solvente; a reação foi realizada a 100 °C sob agitação mecânica e refluxo durante 4 horas. Após a reação, a mistura foi filtrada a vácuo num funil de vidro sinterizado

para separar a biomassa úmida. Em seguida, adicionou-se 200 mL de hexano à biomassa, agitou-se a mistura e filtrou-se novamente. As frações orgânicas contendo o ácido graxo bruto foram evaporadas sob pressão reduzida a 60 °C para remover o hexano até massa constante para esterificação subsequente.

4.6.7.2. Reação de esterificação

Os ácidos graxos brutos foram submetidos à esterificação na presença de metanol na razão molar 30:1 (álcool:ácido graxo); foram testados os catalisadores ácidos H_2SO_4 e $\text{H}_2\text{NSO}_3\text{H}$ ⁵⁹, 10 e 20% (m/m de biomassa seca) respectivamente; tempo reacional de 1 e 4 horas; e temperatura de 60 e 100 °C. Quando a reação estava completa, a mistura reacional foi neutralizada com uma solução de NaOH/metanol e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi tratado com hexano (100 mL) durante 120 min, e a fração solúvel em hexano (contendo os FAMES) foi separada da fração aquosa (resíduo) por filtração a vácuo com funil de vidro sinterizado, o filtrado foi seco com MgSO_4 anidro e o solvente foi removido sob pressão reduzida a 60 °C até massa constante. A reação foi monitorizada por cromatografia em camada delgada, realizada em placas de vidro revestidas com sílica gel. Utilizou-se como eluente uma mistura de hexano: éter dietílico (80:20 v/v) e os produtos foram revelados utilizando vapor de iodo.

O teor de ésteres das amostras foi determinado seguindo o método europeu de referência para determinação do teor de ésteres metílicos de ácidos graxos EN 14103.⁵⁹ A escolha da condição ideal de reação foi feita após aplicação do teste de múltipla comparação de Tukey, usado para indicar a diferença significativa entre as diferentes temperaturas e tempos de reação estudados, com nível de 95% de significância adotada para todas as médias comparadas.

4.6.7.3. Hidrólise da biomassa úmida

Para este estudo foi usado 4,5 g de pasta úmida de *N. oculata* (equivalente a 3,0 g de biomassa seca e 50% em massa de água). Além do co-solvente hexano (10 mL), foi investigado o potencial da acetona como solvente dispersor. Um delineamento composto central 2³ foi realizado para determinar a melhor condição de hidrólise.⁵⁷ As variáveis foram volume acetona (5, 7,5 e 10 mL), quantidade de

H₂SO₄ (10, 20 e 30% em relação a biomassa seca) e tempo de reação (1, 2,5 e 4 horas). Ao final de cada experimento, a mistura reacional foi tratada conforme descrito no item 4.6.7.1 deste trabalho, para posterior esterificação seguindo a condição ótima obtida a partir do item 4.6.7.2.

4.6.7.4. Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para núcleos ¹H e ¹³C

Amostras dos FAMES das microalgas *Amphora coffeaeformis*, *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Nannochloropsis oculata* foram caracterizados por RMN. Os experimentos de ressonância magnética nuclear para núcleos ¹H e ¹³C foram realizados no Centro Integrado de Análises (CIA-FURG), utilizando um espectrômetro Bruker Ascend 400 MHz. As amostras foram dissolvidas em Clorofórmio deuterado (CDCl₃), e os ensaios realizados à temperatura ambiente. Os deslocamentos químicos são indicados em δ (ppm) a partir do padrão interno de tetrametilsilano (TMS) e as constantes de acoplamento (*J*) são relatadas em Hz.

4.6.8. Transesterificação do extrato lipídico

A transesterificação dos extratos lipídicos obtidos tanto pelo processo de extração convencional (item 4.6.2) quanto por extração via irradiação de micro-ondas (item 4.6.4) foi realizada utilizando 10% de H₂SO₄ como catalisador (em relação a massa de lipídeos), sob refluxo e agitação constante durante 4 h a 100 °C. Quando a reação estava completa, o excesso de álcool foi evaporado sob pressão reduzida e adicionou-se hexano. A mistura foi filtrada sob vácuo. O filtrado foi separado e seco com MgSO₄ anidro. O hexano foi removido sob pressão reduzida a 60 °C para se obter os FAMES.³⁶

4.6.9. Transesterificação “in situ”

Neste processo, foram misturados 10 g de biomassa seca e 30 ml de metanol com 20 % de H₂SO₄ (m/m de biomassa seca) como catalisador em um balão de 3 bocas. A reação foi realizada sob agitação mecânica e refluxo, nas mesmas condições de tempo, temperatura e tratamento após o final da transesterificação descritas no item 4.6.8.

4.6.10. Conversão de FAMES

A conversão de FAMES foi realizada com base nos trabalhos realizados por Im et al.^{42,61} Para investigar a quantidade máxima de FAMES nas diferentes espécies de microalgas estudadas no presente trabalho foram realizadas extrações conforme descrito no item 4.6.2, em seguida os respectivos extratos lipídicos foram transesterificados e tratados segundo o item 4.6.8 deste trabalho. O preparo da amostra: 100 mg de biodiesel diluída em 1 mL do padrão interno Heptadecanoato de metila (C17:0) na concentração de 10000 mg L⁻¹ preparado em heptano.

Para a análise de conversão de FAMES foi utilizado um cromatógrafo a gás modelo GC-2010 da Shimadzu, equipado com detector por ionização em chama (GC-FID, *Gas Chromatography with Flame Ionization Detection*), injetor do tipo *split/splitless*; e amostrador automático. Para separação cromatográfica foi usada uma coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária de 100% Polietilenoglicol (PEG) e dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (RTX-Wax marca Restek). Sistema para aquisição de dados através do software *Shimadzu GC solution*. Os gases usados no sistema cromatográfico foram: hidrogênio, nitrogênio, e ar sintético, todos da marca White Martins, grau 5.0 analítico e pureza de 99,999%. Condições cromatográficas: temperatura do injetor 250 °C; forno 200 °C (separação isocrática); detector 250 °C; tempo total cada análise de 30 min. A conversão de FAMES foi calculada com base na razão entre a área do sinal do padrão interno C17:0 e o somatório das áreas dos sinais dos FAMES produzido a partir de microalgas.⁶⁰ Em seguida, o teor de conversão pôde ser obtido dividindo a massa de FAMES determinada experimentalmente pela quantidade máxima de FAMES (equação 2).⁶¹

$$\text{Conversão FAMES} = \frac{\text{massa obtida de FAMES}}{\text{máximo de FAMES}} \times 100 (\%) \quad (2)$$

4.7. Representação dos processos para produção de FAMES derivado de microalgas empregados neste trabalho

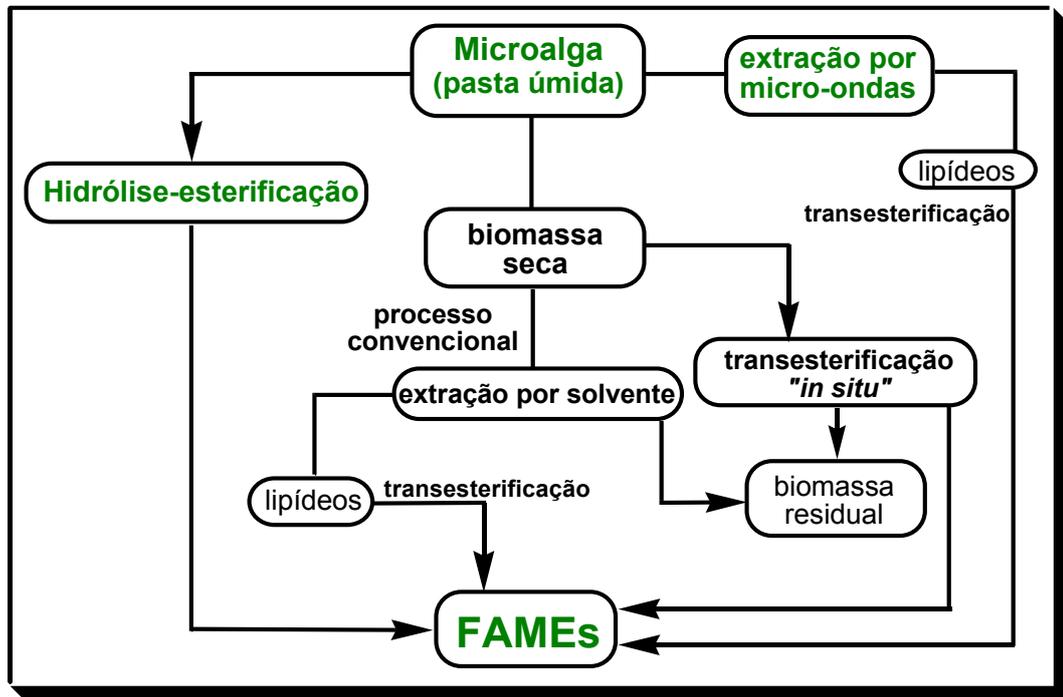


Figura 9. Processos empregados para produção de FAMES de microalgas

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cultivo de microalgas

Os resultados de densidade celular média para as microalgas *N. oculata*, *A. coffeaeformis*, *C. gracilis* e *I. galbana* foram $6715(\pm 7,9) \times 10^6$ cel L⁻¹ (**Figura 10**), $60,18(\pm 1,7) \times 10^6$ cel L⁻¹ (**Figura 11**), $9642(\pm 3,1) \times 10^6$ cel L⁻¹ (**Figura 12**) e $10226(\pm 5,0) \times 10^6$ cel L⁻¹ (**Figura 13**), respectivamente. São observados nos gráficos que os cultivos foram interrompidos ainda na fase exponencial, exceto o cultivo de *A. coffeaeformis* que encontrava-se na fase de declínio da densidade celular. As fontes de nitrogênio e fósforo são fatores limitantes do crescimento celular, as microalgas são capazes de realizar *consumo luxuriante* de fósforo, cerca de 8 a 16 vezes mais que a quota mínima do elemento.⁵ No caso da *A. coffeaeformis* o fosfato de cálcio havia sido quase totalmente consumido, no 15º dia a concentração de fosfato no meio era menos de 1mg L⁻¹, este deve ser o provável motivo para este cultivo ter entrado na fase estacionária e logo em declínio e baixa densidade celular.

Borges-Campos *et al.*⁶² avaliou 10 espécies de microalgas quanto ao crescimento e à composição química, cultivadas em meio Conway durante 10 dias, dentre essas microalgas a *N. oculata* que apresentou densidade celular média de 7860×10^6 cel L⁻¹. Nguyen-Deroche *et al.*⁶³ cultivou *A. coffeaeformis* por 5 dias em água do mar artificial, a maior densidade alcançada foi de $670(\pm 3,7) \times 10^6$ cel L⁻¹. Moura Junior *et al.*⁵⁹ avaliou a composição química de *C. gracilis* e *I. galbana* cultivadas de acordo com a metodologia utilizada pela Empresa Aqualider, meio de cultivo f/2, as análises de densidades foram realizadas no início da fase exponencial de crescimento, os resultados encontrados foram $2450(\pm 70,7) \times 10^6$ cel L⁻¹ para *C. gracilis* e 3295×10^6 cel L⁻¹ para *I. galbana*. É difícil comparar densidades celulares, mesmo em condições idênticas de cultivo, mas foi observado que os resultados obtidos não estão discrepantes com a literatura, exceto para *A. coffeaeformis*.

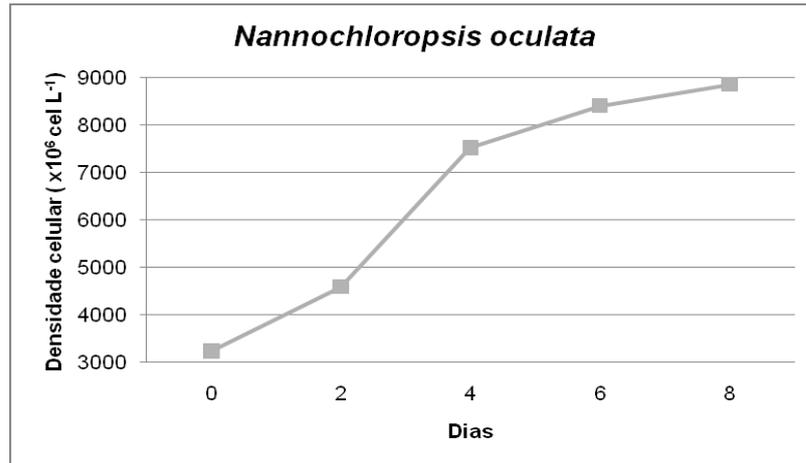


Figura 10. Densidade celular do cultivo de *N. oculata* ($\times 10^6 \text{ cel L}^{-1}$) em meio fertilizante.

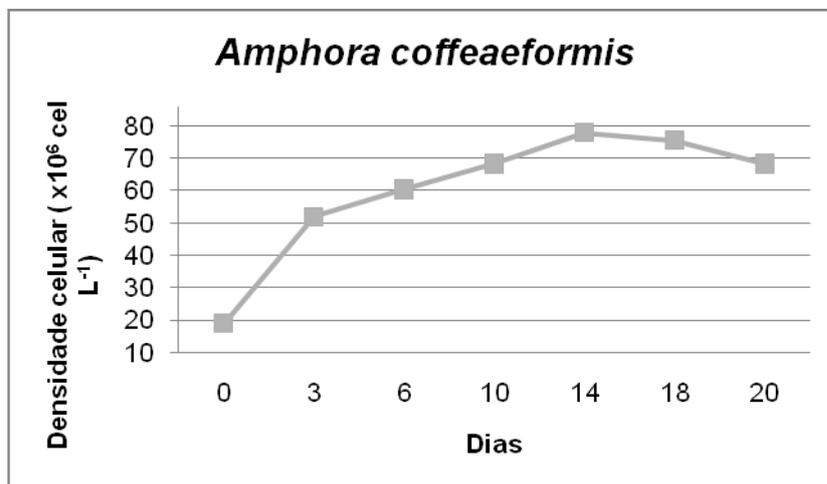


Figura 11. Densidade celular do cultivo de *A. coffeaeformis* ($\times 10^6 \text{ cel L}^{-1}$) em meio fertilizante.

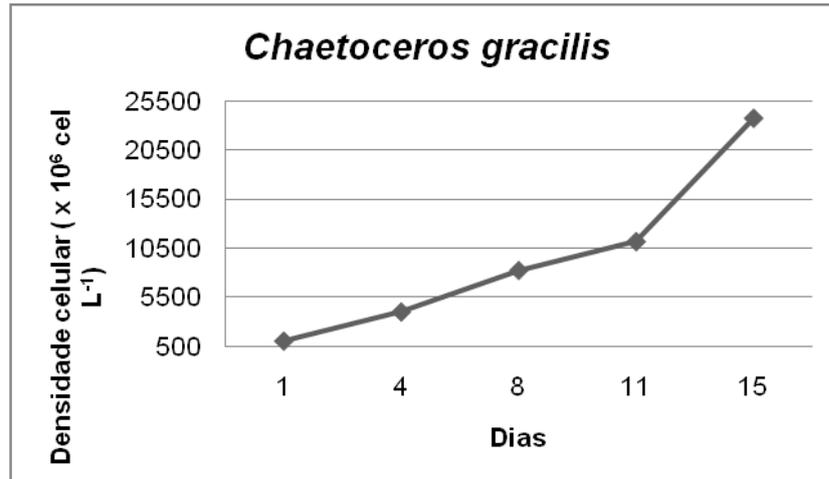


Figura 12. Densidade celular do cultivo de *C. gracilis* ($\times 10^6$ cel L^{-1}) em meio fertilizante.

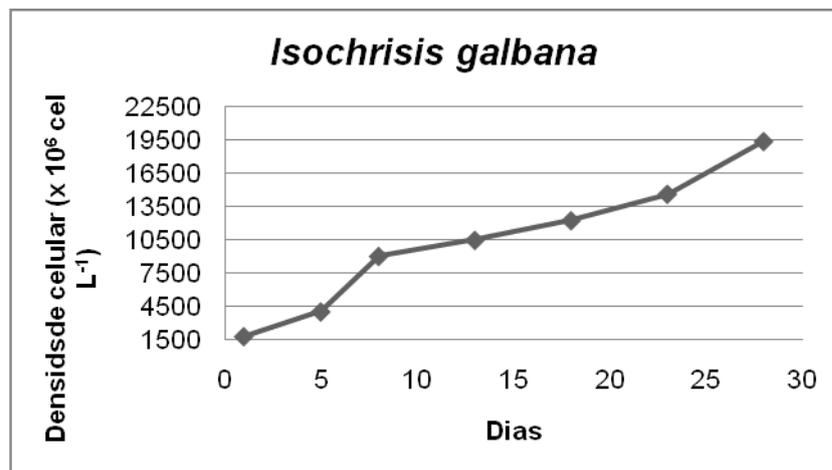


Figura 13. Densidade celular do cultivo de *I. galbana* ($\times 10^6$ cel L^{-1}) em meio fertilizante.

As paredes celulares das microalgas possuem carga negativa, esta carga está relacionada com a presença de grupos carboxila, sulfato ou fosfato na superfície das células das microalgas, possibilitando que as células fiquem em suspensão.²⁸ Na colheita das microalgas a função do floculante catiônico foi neutralizar a carga negativa da parede celular das microalgas e reduzir a repulsão elétrica entre elas, causando assim a agregação das células e formação de aglomerados pesados que sedimentaram no fundo dos tanques.

As figuras 14, 15 e 16 mostram cada espécie de microalga sendo concentradas, através de sucessivas centrifugações, até alcançar em torno de 50%

em massa de água em relação à massa de microalga seca. O rendimento dos cultivos, em gramas de células secas, para as microalgas *N. oculata*, *A. coffeaeformis*, *C. gracilis* e *I. galbana* foram aproximadamente 46,70 g, 170 g, 100 g e 180 g, respectivamente.



Figura 14. Microalga *A. coffeaeformis*: a) biomassa sem centrifugar; b) primeira centrifugação; c) biomassa com 50% de umidade (m/m).

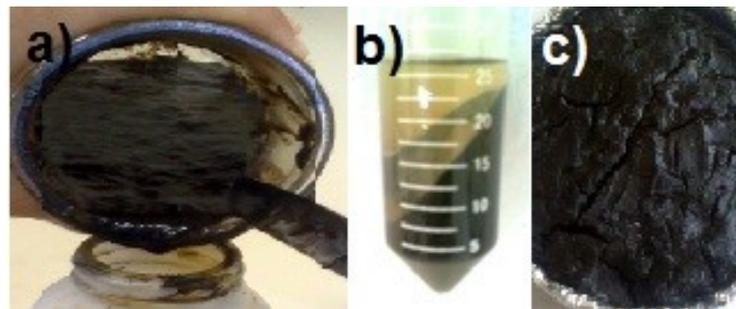


Figura 15. Microalga *C. gracilis*: a) biomassa sem centrifugar; b) primeira centrifugação; c) biomassa com 50% de umidade (m/m).

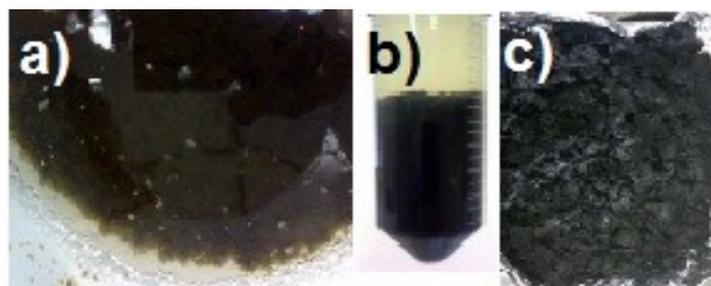


Figura 16. Microalga *I. galbana*: a) biomassa sem centrifugar; b) primeira centrifugação; c) biomassa com 50% de umidade (m/m).

5.1.1. Determinação do teor de lipídeos e perfil de ácidos graxos

A extração, determinação do teor de lipídeos, derivatização da fração lipídica e perfil de ácidos graxos foram realizados utilizando CHCl_3 :MeOH (2:1 v/v) para as

quatro microalgas cultivadas como descrito nos itens 4.6.2 e 4.6.3 deste trabalho, respectivamente. O teor de lipídeos obtidos para as microalgas *A. coffeaeformis*, *C. gracilis*, *I. galbana* e *N. oculata* foram 15,91(\pm 0,08)%, 23,6(\pm 0,54)%, 18,25(\pm 1,2)% e 28,51(\pm 0,7)% respectivamente. A Tabela 3 apresenta o perfil de ácidos graxos para as microalgas *A. coffeaeformis*, *C. gracilis*, *I. galbana* e *N. oculata*. A microalga *A. coffeaeformis* apresentou como majoritários os ácidos graxos C14:0, C16:1 e C16:0 (ordem decrescente de percentual); a *C. gracilis* apresentou como majoritários os ácidos graxos C14:0, C16:1 e C16:3; a *I. galbana* apresentou como majoritários os ácidos graxos C18:1c, C16:0 e C14:0; e por sua vez a microalga *N. oculata* apresentou como majoritários os ácidos graxos C16:0, C16:1 e C20:5. De acordo com a literatura, as microalgas *A. coffeaeformis*, *I. galbana* e *N. oculata* possuem dentre os seus ácidos graxos majoritários o ácido palmítico e, no caso da *I. galbana*, incluí-se também o ácido oléico como majoritário, característica comum da maioria dos óleos vegetais empregados para produção comercial de biodiesel.⁹

Após a extração e a determinação do teor de lipídeos utilizando método convencional com ultrassom, foi confirmado o potencial dessas espécies para estudo, pois possuíam paredes celulares distintas, teor de lipídeos considerável e perfil graxo promissor para produção de biodiesel. Visando métodos rápidos, eficientes e robustos para se trabalhar com a biomassa úmida das quatro microalgas cultivadas deu-se seguimento a este trabalho.

Tabela 3. Perfil graxo das microalgas cultivadas neste trabalho usando fertilizante comercial

Ácido graxo	<i>A. coffeaeformis</i>	<i>C. gracilis</i>	<i>I. galbana</i>	<i>N. oculata</i>
Mirístico (C14:0)	16,5 (±0,1)	25,9 (±2,4)	17,2 (±0,5)	4,4 (±0,1)
Pentadecanóico (C15:0)	*	*	*	*
Palmitico (C16:0)	22,6 (±0,2)	8,3 (±1,0)	17,3 (±0,9)	31,3 (±0,6)
Palmitoleico (C16:1 ω 7c)	33,6 (±0,6)	27,9 (±0,2)	10,6 (±1,1)	24,2 (±0,2)
Hexadecatrienóico (C16:3 ω 3c)	6,9 (±0,1)	24,9 (±1,9)	*	*
Esteárico (C18:0)	*	*	*	*
Oléico (C18:1 ω 9c)	1,9 (±0,1)	*	28,0 (±3,8)	6,9 (±0,2)
Elaídico (C18:1 ω 9t)	1,0 (±0,0)	1,5 (±0,4)	8,2 (±0,4)	*
Linoléico (C18:2 ω 6c)	2,4 (±0,2)	*	13,6 (±0,6)	2,3 (±0,1)
Araquidônico (C20:4 ω 6)	2,5 (±0,1)	*	*	3,4 (±0,2)
Eicosapentaenóico (C20:5 ω 3)	10,6 (±0,5)	8,2 (±1,9)	*	25,5 (±0,3)
Docosaheptaenóico (C22:6 ω 3)	*	*	1,8 (±0,3)	*
Tetracosanóico (C24:0)	*	*	*	*
Outros ácidos ¹	1,7 (±0,1)	3,3 (±0,9)	3,4 (±1,3)	2,1 (±0,1)
Total saturados	39,9 (±0,4)	35,4 (±3,7)	36,7 (±2,3)	37,3 (±0,8)
Total insaturados	36,5 (±0,7)	30,2 (±0,7)	47,1 (±5,5)	31,7 (±0,4)
Total ω 3 e ω 6 ácidos graxos	22,8 (±0,9)	34,4 (±4,4)	16,2 (±1,3)	31,1 (±0,6)

* Não detectado ou valor inferior a 1. ¹Σácidos graxos minoritários.

5.2. Desenvolvimento do método de micro-ondas para extração de lipídeos de biomassa úmida

5.2.1. Delineamento composto central 2²

Para obtenção das melhores condições de extração dos lipídeos por irradiação de micro-ondas foi realizado um delineamento composto central 2², com um total de 7 ensaios (três repetições no ponto central), foi investigado as variáveis tempo e temperatura.⁵⁸ A Tabela 4 mostra as condições experimentais e os rendimentos para as extrações de lipídeos. Observou-se que os maiores rendimentos foram obtidos nos ensaios 3 e 4. No ensaio 3 a amostra foi submetida a irradiação durante 1min (nível -1) a 80 ° C (nível +1) obtendo 30,18% de extrato lipídico, já no ensaio 4 a amostra foi submetida à mesma temperatura (nível +1) mas por um período de tempo mais longo, 10 minutos (nível +1) de irradiação, extraíndo 31,62% de lipídeos.

A Figura 17 apresenta os efeitos das variáveis nas extrações de lipídeos. O gráfico demonstra o efeito positivo para as variáveis tempo e temperatura, e também a interação positiva entre as variáveis. Observou-se que ambas as variáveis tiveram efeito significativo nas extrações lipídicas, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), mas a variável temperatura exerceu um efeito consideravelmente maior sobre a extração lipídica frente à variável tempo. Outros estudos também apresentaram efeito positivo da temperatura em extrações de lipídeos, por exemplo, a presença de triacilgliceróis é maior a temperaturas elevadas combinadas com tempos de extração mais curtos.^{39,40,65} O aumento da temperatura é devido às forças de atrito dos movimentos inter e intracelular.⁶⁶ Conseqüentemente, o aquecimento intracelular faz com que o vapor de água provoque a ruptura celular, liberando o conteúdo lipídico.³¹

Outro fato a se considerar é que a composição do biodiesel de microalgas varia de acordo com os ácidos graxos que os compõem, espécie de microalga e muitas vezes também difere de acordo com a forma de colheita da biomassa algácea e de extração da fração lipídica.⁷⁰ Com o objetivo de avaliar se os diferentes tempos aos quais as amostras estavam sendo expostas a irradiação de micro-ondas teria influência em seus perfis graxo foi realizada a análise do perfil de ácidos graxo para as amostras que apresentaram maior rendimento lipídico (ensaios 3, 4 e 5, **Tabela 4**) e seus respectivos perfis foram comparados entre si e com o perfil de uma

amostra extraída aplicando o método convencional. Para determinação do perfil graxo as amostras foram derivatizadas conforme descrito no item 4.6.3. Pode-se observar na Tabela 5 que quanto maior o tempo de exposição da amostra a irradiação de micro-ondas observou-se uma diminuição gradativa no percentual de ácidos graxos poliinsaturados (ω 3 e ω 6) e insaturados. Esta constatação comprova que a condição ideal escolhida para a extração de lipídeos a partir de biomassa algácea úmida é o nível -1 para a variável tempo e o nível +1 para a variável temperatura, que correspondem aos valores de 1 min de irradiação de micro-ondas a 80 °C (ensaio 3, **Tabela 4**), pois trata-se da condição mais eficaz de extração, quando se considera a relação tempo e temperatura, além de não influenciar no perfil dos ácidos graxos da amostra quando comparado com as demais condições estudadas. Cabe ressaltar que ao comparar a condição determinada como ideal para extração de lipídeos por micro-ondas com o método convencional os perfis de ácidos graxos foram muito similares. Com 1 min de irradiação de micro-ondas a 80 °C foi encontrado 29,78(\pm 0,67)% do ácido eicosapentaenóico (C20:5) que é comumente encontrado em quantidades mensuráveis em lipídeos de *N. oculata*.^{46,70}

Tabela 4. Matriz do delineamento composto central 2² com valores codificados, os valores reais (entre parênteses) e respectivos rendimentos.

Ensaio	Tempo, min	Temperatura, °C	Biomassa, g	Lipídeos, g	Rendimento, %
1	-1 (1)	-1 (40)	0,54	0,16	28,83
2	+1 (10)	-1 (40)	0,53	0,15	28,23
3	-1 (1)	+1 (80)	0,52	0,16	30,18
4	+1 (10)	+1 (80)	0,50	0,16	31,62
5	0 (5,5)	0 (60)	0,50	0,15	29,04
6	0 (5,5)	0 (60)	0,50	0,12	24,54
7	0 (5,5)	0 (60)	0,50	0,14	27,95

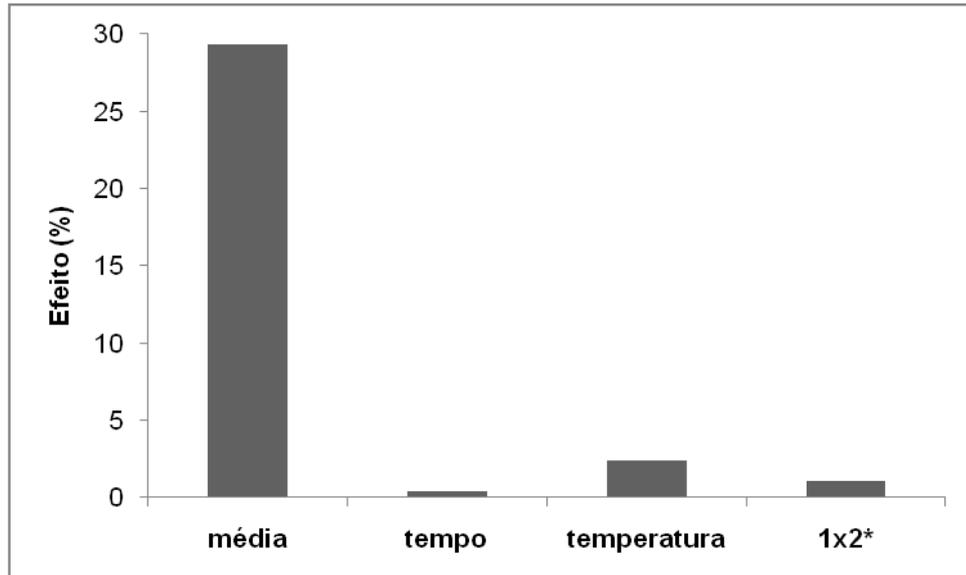


Figura 17. Estimativas dos efeitos do tempo e da temperatura na extração lipídica. Efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) para a extração lipídica; *Interação entre as variáveis.

Tabela 5. Perfil de ácidos graxos (%) da fração lipídica da microalga *N. oculata* extraído pelos métodos micro-ondas (em diferentes condições) e por ultrassom.

Ácido Graxo	Condições de extração assistida por micro-ondas			Ultrassom
	1 min a 80 °C	5,5 min a 60 °C	10 min a 80 °C	20 min Temp. amb.
Mirístico (C14:0)	3,8 (±0,1)	11,8 (±0,3)	13,8 (±0,2)	3,8 (±0,2)
Pentadecanóico (C15:0)	*	2,1 (±0,1)	2,4 (±0,0)	*
Palmítico (C16:0)	25,8 (±0,2)	37,2 (±0,4)	42,9 (±0,9)	27,3 (±1,0)
Palmitoleico (C16:1 ω 7c)	24,7 (±0,2)	18,3 (±0,4)	15,2 (±0,2)	25,8 (±1,5)
Heptadecanóico (C17:0)	*	1,4 (± 1,2)	2,4 (±0,1)	*
Esteárico (C18:0)	*	1,2 (±0,0)	1,5 (±0,1)	*
Oléico (C18:1 ω 9c)	7,4 (±0,1)	7,9 (±0,2)	6,3 (±0,1)	8,0 (±0,1)
Linoléico (C18:2 ω 6c)	2,8 (±0,1)	3,3 (±0,1)	2,6 (±0,1)	2,8 (±0,1)
Araquidônico (C20:4 ω 6)	4,0 (±0,2)	2,9 (±0,1)	1,8 (±0,0)	3,6 (±0,3)
Eicosapentaenóico (C20:5 ω 3)	29,8 (±0,7)	11,4 (±0,4)	8,0 (±0,7)	27,8 (±2,0)
Outros ácidos ¹	1,6 (±0,3)	2,4 (±0,1)	3,2 (±0,1)	0,9 (±0,2)
Total saturados	30,9 (±0,5)	55,3 (±2,1)	65,4 (±1,3)	31,1 (±1,2)
Total insaturados	32,5 (±0,3)	27,1 (±0,7)	22,2 (±0,4)	33,9 (±1,6)
Total ω 3 e ω 6 ácidos graxos	36,6 (±0,9)	17,7 (±0,6)	12,4 (±0,2)	31,4 (±2,3)

* Não detectado ou valor inferior a 1. ¹Σácidos graxos minoritários.

Visando avaliar se variando a quantidade de biomassa haveria influência na eficiência do método, extrações em triplicata com 0,5 g de biomassa e o triplo de massa (1,5 g biomassa seca, mais 0,75 g de água) foram realizadas. Em seguida, aplicou-se o teste de Tukey, o teste não mostrou diferença significativa entre os resultados. Portanto, o método mostrou-se robusto frente à variação de massa (**Tabela 6**, entradas 1-6).

Pode-se observar na Tabela 6 (entradas 4-6) que a extração por micro-ondas atingiu maior rendimento, com diferença significativa em comparação com o rendimento da extração por ultrassom (entradas 7-9). Comparando os tempos de extração por micro-ondas e ultrassom, o método por micro-ondas mostrou-se mais vantajoso, uma vez que seu tempo de extração é de 1 min enquanto que o tempo de extração pelo método por ultrassom é de 20 min.

Outras pesquisas mostram extrações por micro-ondas empregando a microalga *Nannochloropsis oculata*, no entanto, aplicam tempos totais superiores a três minutos e potência superiores a 300 W.^{39,40} McMillan *et al.*³⁹ Utilizou uma potência de micro-ondas de 1025 W, ajustou a temperatura a 90 °C e aplicou irradiação em ciclos de 30 s seguido de resfriamento, totalizando um tratamento de 20 min. Ali & Watson⁴⁰ obteve o maior rendimento lipídico após 5 min de tratamento, foi 0,052 g/g de biomassa seca para 1021 W de potência alcançando 92,81% de ruptura celular. Os principais ácidos graxos livres presentes na composição dos lipídeos extraídos de *N. oculata* foram o ácido oléico (C18:1), palmítico (C16:0) e linoléico (C18:2), os autores declararam que o ácido eicosapentaenóico (C20:5) pode ser encontrado em quantidades mensuráveis em *N. oculata*, entretanto, não foi medido neste caso.⁴⁰

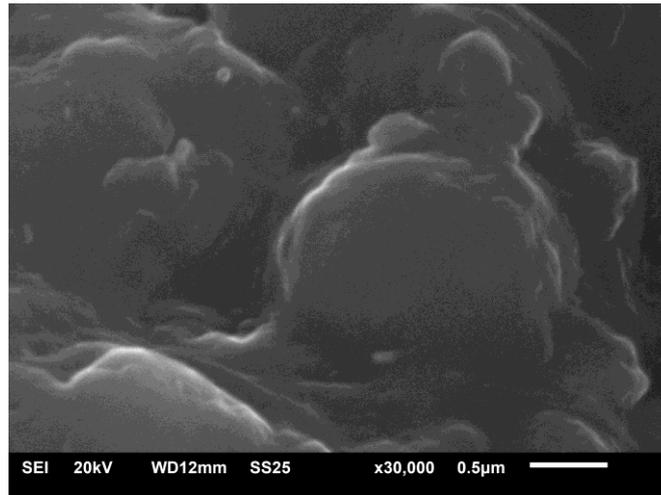
Portanto, a radiação por micro-ondas é indicada como ideal para a extração de lipídeos de biomassa úmida de microalgas porque a constante dielétrica da água assegura que a energia térmica seja transferida para as paredes celulares de forma mais eficiente com o aquecimento por radiação de micro-ondas.⁴⁰ Além disso, Naghdi *et al.*⁶⁵ relata que atualmente as extrações assistidas por micro-ondas são avaliadas como um método econômico para a extração de lipídeos a partir de biomassa úmida de microalgas com base em tempos de reação curtos, extraindo lipídeos de alta qualidade.

Tabela 6. Rendimento de lipídeos de *N. oculata* extraídos, médias com desvio padrão e teste de Tukey.

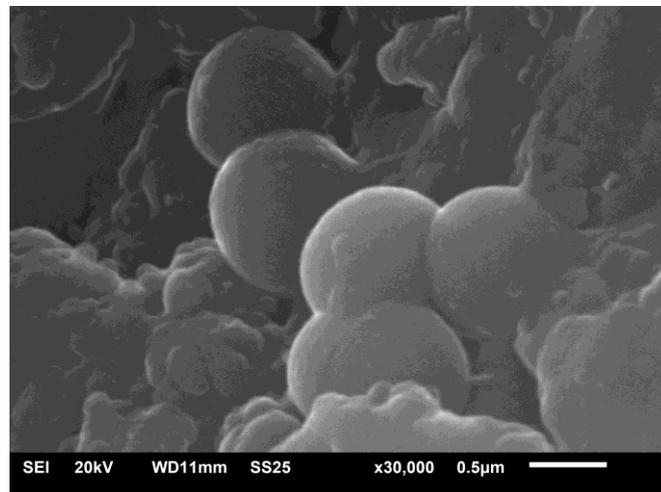
Entrada	Massa, g	Método de extração ¹	Rendimento, %	Média ²
1	0,5		30,31	
2	0,5	Micro-ondas	29,39	31,72 ±3,3 ^a
3	0,5	(1min, 80 °C)	35,47	
4	1,5		36,26	
5	1,5	Micro-ondas	33,47	33,6 ±2,6 ^a
6	1,5	(1min, 80 °C)	31,07	
7	1,5		27,61	
8	1,5	Ultrassom	29,12	28,51 ±0,8 ^b
9	1,5	(20 min, 25 °C)	28,81	

¹Três vezes cada tempo de extração. ²As médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

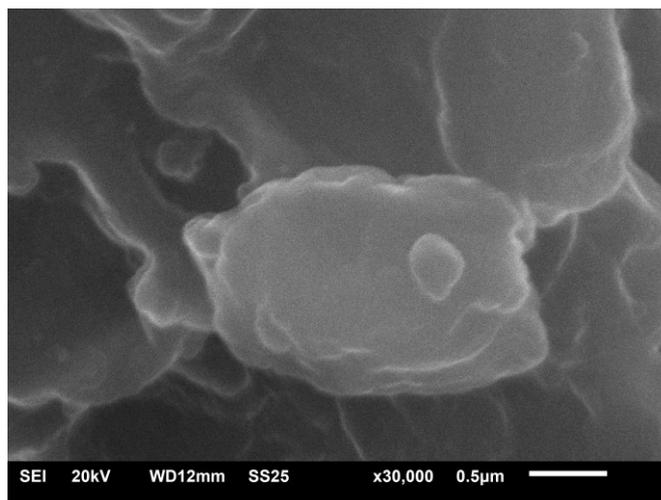
Foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) nas tortas residuais da microalga *N. oculata* depois de submetida à extração de lipídeos por ultrassom, micro-ondas, também foi analisada uma amostra controle da microalga em pó sem sofrer nenhum tratamento de extração. Os dados de MEV mostraram as alterações na morfologia das microalgas (**Figura 18, A-C**). O tratamento com micro-ondas mostrou (**Figura 18, C**) múltiplos danos às células, causando ruptura celular, levando a rachaduras, fragmentações e grandes detritos, ou seja, um exemplo típico de dano celular induzido por micro-ondas. Portanto, houve uma destruição visível em um tempo menor de tratamento.³⁹ Considerando que a amostra que sofreu tratamento com ultrassom (**Figura 18, B**) apresenta uma morfologia celular mais esférica, característica de células de *N. oculata*⁷¹ além de isenta de fragmentos finos (**Figura 18, A**).



A



B



C

Figura 18. Imagens MEV da biomassa de *N. oculata*: A) biomassa seca, B) resíduo de biomassa após extração por ultrassom, C) resíduo de biomassa após extração por micro-ondas

Para aplicação do método de micro-ondas em biomassa algácea úmida, foi pesado 1,5 g de biomassa úmida (equivalente a 1 g de biomassa seca). O teor de lipídeos obtido no método de extração por micro-ondas (entradas 1-3, 7-9, 13-15) é apresentado na Tabela 7 e comparado com os rendimentos das extrações através do método via ultrassom utilizando biomassa seca (entradas 4-6, 10-12, 16-18). Pode-se observar que não houve diferença significativa nos rendimentos lipídicos para as três microalgas. No entanto, deve-se considerar que o método por micro-ondas é consideravelmente mais rápido frente ao método por ultrassom, além de ser aplicado diretamente em biomassa algácea úmida, diminuindo o número de operações unitárias. Esses resultados foram superiores quando comparados ao teor lipídico encontrado em outros estudos.^{67,68,69} Portanto, o método de extração por micro-ondas provou ser eficaz também para a biomassa úmida de diferentes espécies de microalgas.

Tabela 7. Aplicação do método por micro-ondas para a extração de lipídeos da biomassa úmida de microalgas. Rendimento de lipídeos extraídos, médias com desvio padrão e teste de Tukey.

Entrada	Massa ¹ , g	Microalgas	Método	Rend %	Média ⁴
1	1,5	<i>Amphora coffeaeformis</i>	úmida ² Micro-ondas (1min, 80 °C)	17,91	16,27 ±1,5 ^a
2	1,5			14,83	
3	1,5			16,27	
4	1,0		seca ³ Ultrassom (20 min, 25 °C)	16,00	
5	1,0			15,84	
6	1,0			15,91	
7	1,5	<i>Chaetoceros gracilis</i>	úmida ² Micro-ondas (1min, 80 °C)	21,96	22,31 ±2,5 ^b
8	1,5			25,01	
9	1,5			19,95	
10	1,0		seca ³ Ultrassom (20 min, 25 °C)	23,68	
11	1,0			23,03	
12	1,0			24,09	
13	1,5	<i>Isochrysis galbana</i>	úmida ² Micro-ondas (1min, 80 °C)	17,13	19,87 ±2,4 ^c
14	1,5			21,23	
15	1,5			21,24	
16	1,0		seca ³ Ultrassom (20 min, 25 °C)	18,40	
17	1,0			19,38	
18	1,0			16,97	

¹Equivalente a 1 g de biomassa seca. ²Microalgas coletadas por floculação e centrifugadas para formar uma pasta de algas com 50% de umidade. ³Microalgas secas em estufa a 60 °C até peso constante, maceradas e peneiradas. ⁴As médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Na Tabela 8 é apresentado o perfil de ácidos graxos (%) das microalgas *A. coffeaeformis*, *C. gracilis* e *I. galbana* por ambos os métodos de extração, micro-ondas e ultrassom. Pode-se observar que há uma grande semelhança entre os perfis graxos de uma mesma microalga. Portanto, o método de extração por micro-ondas, na condição de 1 min de irradiação a 80 °C, não degradou os ácidos graxos das microalgas *A. coffeaeformis*, *C. gracilis* e *I. galbana*.

Tabela 8. Perfil de ácidos graxos (%) das microalgas *A. coffeaeformis*, *C. gracilis* e *I. galbana* pelos métodos de extração de micro-ondas e ultrassom

Ácido graxo	<i>A. coffeaeformis</i>		<i>C. gracilis</i>		<i>I. galbana</i>	
	micro-ondas	ultrassom	micro-ondas	ultrassom	micro-ondas	ultrassom
Mirístico (C14:0)	22,4 (±1,5)	22,2 (±0,2)	27,1 (±0,1)	28,3 (±0,1)	17,6 (±0,3)	16,6 (±0,4)
Pentadecanóico (C15:0)	1,0 (±0,1)	1,2 (±0,0)	*	1,2 (±0,0)	*	*
Palmítico (C16:0)	28,8 (±0,3)	27,9 (±0,1)	11,9 (±0,1)	12,8 (±0,2)	18,1 (±0,3)	15,9 (±0,1)
Palmitoleico (C16:1 ω 7c)	36,1 (±1,1)	35,1 (±0,1)	35,7 (±0,7)	37,2 (±0,1)	11,6 (±0,4)	10,8 (±0,7)
Hexadecatrienóico (C16:3 ω 3c)	2,6 (±0,2)	3,3 (±0,1)	17,6 (±0,2)	15,0 (±0,4)	*	*
Esteárico (C18:0)	*	*	*	1,0 (±0,0)	1,0 (±0,0)	*
Oléico (C18:1 ω 9c)	2,3 (±0,1)	2,4 (±0,1)	*	*	24,6 (±0,8)	28,6 (±0,3)
Elaídico (C18:1 ω 9t)	1,9 (±0,1)	1,8 (±0,1)	1,7 (±0,1)	*	8,6 (±0,1)	7,3 (±0,2)
Linoléico (C18:2 ω 6c)	1,2 (±0,1)	1,6 (±0,1)	*	*	13,0 (±0,2)	15,4 (±0,1)
Araquidônico (C20:4 ω 6)	*	*	*	*	*	*
Eicosapentaenóico (C20:5 ω 3)	1,0 (±0,1)	1,7 (±0,0)	3,0 (±0,1)	1,1 (±0,0)	*	*
Docosahexaenóico (C22:6 ω 3)	*	*	*	*	2,2 (±0,1)	2,6 (±0,1)
Tetracosanóico (C24:0)	1,7 (±0,1)	1,7 (±0,1)	*	*	*	*
Outros ácidos ¹	0,9 (±0,0)	1,1 (±0,0)	3,0 (±0,5)	3,4 (±0,3)	3,4 (±0,4)	2,8 (±0,1)
Total saturados	54,4 (±2,0)	53,3 (±0,4)	40,5 (±0,3)	44,3 (±0,4)	38,6 (±0,8)	34,4 (±0,5)
Total insaturados	40,5 (±1,3)	39,4 (±0,2)	38,2 (±1,0)	38,8 (±0,6)	45,3 (±1,4)	46,8 (±1,2)
Total ω 3 e ω 6 ácidos graxos	5,3 (±0,3)	7,3 (±0,2)	20,6 (±0,5)	16,8 (±0,5)	16,1 (±0,6)	18,9 (±0,2)

* Não detectado ou valor inferior a 1. ¹Σ ácidos graxos minoritários.

5.3. Estudo do processo de Hidrólise-Esterificação

Para a síntese do biodiesel da microalga *Chlorella sp*, primeiramente foi realizada a hidrólise de 40 g da biomassa empregando ácido sulfúrico como catalisador nas condições de 20% H_2SO_4 à 100 °C em refluxo por 4h, conforme descrito no item 4.6.7.1 deste trabalho.⁴⁶ Após a hidrólise os ácidos graxos provenientes da fração lipídica foram esterificados usando uma razão molar 30:1 metanol: ácido graxo, foram testados os catalisadores H_2SO_4 e H_2NSO_3H , 10 e 20% (em relação a massa de ácido graxo) respectivamente, em refluxo por 1 e 4 h a 60 e 100 °C. Como apresentado na Tabela 9, os teores de ésteres mais elevados variaram entre 78,93 e 80,11% para o H_2SO_4 (entradas 2 e 4) e 62,7% para o H_2NSO_3H (entrada 6). Para as reações empregando H_2SO_4 a comparação das médias obtidas pelo teste de Tukey foi verificado que não há diferença significativa entre as médias dos teores de ésteres (entradas 2 e 4). Em relação às reações catalisadas com ácido sulfâmico há uma redução tanto no rendimento quanto no teor de ésteres, estes resultados demonstraram que o ácido sulfâmico foi parcialmente hidrolisado sob temperatura a partir da água originada na reação de esterificação (**Figura 19**).⁵⁹ Portanto, a melhor condição experimental para a etapa de esterificação foi à 100 °C por 1 h, visto que demanda um menor tempo e gasto energético e os teores de ésteres não apresentaram diferença significativa quando comparado com o processo a 100 °C por 4 h. Takisawa *et al.*¹⁸ também usou o tempo de 1h de esterificação e obteve uma conversão de FAMES de 181,7% em comparação com a reação controle (extração seguida da transesterificação da biomassa seca).

Tabela 9. Rendimentos e teores de ésteres obtidos a partir das reações de esterificação com diferentes catalisadores, temperaturas e tempos de reação

Entrada	Catalisador ¹ , %	Temp., °C	Tempo, h	Rendimento ² , %	Teor de ésteres ^{3,4} , %
1	H ₂ SO ₄	60	1	67,85	72,2 (±0,1)
2	H ₂ SO ₄	100	1	62,76	78,9 (±0,1) ^a
3	H ₂ SO ₄	60	4	66,82	76,3 (±0,1)
4	H ₂ SO ₄	100	4	70,49	80,1 (±0,5) ^a
5	H ₂ NSO ₃ H	60	1	30,61	50,5 (±0,6) ^b
6	H ₂ NSO ₃ H	100	1	45,60	62,7 (±0,1)
7	H ₂ NSO ₃ H	60	4	55,28	52,4 (±0,8) ^c
8	H ₂ NSO ₃ H	100	4	57,00	51,6 (±0,5) ^{b;c}

¹Catalisadores: ácido sulfúrico 10%, ácido sulfâmico 20% (m/m em relação a massa de ácidos graxos). ²Rendimento em relação a massa de ácido graxo. ³Letras minúsculas iguais entre as linhas não apresentam diferença em nível de significância de 5% pelo teste turkey. ⁴(n=9).

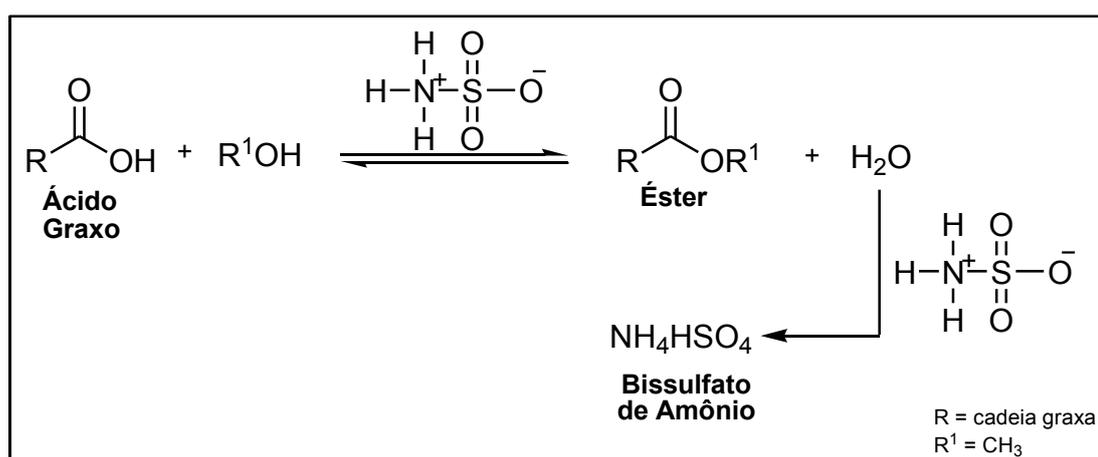


Figura 19. Reação de esterificação e concorrente hidrólise do ácido sulfâmico

Após a síntese do biodiesel da biomassa umidificada de microalga *Chlorella* sp, empregando ácido sulfúrico como catalisador no processo de hidrólise-esterificação⁴⁶ foi decidido aplicar o método à biomassa úmida de *N. oculata* cultivada. Visto que, quando se tem a biomassa úmida, neste caso o teste foi realizado com *N. oculata* (**Figura 20 a**), o solvente da reação de hidrólise está adsorvido pelas células das microalgas, a dificuldade é que no momento em que se adiciona o hexano a biomassa úmida forma uma massa aderente e conforme é aquecida e agitada mecanicamente fica mais viscosa. Durante as 4 h de reação não

dissolveu no co-solvente e o rendimento da reação de hidrólise foi insignificante (**Figura 20 b-c**).

Cabe salientar que os trabalhos publicados até o momento partiam da microalga em pó e a umidificavam para só então estudarem a reação de hidrólise.^{18,45,46,47} Portanto, experimentos com a biomassa umidificada não condizem com a realidade de se manipular a biomassa úmida de microalga. Uma vez que, consiste em microalgas colhidas e concentradas formando uma pasta como pode ser observado na Figura 20 a, a biomassa de *N. oculata* com 50% de umidade.

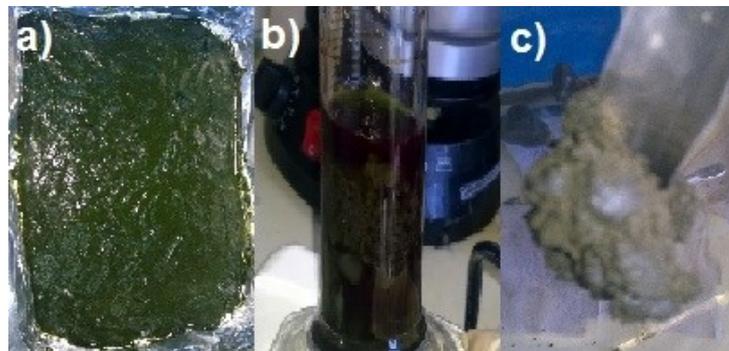


Figura 20. Microalga *N. oculata*: a) pasta com 50% de umidade (m/m); b) pasta sem dissolver após 4 h de hidrólise; c) pasta retirada da reação de hidrólise

5.3.1. Otimização do processo de Hidrólise-Esterificação empregando biomassa algácea úmida

Diante da obtenção de baixos rendimentos na reação de hidrólise, buscou-se um segundo co-solvente que fosse solúvel tanto em água quanto em hexano para atuar como solvente dispersor, homogeneizando o meio reacional e facilitando a função do solvente extrator (hexano). Uma vez que a hidrólise ocorre em duas fases, uma fase apolar contendo hexano e uma fase polar contendo água, biomassa e catalisador.⁴⁶ Embora a acetona tenha um grande momento dipolar de 2,88 D, é classificada como solvente aprótico, com polaridade intermediária. Portanto, é solúvel tanto em triacilgliceróis (polaridade baixa) quanto em água (polaridade alta).⁷² Devido a estas características, também por ser um solvente conhecidamente empregado na indústria oleoquímica e considerado um “building blocks” na química orgânica foi escolhido para ser usado como solvente dispersor no processo de hidrólise.

Para otimizar as condições reacionais de hidrólise foi realizado um delineamento composto central 2³, com um total de 11 ensaios (três repetições no ponto central).⁵⁸ Conforme trabalho anterior, o volume do co-solvente extrator hexano (10 mL) e a temperatura de 100 °C mantiveram-se fixos.⁴⁶ Para cada ensaio foi pesado 4,5 g de pasta úmida de *N. oculata* (equivalente a 3 g de biomassa seca) com 50% de água em massa e foi investigado as variáveis tempo, volume de acetona e quantidade de catalisador. Após a reação de hidrólise, todos os ensaios foram esterificados na mesma condição: razão metanol:ácido graxo 30:1, 10% de H₂SO₄ (em relação a massa de ácido graxo), tempo de 1 h e temperatura de 100 °C. A condição ou ensaio que obteve o melhor rendimento em FAMES foi escolhido como condição ideal.

A Tabela 10 mostra as condições experimentais e os rendimentos para as hidrólises e esterificações da pasta úmida de *N. oculata*. Foram consideradas como melhores respostas os maiores rendimentos em ésteres. Através da Figura 21 pode-se observar que todas as variáveis apresentaram efeito significativo, com 95% de confiança, e as melhores condições corresponderam aos ensaios 5 e 7, os quais obtiveram percentuais de rendimento de ésteres de 86,66 e 89%, respectivamente.

Tabela 10. Matriz do delineamento composto central 2³ com valores codificados, valores reais (entre parênteses), rendimentos e teor de ésteres.

Ensaio	Acetona, mL	H ₂ SO ₄ , %	Tempo, h	Rendimento AG ¹ , %	Rendimento Éster, %	Teor de Ésteres ^{2,3} , %
1	-1 (5)	-1 (10)	-1(1)	14,44	76,94	46,2 (±0,2)
2	+1 (10)	-1 (10)	-1(1)	17,71	61,62	48,5 (±0,3)
3	-1 (5)	+1 (30)	-1(1)	12,17	81,47	74,6 (±0,1) ^a
4	+1 (10)	+1 (30)	-1(1)	13,62	81,02	73,8 (±0,4) ^{b,c}
5	-1 (5)	-1 (10)	+1(4)	14,28	86,66	73,6 (±0,2) ^c
6	+1 (10)	-1 (10)	+1(4)	13,62	76,40	74,3 (±0,5) ^{a,b}
7	-1 (5)	+1 (30)	+1(4)	12,97	89,00	57,5 (±0,2)
8	+1 (10)	+1 (30)	+1(4)	13,26	84,24	72,5 (±0,3)
9	0 (7,5)	0 (20)	0(2,5)	14,52	75,65	53,1 (±0,4)
10	0 (7,5)	0 (20)	0(2,5)	13,10	81,07	49,3 (±0,9)
11	0 (7,5)	0 (20)	0(2,5)	13,79	78,17	54,0 (±1,6)

¹Ácido graxo. ²Conforme norma EN 14103. ³Letras minúsculas iguais entre as linhas não apresentam diferença em nível de significância de 5% pelo teste turkey.

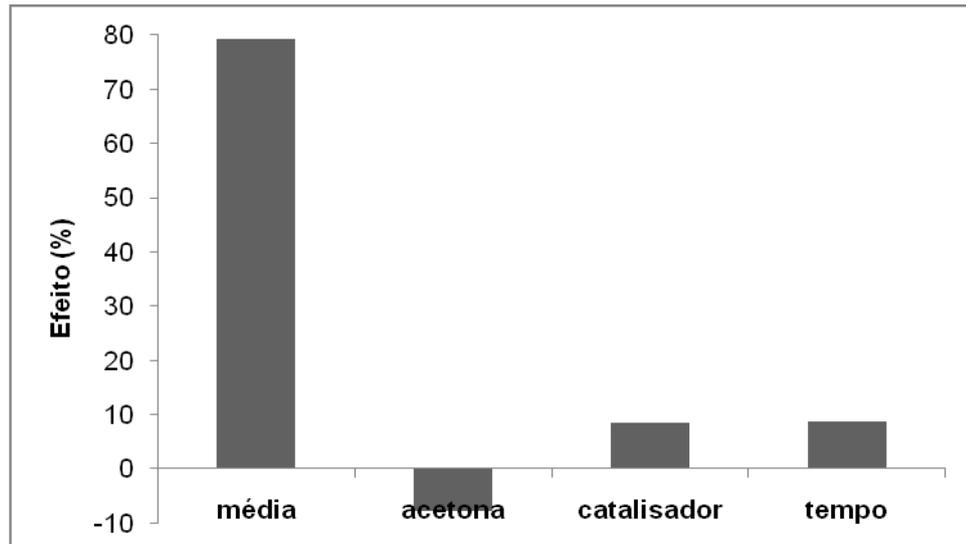


Figura 21. Estimativas dos efeitos da acetona, catalisador e tempo na hidrólise da biomassa algácea úmida. Efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$)

A Tabela 11 apresenta a análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos, pode ser verificada a validade do modelo matemático pelo teste F, sendo o valor de F calculado 1,8 vezes maior que o tabelado, a 95% de confiança.⁵⁸ A Equação 3 apresenta o modelo linear empírico para o rendimento em ésteres. A partir do modelo construído (**Equação 3**) foi possível obter a superfície de resposta para analisar as melhores condições de acetona e ácido sulfúrico para a reação de hidrólise (**Figura 22**). Analisando a superfície de resposta pode-se verificar a existência de uma região ótima para o rendimento em ésteres onde se encontra uma faixa de combinações de solvente dispersor acetona (1 a 5 mL) e catalisador (10 a 30% em relação a massa de microalgas seca). Evidentemente um volume de solvente dispersor e catalisador serão fixados para a reação de hidrólise, no entanto este resultado de faixa ótima das variáveis é muito mais interessante do que apenas um valor pontual, pois ele fornece informação sobre a robustez do processo.⁵⁸

$$\text{RendimentoÉsteres}(\%) = 79,3 - 7,7x_1 + 8,5x_2 + 8,8x_3 \quad (3)$$

Onde,

x_1 é o valor codificado da variável acetona

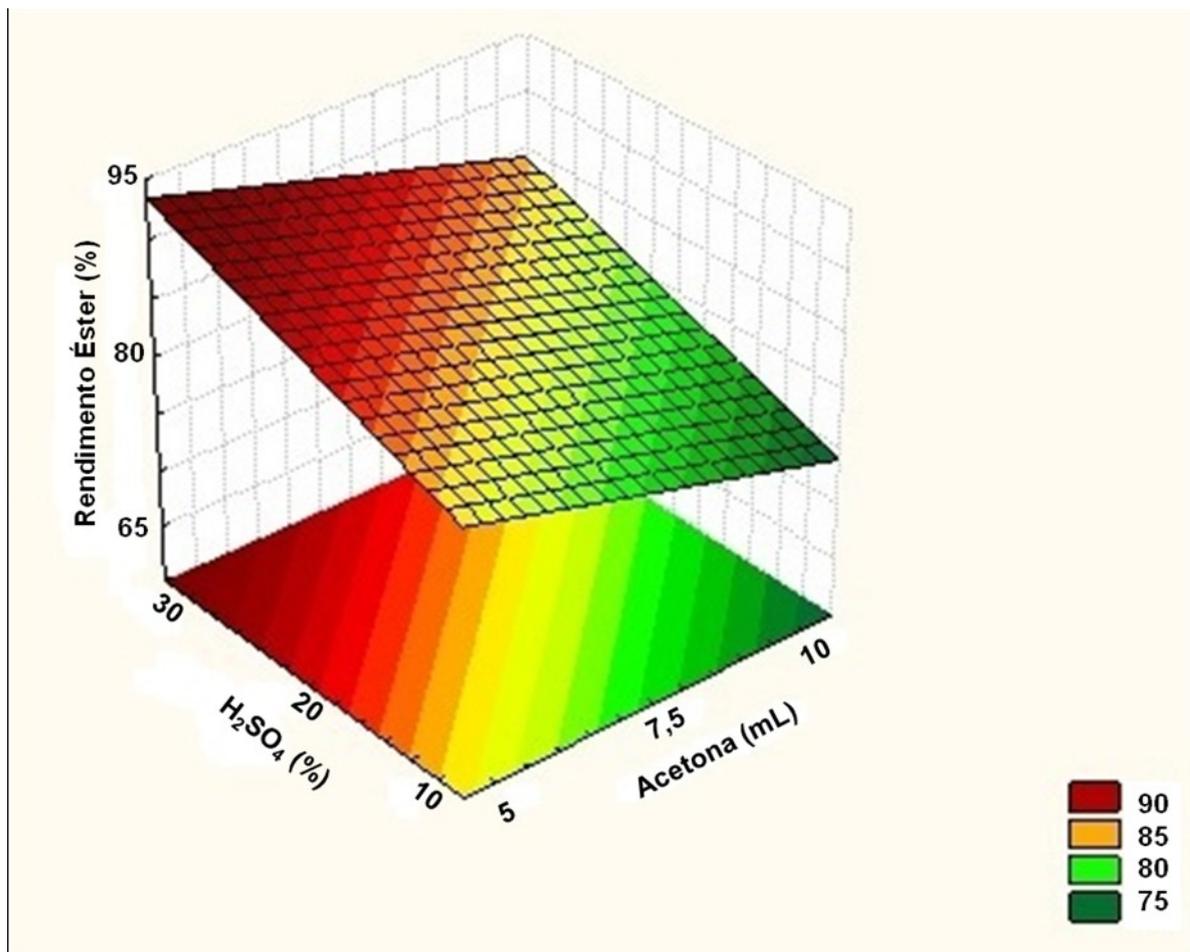
x_2 é o valor codificado da variável catalisador

x_3 é o valor codificado da variável tempo

Tabela 11. Análise de variância para o rendimento em ésteres

Fonte de variação	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F _{calc}
Regressão	494,83	6	82,47	
Erro	29,79	4	7,45	11,07
Total	524,62	10		

R=0,95; F_{6,4,95%} = 6,16

**Figura 22.** Superfície de resposta acetona x H₂SO₄

Com o intuito de constatar se havia diferença significativa entre os rendimentos dos ensaios 5 e 7 cada condição foi repetida em triplicada e submetida ao teste de múltipla comparação de Tukey. A Tabela 12 apresenta os resultados em percentual de ácidos graxos e de ésteres, ambos os rendimentos não apresentaram diferença significativa, com 95% de significância. Portanto, a condição escolhida como ideal foi 5 mL de acetona, 10% de H₂SO₄ e 4 h de reação de hidrólise, visando

um processo mais sustentável e menor consumo de ácido sulfúrico. Em trabalho anterior, os rendimentos da reação de hidrólise da *N. oculata* empregando 40 e 60% de H₂SO₄ foram de 8,6 (±0,3) e 8,5 (±0,2)%, respectivamente, ambos os resultados são inferiores aos apresentados na Tabela 12.⁴⁶ Segundo Sathish & Sims,⁷² o ácido sulfúrico é um catalisador eficaz na conversão de ácidos graxos livres e triacilgliceróis em condições úmidas. Im *et al.*⁴² quando avaliou o volume de H₂SO₄ na transesterificação “*in situ*” de biomassa de microalga também constatou que o rendimento de conversão não foi muito sensível à alteração no volume do catalisador, não havendo um aumento significativo no rendimento de conversão quando aumentado o volume de catalisador. Takisawa *et al.*¹⁸ constatou que ocorre a degradação de FFA pela adição de ácido sulfúrico em excesso na reação de hidrólise.

Tabela 12. Resultados das replicas das condições 5 e 7, rendimento, médias com desvio padrão e teste de Tukey.

Entrada	Condições hidrólise	Rend. AG ¹ , %	Média ²	Rend. éster, %	Média ²
1	acetona 5 mL,	14,28		86,66	
2	10% H ₂ SO ₄ ,	9,01	11,28 ±2,7 ^a	87,79	85,52 ±3,0 ^b
3	tempo 4 h	10,55		82,12	
4	acetona 5 mL,	12,97		89,0	
5	30% H ₂ SO ₄ ,	10,5	11,01 ±1,8 ^a	89,4	88,74 ±0,8 ^b
6	tempo 4 h	9,57		87,83	

¹Ácido graxo. ²As médias marcadas com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si (p ≤ 0,05) pelo teste de Tukey.

A Figura 23 ilustra a eficiência da acetona como solvente dispersor em contato com a pasta úmida de *N. oculata* (**Figura 23 b**), seguida da adição do solvente extrator é possível observar a homogeneidade do meio reacional (**Figura 23 c**). Através da cromatografia em camada delgada (CCD) foi demonstrada a conversão aparente dos ácidos graxos hidrolisados a partir das condições 5 e 7 em ésteres (**Figura 24**). E por sua vez, a Figura 25 representa o processo de hidrólise-esterificação para biomassa úmida de microalgas empregando acetona como solvente dispersor e hexano como solvente extrator.

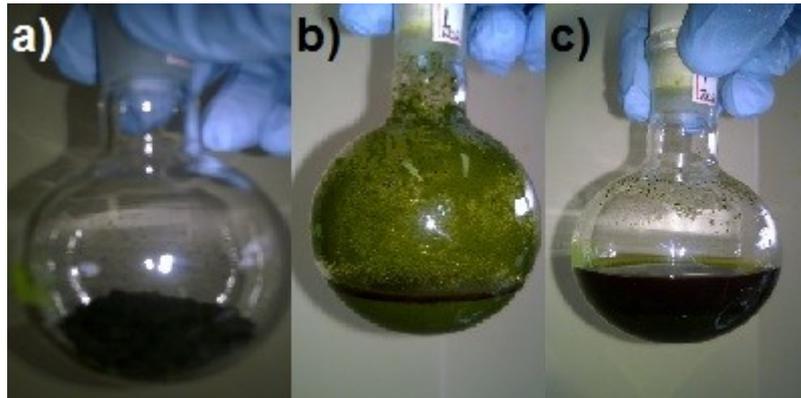


Figura 23. Microalga *N. oculata*: a) pasta com 50% de umidade (m/m); b) pasta dispersa em acetona; c) pasta+acetona+hexano=meio homogêneo.

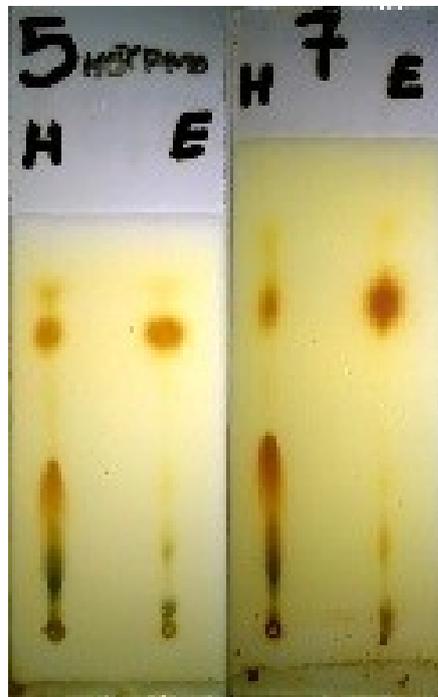


Figura 24. CCD's das reações de hidrólise (representadas por H) e esterificação (representadas por E). Placa 5 apresenta a condição de hidrólise de 5 mL de acetona, 10 mL de hexano e 10% de H_2SO_4 , placa 7 condição de hidrólise de 5 mL de acetona, 10 mL de hexano e 30% de H_2SO_4

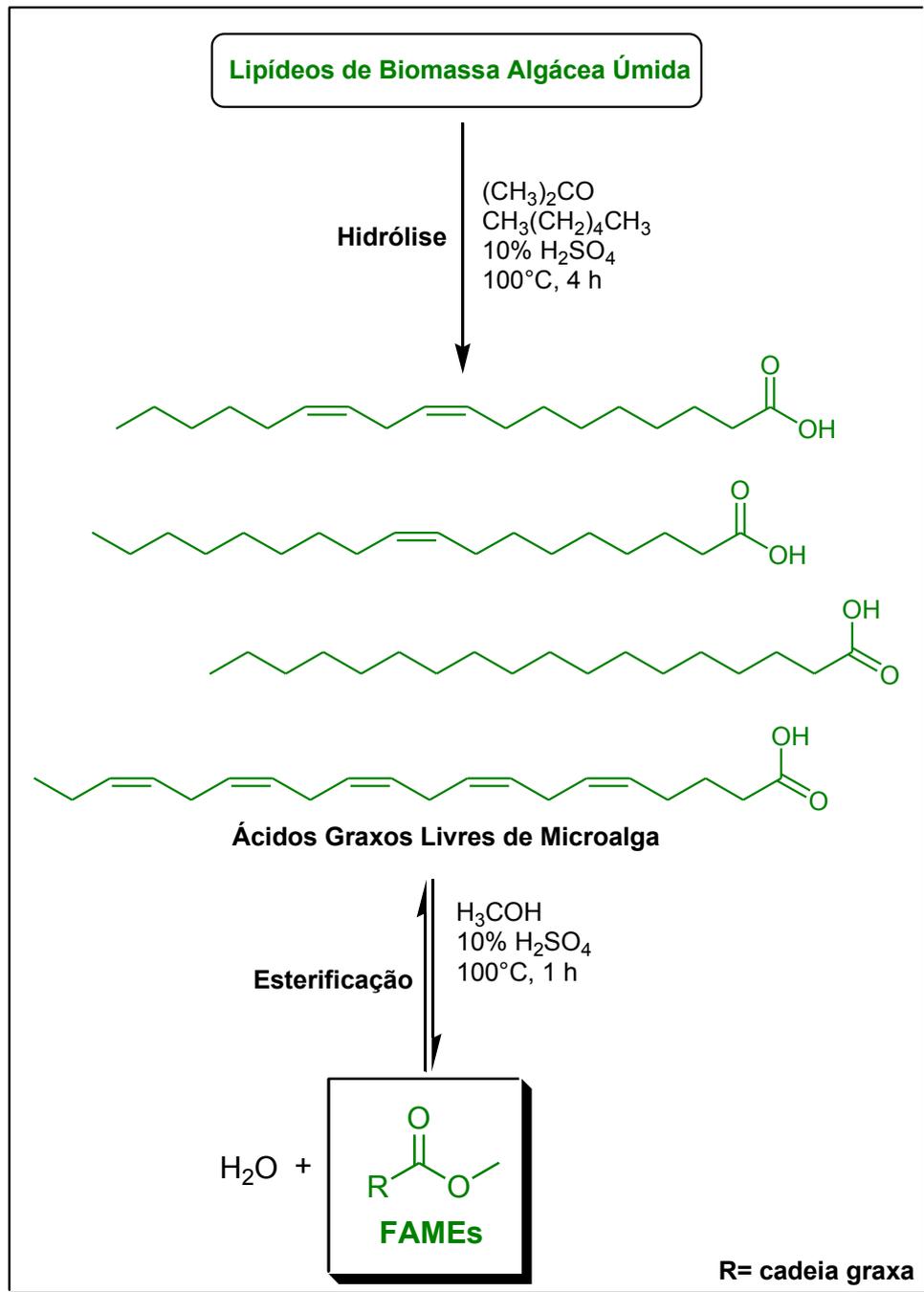


Figura 25. Processo otimizado de hidrólise-esterificação para biomassa úmida de microalgas

5.3.2. Aplicação do processo de hidrólise-esterificação a biomassa úmida das microalgas cultivadas e comparação com os processos convencional, por micro-ondas e transesterificação “in situ”

O processo de hidrólise-esterificação foi aplicado à biomassa úmida das microalgas *A. coffeaeformis*, *C. gracilis* e *I. galbana* (**Tabela 13**), foram obtidos os respectivos rendimentos médios 10,3 ($\pm 0,41$), 8,46 ($\pm 0,39$) e 9,89 ($\pm 0,22$)% para a reação de hidrólise. Os rendimentos médios correspondentes as esterificações dos ácidos graxos das microalgas *A. coffeaeformis*, *C. gracilis* e *I. galbana*, foram 91,80 ($\pm 5,35$), 90,19 ($\pm 4,48$) e 88,01 ($\pm 1,83$)%, respectivamente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Pode-se observar que todos os rendimentos de ésteres foram acima de 86%. Os teores de ésteres obtidos nas condições otimizadas do processo para as microalgas *A. coffeaeformis*, *C. gracilis*, *I. galbana* e *N. oculata* foram 58,73 ($\pm 6,8$), 58,82 ($\pm 1,49$), 37,98 ($\pm 0,56$) e 73,55 ($\pm 0,2$)%, respectivamente. Levine *et al.*⁴⁵ obteve rendimentos em relação a massa de ácido graxo da microalga *Chlorella vulgaris* entre 56 e 100% de ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEEs) e teores de ésteres que variaram de 34-66% empregando o processo de hidrólise-esterificação super crítica.

Tabela 13. Resultados das reações de hidrólise-esterificação a partir da biomassa úmida das microalgas *A. coffeaeformis*, *C. gracilis* e *I. galbana*

Entrada	Microalga	Rendimento ¹ AG ² , %		Rendimento ³ Éster, %	
		Hidrólise (5 mL acetona, 10 mL hexano, 10% H ₂ SO ₄ , 4 h a 100 °C)		Esterificação (10% H ₂ SO ₄ , 1 h a 100 °C)	
1	<i>A. coffeaeformis</i>	9,88		96,46	
2		10,32	10,3 \pm 0,41	92,97	91,80 \pm 5,35
3		10,70		85,96	
4	<i>C. gracilis</i>	8,65		85,55	
5		8,71	8,46 \pm 0,39	90,53	90,19 \pm 4,48
6		8,01		94,50	
7	<i>I. galbana</i>	10,01		87,51	
8		9,63	9,89 \pm 0,22	90,03	88,01 \pm 1,83
9		10,02		86,48	

¹Rendimento em relação a biomassa seca. ²Ácido graxo. ³Rendimento em relação a massa de ácido graxo.

A partir da biomassa seca das microalgas *A. coffeaeformis*, *C. gracilis*, *I. galbana* e *N. oculata* foram produzidos FAMEs empregando o método convencional de extração (item 4.6.2) seguido de transesterificação (item 4.6.8) da fração lipídica das microalgas e o método de transesterificação “*in situ*” (item 4.6.9). A partir da biomassa úmida das quatro espécies de microalgas cultivadas foram produzidos FAMEs usando o método de extração por micro-ondas (item 4.6.4) seguido de transesterificação (item 4.6.8). Com o objetivo de comparar o rendimento de FAMEs em relação à massa de ácido graxo e a conversão de FAMEs. A Tabela 14 apresenta os rendimentos de ésteres metílicos a partir dos quatro métodos diferentes, para todas as microalgas o maior rendimento alcançado foi através do processo de hidrólise-esterificação, o segundo melhor percentual de FAMEs foi obtido via transesterificação “*in situ*” variando de 45 a 73%. Estes resultados podem ser atribuídos ao fato dos ácidos graxos serem mais solúveis em metanol que os triacilgliceróis favorecendo a reação de esterificação, ou ainda, os rendimentos mais elevados para a esterificação justificam-se porque esta reação ocorre em uma única etapa a qual o ácido graxo reage com metanol produzindo FAMEs e água, enquanto a transesterificação de triacilgliceróis inclui três etapas (**Figura 26**). Estes resultados foram suportados por experiências de Takisawa *et al.*¹⁸, onde a transesterificação da tripalmitina e a esterificação do ácido palmítico foram comparadas.

No caso das extrações, usando ultrassom e micro-ondas, dos lipídeos das microalgas seguido da transesterificação dos mesmos, os resultados foram muito próximos, inclusive para as microalgas *C. gracilis* e *N. oculata* não houve diferença significativa entre os métodos, claro que deve-se considerar a vantagem da extração por micro-ondas, uma vez que é aplicada à biomassa algácea úmida e em apenas 1min de tempo de extração, portanto não há gasto energético com a secagem da biomassa além do processo ser mais rápido que o convencional.

Tabela 14. Comparação entre os rendimentos (%) de ésteres metílicos empregando diferentes métodos de produção de ésteres de microalgas

Método de Produção	Rendimento ^{1,2} , %			
	<i>A. coffeaeformis</i>	<i>C. gracilis</i>	<i>I. galbana</i>	<i>N. oculata</i>
E(US)-T ³	63,68 (±2,72)	38,37 (±3,14) ^a	50,25 (±0,98)	45,01 (±0,1) ^b
T "in situ" ⁴	73,23 (±3,18)	45,83 (±1,95)	61,90 (±0,74)	59,57 (±1,6)
E(MW)-T ⁵	53,49 (±0,58)	36,12 (±1,61) ^a	32,93 (±4,32)	48,49 (±5,67) ^b
H-E ⁶	91,80 (±5,35)	90,19 (±4,48)	88,01 (±1,83)	85,52 (±3,0)

¹Rendimento em relação a massa de ácido graxo. ²As médias marcadas com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey. ³Extração (por ultrassom)-transesterificação. ⁴Transesterificação "in situ". ⁵Extração (por micro-ondas)-transesterificação. ⁶Hidrólise-esterificação

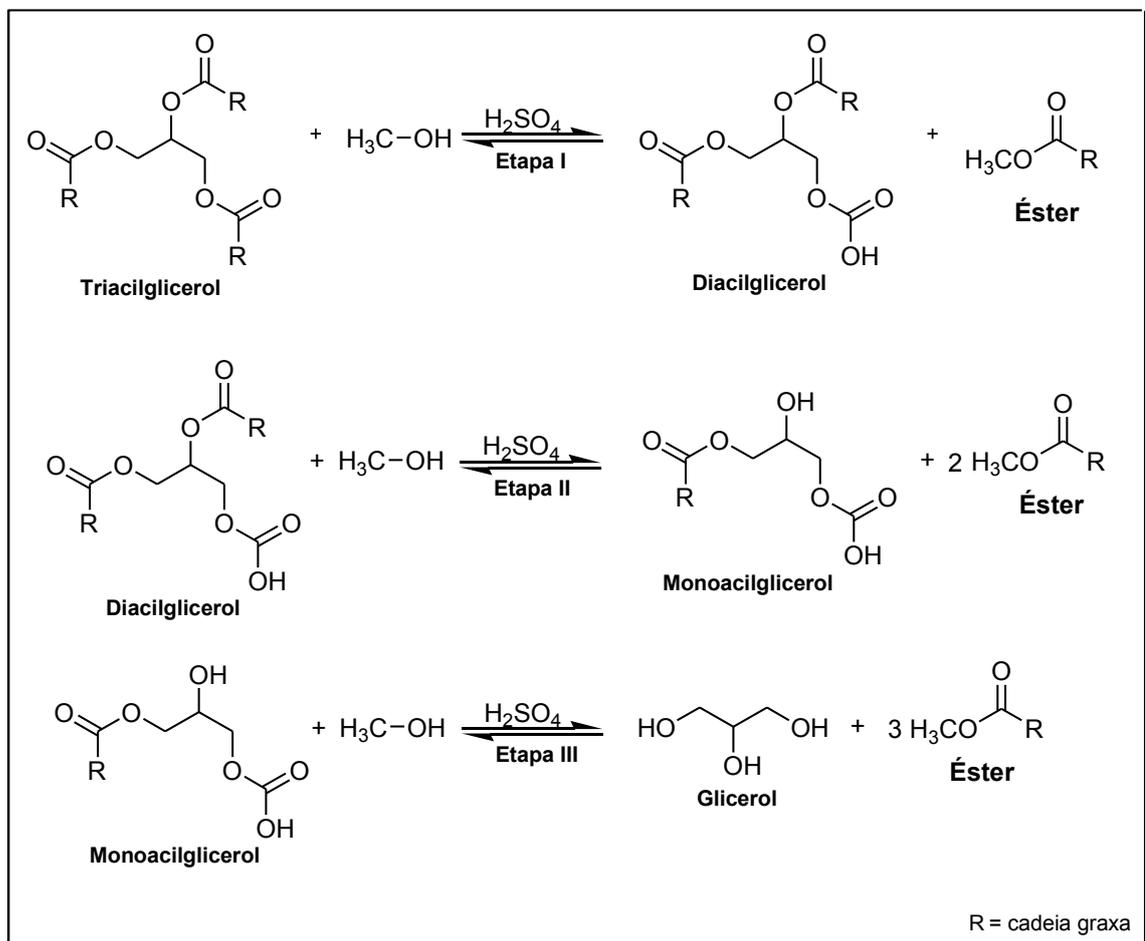


Figura 26. Representação das etapas da transesterificação ácida com metanol

A conversão de FAMES é uma média ponderada adotada em vários trabalhos que estudam a produção de FAMES a partir de microalgas.^{15,18, 32,42,47,61} Para este trabalho a conversão de FAMES foi realizada conforme item 4.6.10. A massa

máxima de FAMES obtida para as microalgas *A. coffeaeformis*, *C. gracilis*, e *I. galbana* foram 55,93 ($\pm 0,21$), 49,07 ($\pm 0,15$) e 28,37 ($\pm 0,85$) mg/mg de biodiesel, respectivamente. Em seguida, cada rendimento em massa de FAMES determinada experimentalmente (por GC-FID) foi dividido pela massa máxima de FAMES correspondente a cada espécie.^{42,61} Estes resultados podem ser observados na Figura 27, onde fica claro que as maiores conversões foram obtidas no processo de hidrólise-esterificação. Os percentuais de conversão correspondentes a este processo para as microalgas *A. coffeaeformis*, *C. gracilis*, e *I. galbana* foram 105, 120 e 134%, respectivamente. Os resultados obtidos por Takisawa *et al.*¹⁸ a partir de *Chlorella* umidificada indicaram que o processo de hidrólise reduziu a inibição da água na produção de FAMES, além disso, a conversão de FAMES obtidos via hidrólise-esterificação foi aumentada em 181,7% em comparação com os FAMES obtidos por transesterificação “*in situ*” com o mesmo teor de umidade (80%). Em um dos seus estudos Im *et al.*⁶⁰ umidificou células secas de *N. gaditana* e as submeteu a hidrólise-esterificação obtendo 107% de conversão de FAMES. Dentro deste contexto, os percentuais de conversão obtidos no presente trabalho estão coerentes com a literatura.

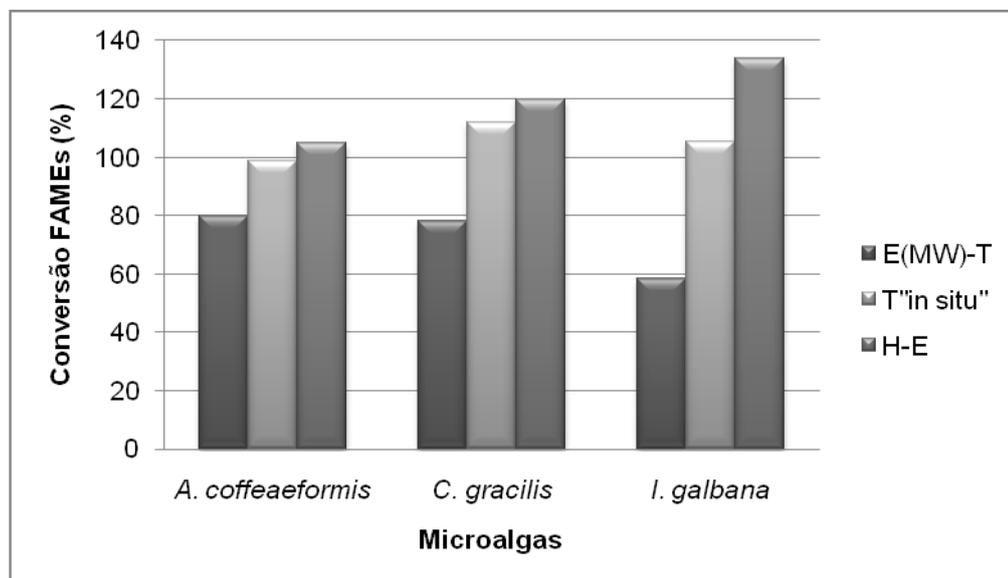


Figura 27. Gráfico das conversões em FAMES derivados de microalgas a partir de diferentes processos de produção

A Tabela 15 apresenta o perfil graxo dos ésteres das microalgas *A. coffeaeformis*, *C. gracilis*, *I. galbana* e *N. oculata* obtidos via hidrólise-esterificação, e a Tabela 16 o perfil graxos dos ésteres das respectivas microalgas obtidos por transesterificação “*in situ*” da biomassa seca. Se compararmos os resultados das Tabelas 15 e 16 com a Tabela 3, onde as microalgas foram secas até massa constante e submetidas à extração convencional seguida de derivatização com BF₃ e metanol a 70 °C em refluxo por 20 min, no perfil graxo dos ésteres das microalgas *A. coffeaeformis*, *C. gracilis*, *I. galbana* ocorreu uma diminuição no percentual de poliinsaturados quando aplicados os processos de hidrólise-esterificação e transesterificação “*in situ*”, ambos os métodos tem em comum a temperatura de reação que é 100 °C. Desse modo, se supõe que a elevada temperatura a qual foram expostas as amostras e os maiores tempos de reação dos dois métodos em relação ao processo de extração-derivatização tenham provocado a degradação dos ácidos graxos poliinsaturados.

O perfil graxo dos ésteres da microalga *A. coffeaeformis* obtidos tanto por hidrólise-esterificação quanto por transesterificação “*in situ*” apresentaram como majoritários os ácidos graxos saturados (C14:0 e C16:0) e monoinsaturado (C16:1), característica comum do perfil graxo de oleaginosas usadas para produção comercial de biodiesel.⁹ Os ésteres da microalga *C. gracilis* obteve, através do método hidrólise-esterificação, os mesmos ácidos graxos majoritários que a microalga *A. coffeaeformis*. O perfil graxo dos ésteres correspondentes a *I. galbana* é muito similar ao perfil do biodiesel de soja, dentre os ácidos graxos majoritários da *I. galbana* estão o palmítico, o oléico e o linoléico.⁹ Desse modo, podem-se considerar o emprego das microalgas *A. coffeaeformis*, *C. gracilis* e principalmente a *I. galbana* promissor para a produção de biodiesel.

No caso da microalga *N. oculata* cerca de 30% de seu perfil graxo é composto pelo ácido Eicosapentaenóico, conhecido também como EPA, trata-se de um ácido graxo essencial Omega-3, importante por sua ação anti-inflamatória sendo empregado, por exemplo, em complexos vitamínicos e formulações para lactentes. Nesse caso, seria mais interessante o emprego desta microalga para fins alimentícios.

Tabela 15. Perfil de ácidos graxos das microalgas *A. coffeaeformis*, *C. gracilis*, *I. galbana* e *N. oculata* após o processo de hidrólise-esterificação

Ácido graxo	<i>A. coffeaeformis</i>	<i>C. gracilis</i>	<i>I. galbana</i>	<i>N. oculata</i>
Mirístico (C14:0)	22,9 (±0,3)	31,3 (±0,1)	16,7 (±0,1)	3,8 (±0,1)
Pentadecanóico (C15:0)	1,5 (±0,0)	*	*	*
Palmitico (C16:0)	31,5 (±0,3)	11,1 (±0,2)	16,4 (±0,1)	27,7 (±0,2)
Palmitoleico (C16:1 ω 7c)	32,1 (±0,3)	38,0 (±0,4)	9,6 (±0,1)	22,3 (±0,3)
Hexadecatrienóico (C16:3 ω 3c)	*	*	*	*
Esteárico (C18:0)	*	*	*	*
Oléico (C18:1 ω 9c)	2,9 (±0,1)	*	31,4 (±0,1)	6,4 (±0,1)
Elaídico (C18:1 ω 9t)	3,1 (±0,3)	1,4 (±0,1)	7,9 (±0,1)	*
Linoléico (C18:2 ω 6c)	2,0 (±0,3)	*	14,2 (±0,1)	2,9 (±0,1)
Araquidônico (C20:4 ω 6)	*	*	*	5,5 (±0,1)
Eicosapentaenóico (C20:5 ω 3)	1,2 (±0,2)	1,1(±0,1)	*	28,8 (±0,1)
Docosahexaenóico (C22:6 ω 3)	*	*	1,6 (±0,1)	*
Tetracosanóico (C24:0)	1,1 (±0,1)	*	*	*
Outros ácidos ¹	1,8 (±0,4)	2,6 (±0,8)	2,3 (±0,3)	2,7 (±0,2)
Total saturados	57,4 (±1,1)	43,8 (±0,2)	34,7 (±0,3)	33,1 (±0,3)
Total insaturados	38,3 (±0,8)	40,2 (±0,5)	49,0 (±0,2)	29,3 (±0,3)
Total ω 3 e ω 6 ácidos graxos	4,3 (±0,6)	13,4 (±0,2)	16,3 (±0,3)	37,7 (±0,2)

* Não detectado ou valor inferior a 1. ¹Σácidos graxos minoritários.

Tabela 16. Perfil de ácidos graxos das microalgas *A. coffeaeformis*, *C. gracilis*, *I. galbana* e *N. oculata* após o processo de transesterificação *in situ*

Ácido graxo	<i>A. coffeaeformis</i>	<i>C. gracilis</i>	<i>I. galbana</i>	<i>N. oculata</i>
Mirístico (C14:0)	20,3 (±0,1)	27,9 (±0,2)	15,1 (±0,1)	4,6 (±0,1)
Pentadecanóico (C15:0)	1,0 (±0,1)	*	*	*
Palmitico (C16:0)	30,3 (±0,3)	9,8 (±0,1)	16,5 (±0,1)	20,3 (±0,1)
Palmitoleico (C16:1 ω 7c)	36,8 (±0,3)	37,2 (±0,2)	9,4 (±0,4)	26,8 (±0,1)
Hexadecatrienóico (C16:3 ω 3c)	2,4 (±0,1)	16,4 (±0,1)	*	*
Esteárico (C18:0)	*	*	*	*
Oléico (C18:1 ω 9c)	2,2 (±0,1)	1,0 (±0,1)	33,1 (±0,1)	7,6 (±0,1)
Elaídico (C18:1 ω 9t)	1,3 (±0,1)	1,8 (±0,1)	6,1 (±0,1)	1,0 (±0,1)
Linoléico (C18:2 ω 6c)	2,3 (±0,1)	*	15,7 (±0,1)	3,6 (±0,1)
Araquidônico (C20:4 ω 6)	*	*	*	5,5 (±0,1)
Eicosapentaenóico (C20:5 ω 3)	1,5 (±0,1)	2,1 (±0,1)	*	29,2 (±0,2)
Docosahexaenóico (C22:6 ω 3)	*	*	1,8 (±0,1)	*
Tetracosanóico (C24:0)	1,1 (±0,1)	*	*	*
Outros ácidos ¹	1,9 (±0,1)	4,7 (±0,1)	3,3 (±0,1)	1,4 (±0,1)
Total saturados	53,1 (±0,4)	39,5 (±0,3)	32,1 (±1,3)	25,6 (±0,1)
Total insaturados	40,3 (±0,4)	40,8 (±0,4)	49,4 (±1,6)	35,4 (±0,1)
Total ω 3 e ω 6 ácidos graxos	4,3 (±0,1)	19,6 (±0,1)	18,5 (±0,1)	39,0 (±0,1)

* Não detectado ou valor inferior a 1. ¹Σ ácidos graxos minoritários.

5.3.3. Perfil cromatográfico dos FAMES derivados dos ácidos graxos de microalgas obtidos por hidrólise-esterificação

O perfil cromatográfico dos ésteres metílicos derivados dos ácidos graxos das microalgas *A. coffeaeformis*, *C. gracilis*, *I. galbana* e *N. oculata* foram realizados conforme está descrito no item 4.6.3 deste trabalho. Os respectivos cromatogramas com os perfis cromatográficos dos ésteres metílicos das microalgas *A. coffeaeformis*, *C. gracilis*, *I. galbana* e *N. oculata*, figuras 28, 29, 30 e 31, respectivamente, estão apresentados no APÊNDICE A.

5.3.4. Caracterização por RMN dos FAMES derivados dos ácidos graxos de microalgas obtidos por hidrólise-esterificação

Através dos experimentos de RMN de ^1H foi possível caracterizar os FAMES derivados das microalgas *N. oculata*, *A. coffeaeformis*, *C. gracilis* e *I. galbana* correspondente as Figuras 32, 35, 38 e 41, respectivamente (**APÊNDICE B**). Como principais sinais característicos de FAMES: o tripleto na região de 0,8-1,0 ppm referente a metila; o sinal na região de 1,25-1,35 ppm representando os hidrogênios metilenos da cadeia graxa; o multipletto de 1,8-2,10 ppm referente aos hidrogênios alílicos; na região de 3,40-3,70 ppm apresenta um simpleto representando a metoxila que confirma a formação do éster; confirmando a existência de insaturações nos FAMES o multipletto na região 5,30-5,40ppm (hidrogênios vinílicos).

A confirmação da obtenção dos FAMES foi realizada através dos experimentos de RMN de ^{13}C conforme Figuras 33, 36, 39 e 42 (**APÊNDICE B**). Sendo os principais sinais: na região de 14 ppm observa-se o carbono referente a metila; a região de 20-30 ppm abrange os carbonos metilenos e alílicos da cadeia graxa; confirmando os FAMES o sinal em 51 ppm do carbono da metoxila; representando as insaturações na região de 127-130 ppm encontram-se os carbonos vinílicos; e na região de 174 ppm os carbonos pertencentes as carbonilas.

As atribuições dos espectros de RMN de ^{13}C foram confirmadas pelo ensaio de HSQC, Figuras 34, 37, 40 e 43 onde as relações em vermelho indicam carbono de grupos metinas e metilas, em azul os metilenos, onde não há relação representa carbonos quaternários.⁷³

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e HSQC dos ésteres metílicos das microalgas *A. coffeaeformis*, *C. gracilis*, *I. galbana* e *N. oculata* estão apresentados no APÊNDICE B.

6. CONCLUSÕES

O objetivo principal deste trabalho foi alcançado, superando a dificuldade de se trabalhar com a biomassa úmida de microalgas para produção de seus ésteres.

Dentre os objetivos específicos, o método utilizando micro-ondas para induzir a ruptura de células na biomassa de *N. oculata* úmida provou ser eficiente e robusto frente à variação de massa, pois não apresentou diferença significativa nos rendimentos das extrações a partir de 0,5 g de biomassa e 1,5 g. Além disso, com o triplo de biomassa a extração por micro-ondas alcançou maior rendimento, de 33,6(±2,6)%, com diferença significativa entre os resultados quando comparado com a extração por ultrassom da mesma massa de microalga (1,5 g) obteve 28,51(±0,8)%. Conclui-se que o desempenho do método de extração por micro-ondas foi satisfatório sendo vantajoso por utilizar apenas 1 minuto de tempo de extração. Também é importante ressaltar que 1 min de radiação de micro-ondas e a temperatura de 80 °C ajustada no método não degradaram os ácidos graxos extraídos. Ademais, o método de micro-ondas foi aplicado com sucesso em biomassa úmida de microalgas com paredes celulares formadas por diferentes constituintes. Portanto, este método é fácil, rápido, eficiente e robusto uma opção promissora para extrações de rotina.

De maneira inédita o processo de hidrólise-esterificação na presença de um solvente dispersor foi aplicado à biomassa úmida de diferentes espécies de microalgas. O uso de acetona como solvente dispersor na presença de hexano (solvente extrator) na reação de hidrólise foi muito bem sucedida. A condição ideal estabelecida para a reação de hidrólise foi 5 mL de acetona, 10 mL de hexano, 10% de H₂SO₄ e 4 h de reação a 100 °C. Para a reação de esterificação foi razão molar de metanol:ácido graxo 30:1, 10% de H₂SO₄ (em relação a massa de ácido graxo) por 1 h a 100 °C. Os rendimentos médios correspondentes as esterificações dos ácidos graxos das microalgas *A. coffeaeformis*, *C. gracilis*, *I. galbana* e *N. oculata* foram 91,80(±5,35), 90,19(±4,48), 88,01(±1,83), 85,52(±3,0)%, respectivamente.

Na comparação tanto entre os rendimentos (%) de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) empregando diferentes métodos de produção de FAMES de microalgas quanto entre as conversões de FAMES o processo de hidrólise-

esterificação apresentou os melhores resultados. Foram obtidos rendimentos maiores que 85% (em relação à massa de ácido graxo) e conversões acima de 100% para as microalgas *A. coffeaeformis*, *C. gracilis* e *I. galbana*. Com base nos resultados apresentados, conclui-se que o método de hidrólise-esterificação na presença do solvente dispersor acetona foi eficaz na produção de FAMES a partir de biomassa algácea úmida, provando também ser robusto quando aplicado a diferentes espécies de microalgas.

7. TRATAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS

Os efluentes provenientes do cultivo de microalgas são caracterizados por altas concentrações de nitrogênio (N), fósforo (P) e material em suspensão, conseqüentemente, altos valores de demanda bioquímica de oxigênio (DBO). Neste trabalho, a água residual do cultivo de microalgas foi utilizada para produzir um sistema chamado BFT (Biofloc Technology), que é usado como alimentação suplementar na produção de camarões. Neste sistema, a mesma água do cultivo é utilizada por vários ciclos de produção, onde a microbiota contribui na manutenção da qualidade de água e serve de suplemento alimentar para animais cultivados diminuindo os riscos de disseminação de doenças e provendo benefícios nutricionais. Os bioflocos formados são constituídos basicamente por bactérias, microalgas, protozoários, larvas de invertebrados, exoesqueletos e restos de animais mortos, predominando uma biota aeróbica e heterotrófica, sendo fontes de macronutrientes.

Neste trabalho, os resíduos líquidos foram recolhidos, colocados em recipientes de vidro âmbar, rotulados de acordo com as normas definidas pela comissão de resíduos da Escola de Química e Alimentos, e armazenados para posterior recolhimento e tratamento por empresa contratada pela Universidade.

Os resíduos sólidos gerados neste trabalho basicamente foram as tortas de microalgas após aplicar os processos de extração, transesterificação *“in situ”* ou hidrólise. Essas tortas residuais foram guardadas em recipientes de plástico, devidamente identificadas e estocadas em freezer. Estão sendo estudadas por outros grupos de pesquisa também participantes do projeto Chamada MCTI/CNPq Nº 56/2013 - *Produção de Biodiesel e de Bioprodutos de Interesse Farmacológico e Tecnológico a Partir de Biomassa Úmida de Microalgas.*

8. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudar o Scaling-up do processo de hidrólise-esterificação empregando biomassa algácea úmida.

9. APÊNDICE

Apêndice A - Perfis cromatográficos dos ésteres metílicos dos ácidos graxos das microalgas *A. coffeaeformis*, *C. gracilis*, *I. galbana* e *N. oculata*.

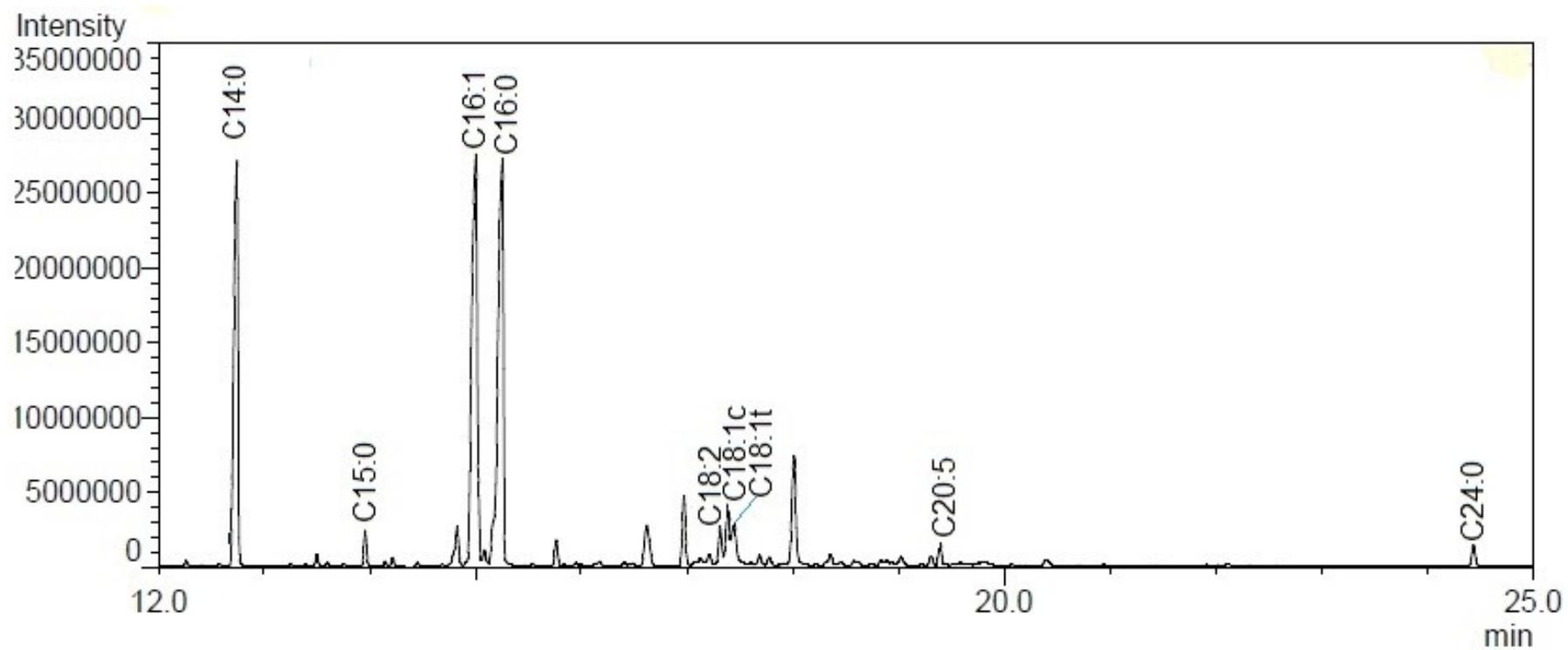


Figura 28. Perfil cromatográfico dos ésteres metílicos derivados dos ácidos graxos da microalga *A. coffeaeformis*

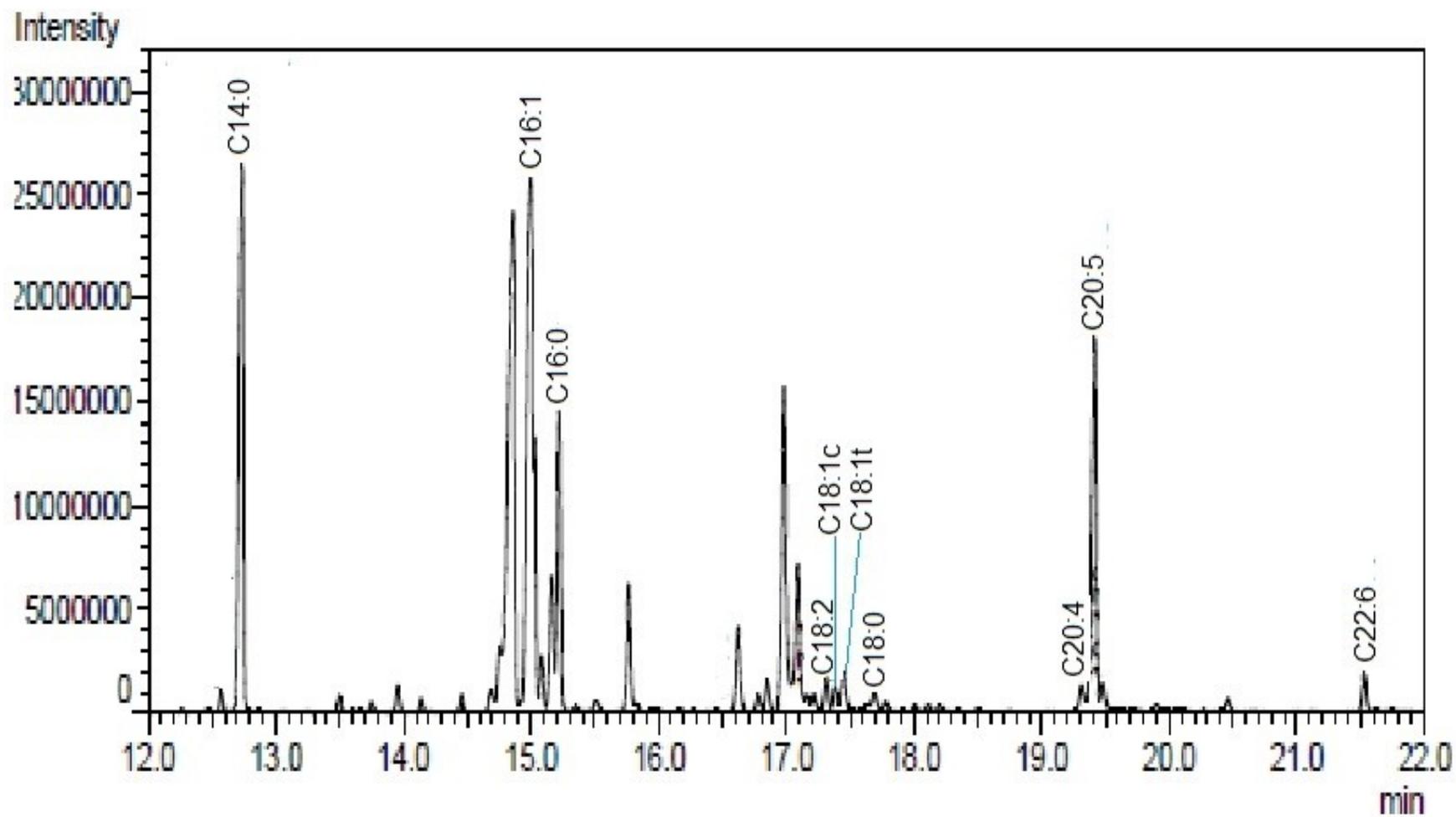


Figura 29. Perfil cromatográfico dos ésteres metílicos derivados dos ácidos graxos da microalga *C. gracilis*

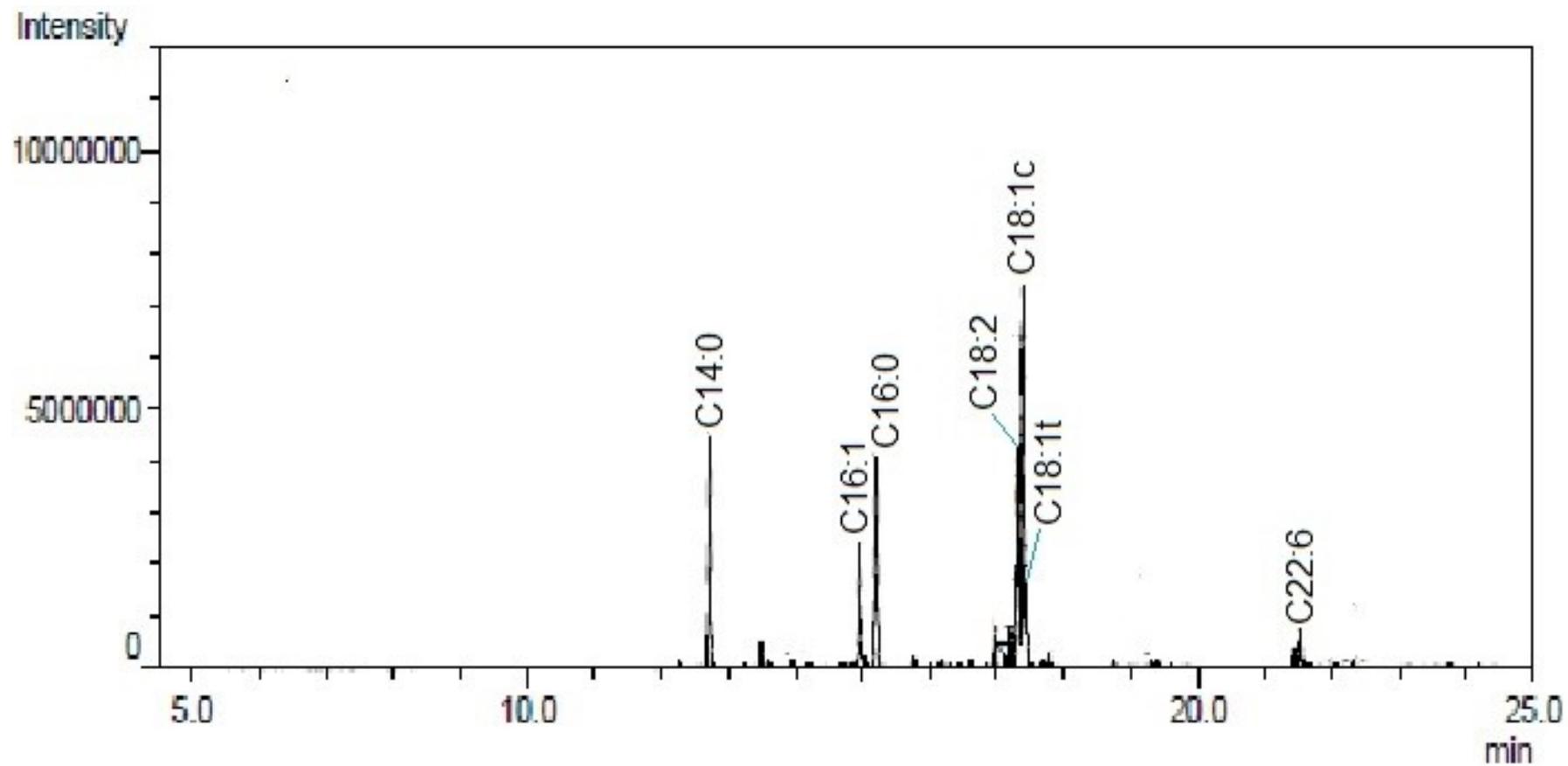


Figura 30. Perfil cromatográfico dos ésteres metílicos derivados dos ácidos graxos da microalga *I. galbana*

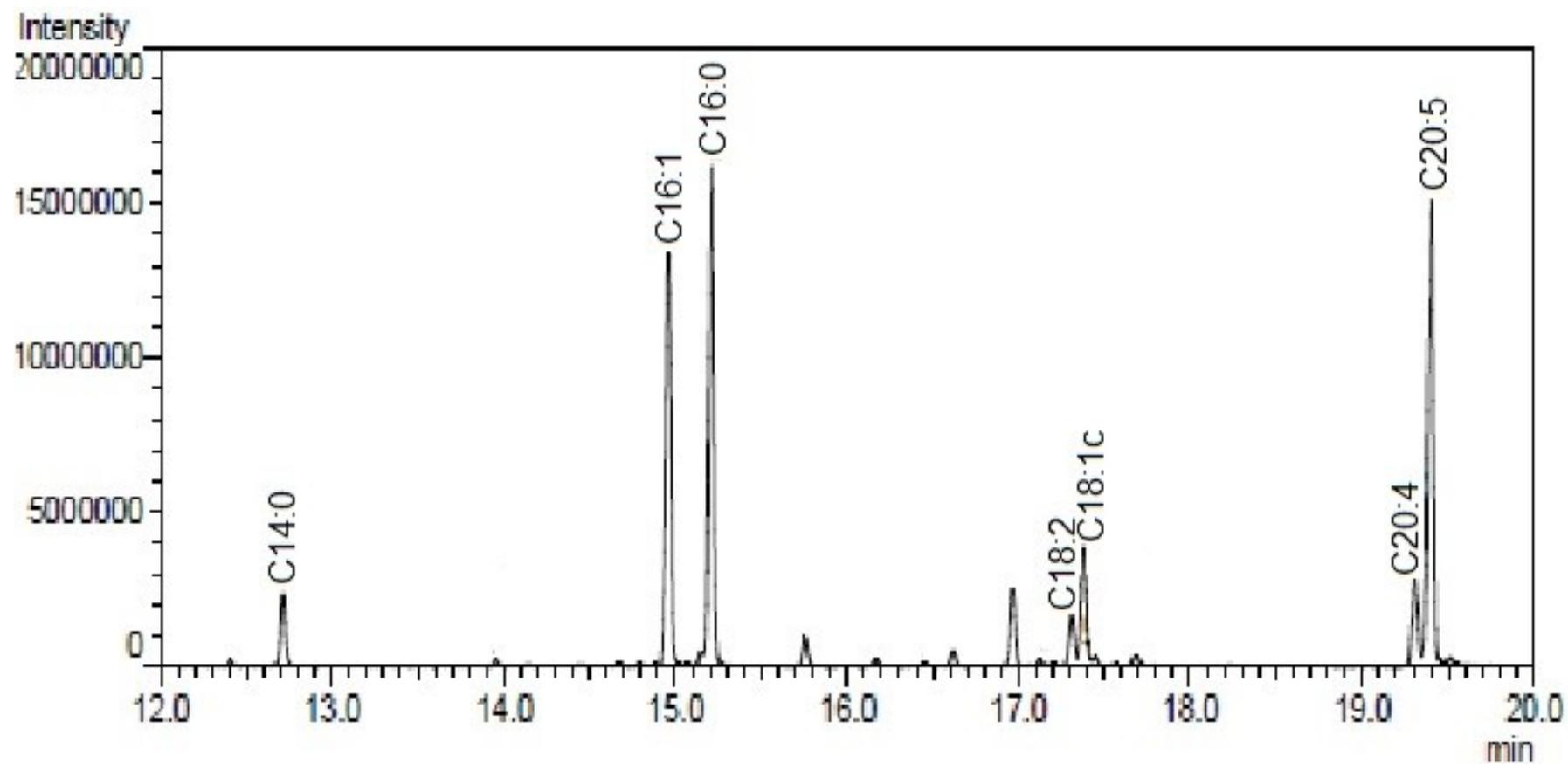


Figura 31. Perfil cromatográfico dos ésteres metílicos derivados dos ácidos graxos da microalga *N. oculata*

Apêndice B - Espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e HSQC dos ésteres metílicos das microalgas *A. coffeaeformis*, *C. gracilis*, *I. galbana* e *N. oculata*.

Marcelo_RenataM_1693_HENO5_H.001.esp

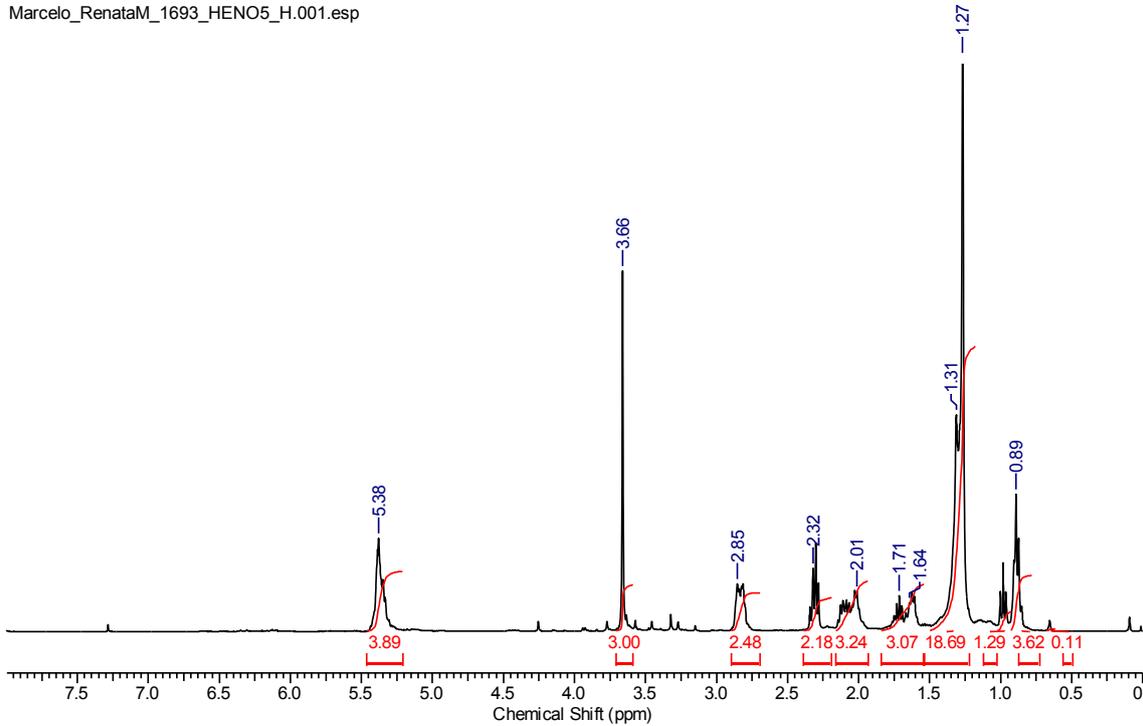


Figura 32. RMN ^1H (CDCl_3 , 400MHz) dos FAMES derivado da microalga *N. oculata*

Marcelo_RenataM_1702_HENO5_C.002.esp

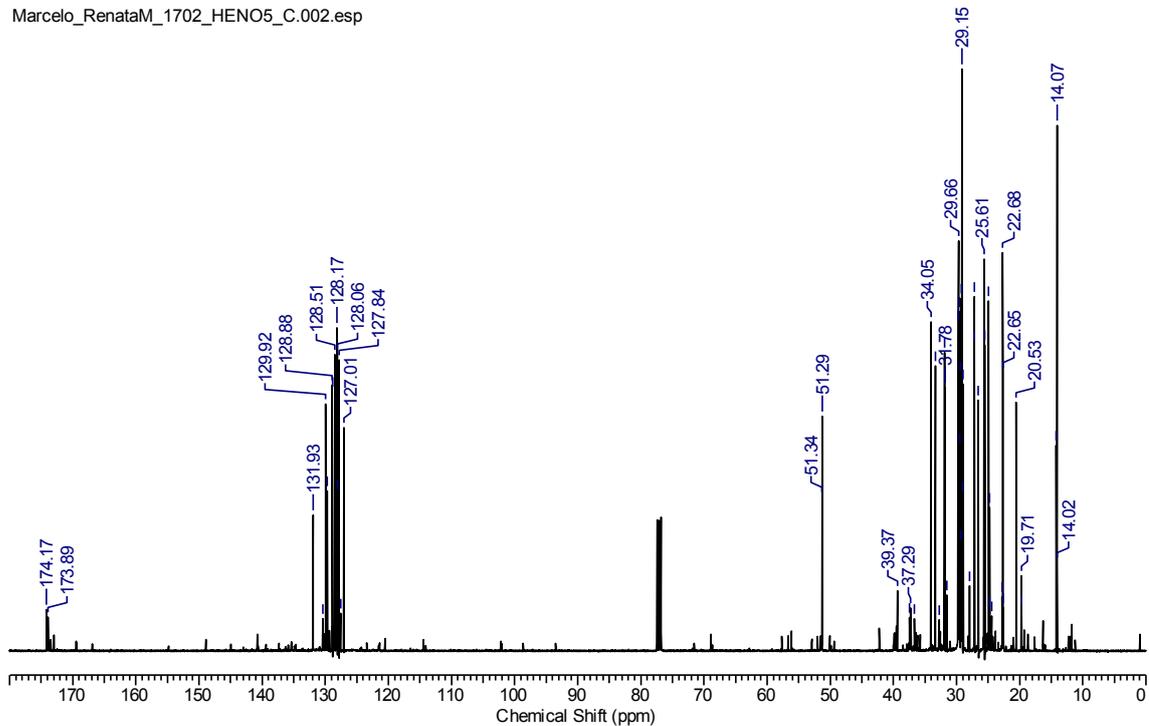


Figura 33. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100MHz) dos FAMES derivados da microalga *N. oculata*

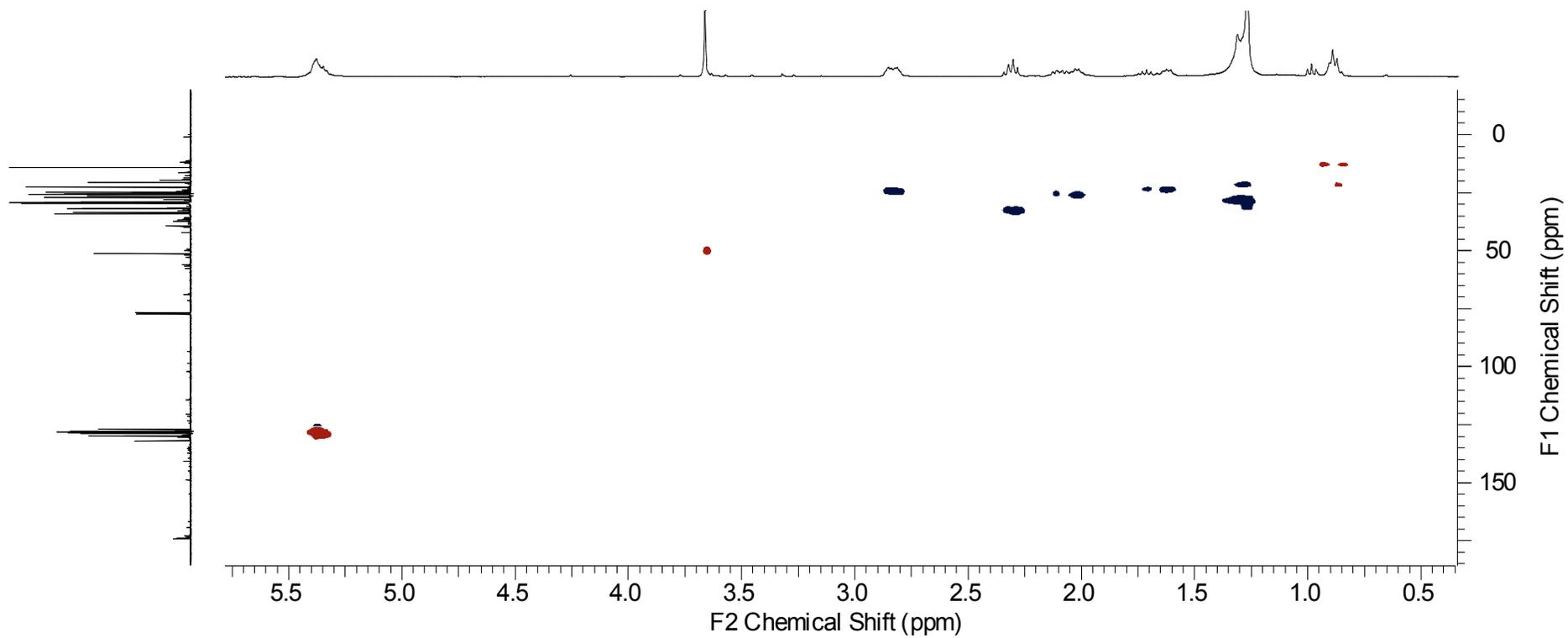


Figura 34. RMN HSQC (CDCl₃, 400/100MHz) dos FAMEs derivados da microalga *N. oculata*

Marcelo_RenataM_1694_ACHE3_H.001.esp

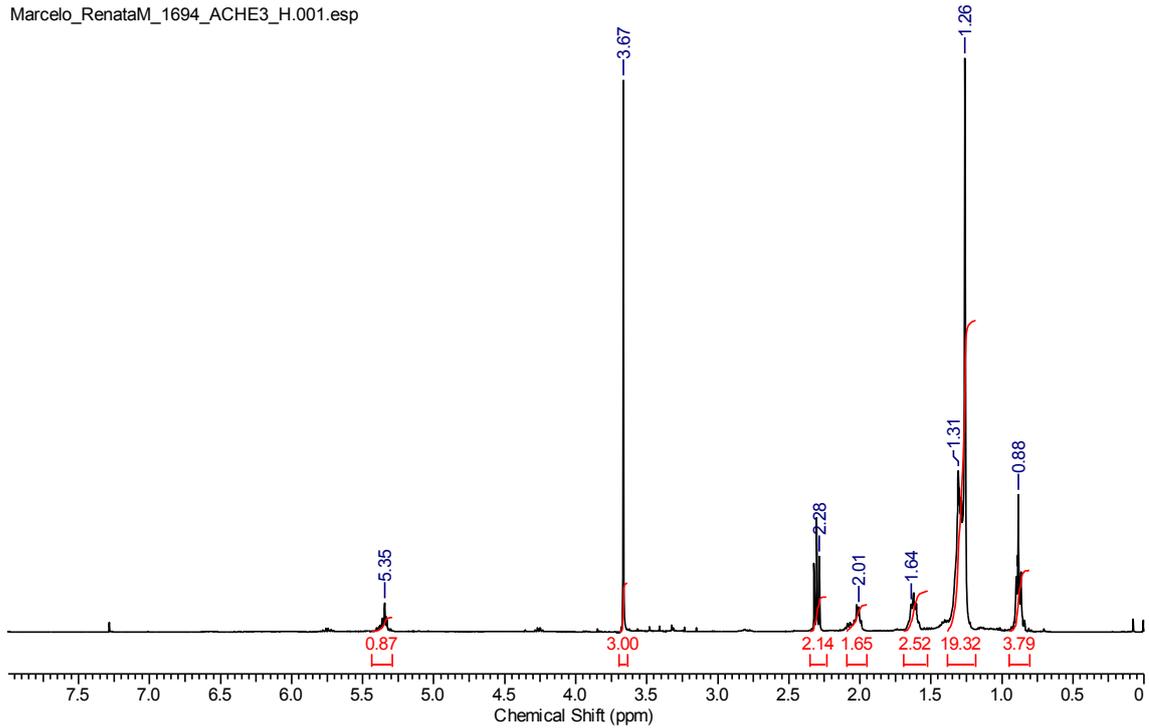


Figura 35. RMN¹H (CDCl₃, 400MHz) dos FAMES derivados da microalga *A. coffeaeformis*

Marcelo_RenataM_1701_ACHE3_C.002.esp

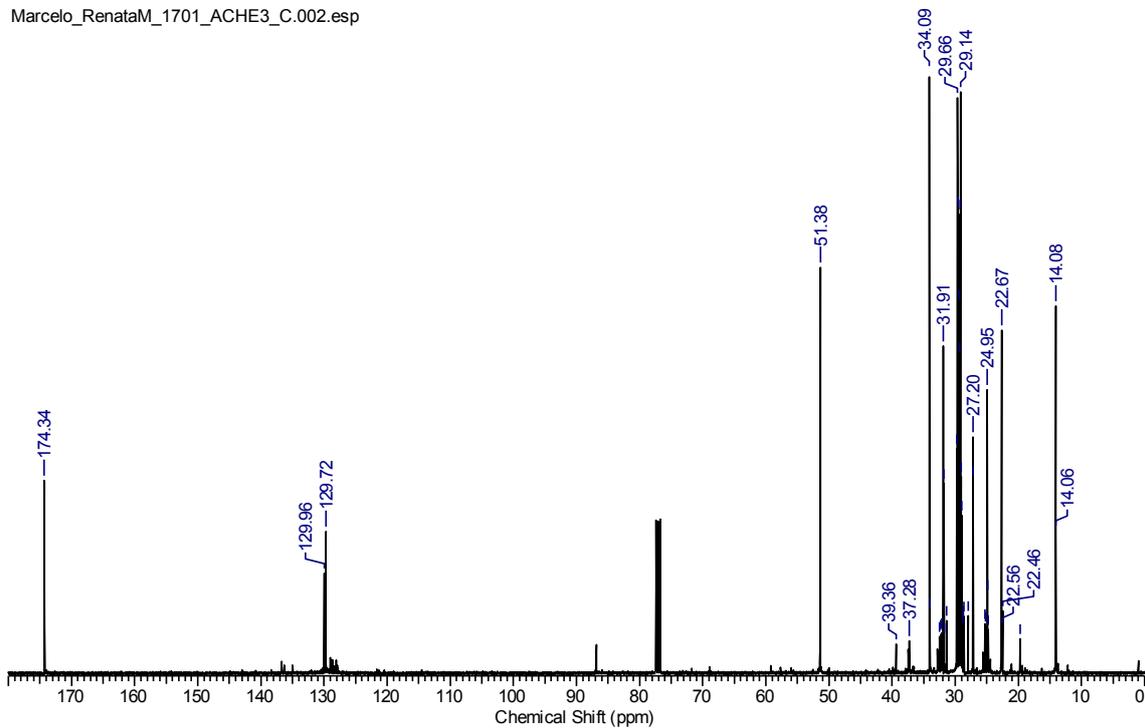


Figura 36. RMN¹³C (CDCl₃, 100MHz) dos FAMES derivados da microalga *A. coffeaeformis*

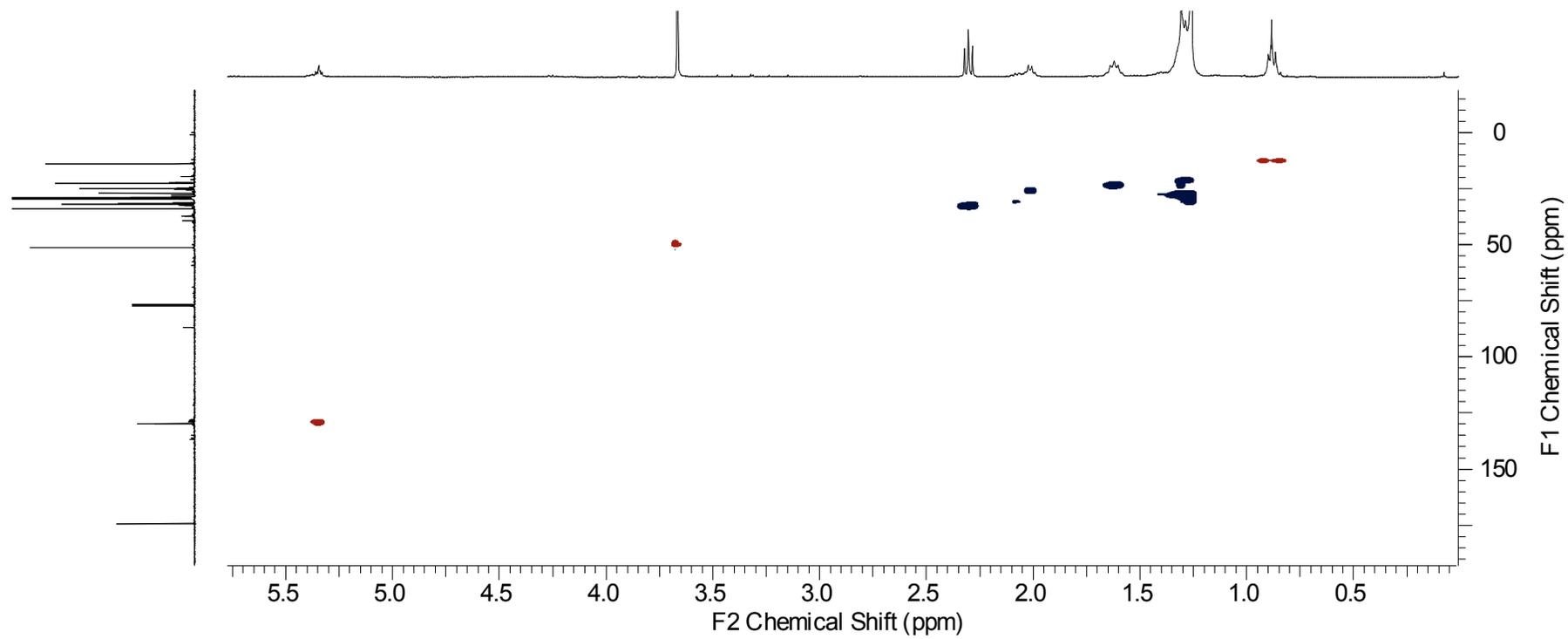


Figura 37. RMN HSQC (CDCl₃, 400/100MHz) dos FAMEs derivados da microalga *A. coffeaeformis*

Marcelo_RenataM_1695_CG2HE_H.001.esp

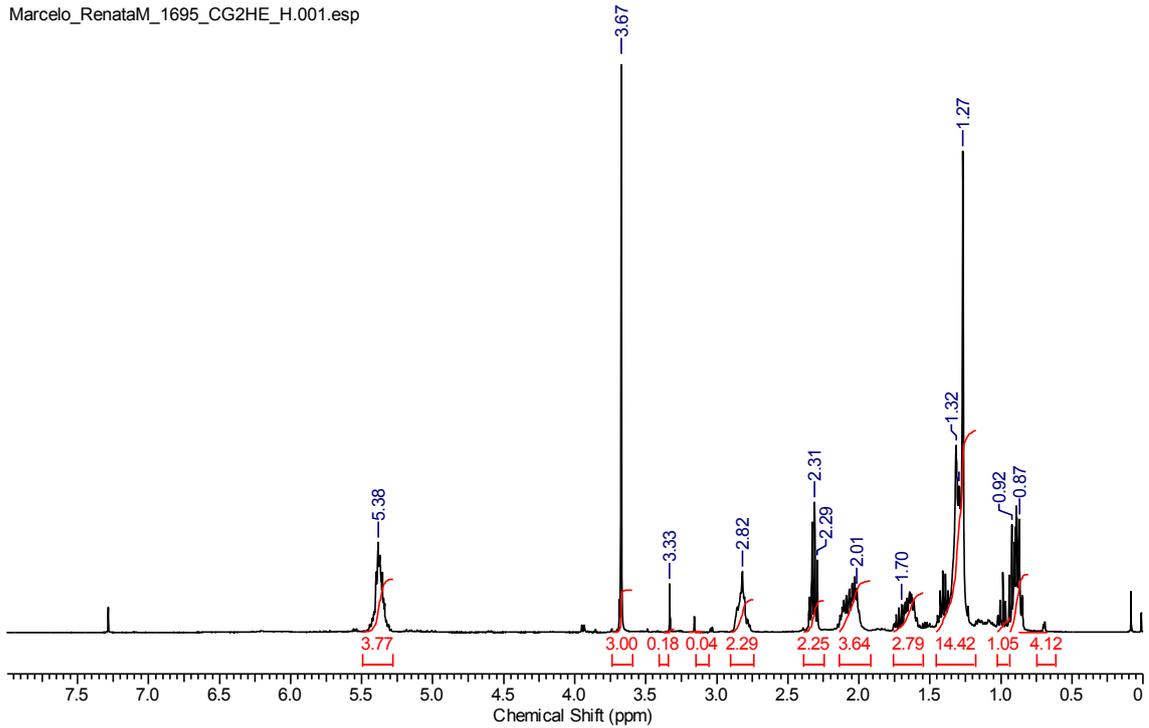


Figura 38. RMN¹H (CDCl₃, 400MHz) dos FAMES derivados da microalga *C. gracilis*

Marcelo_RenataM_1700_CG2HE_C.002.esp

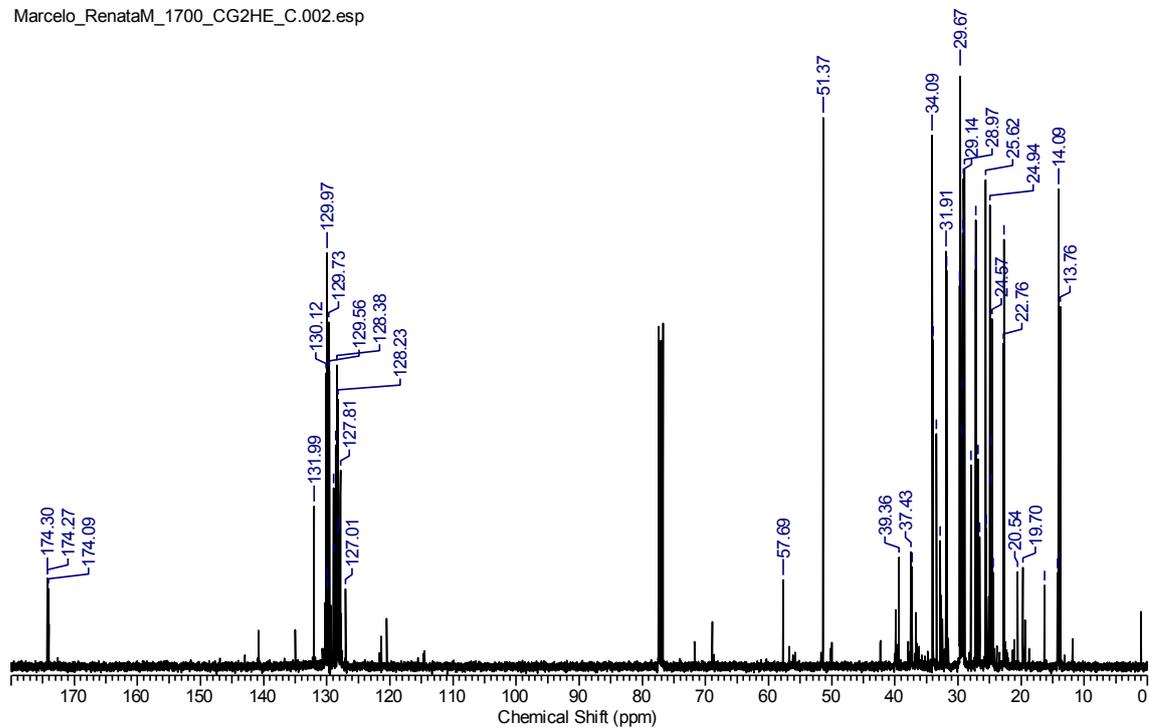


Figura 39. RMN¹³C (CDCl₃, 100MHz) dos FAMES derivados da microalga *C. gracilis*

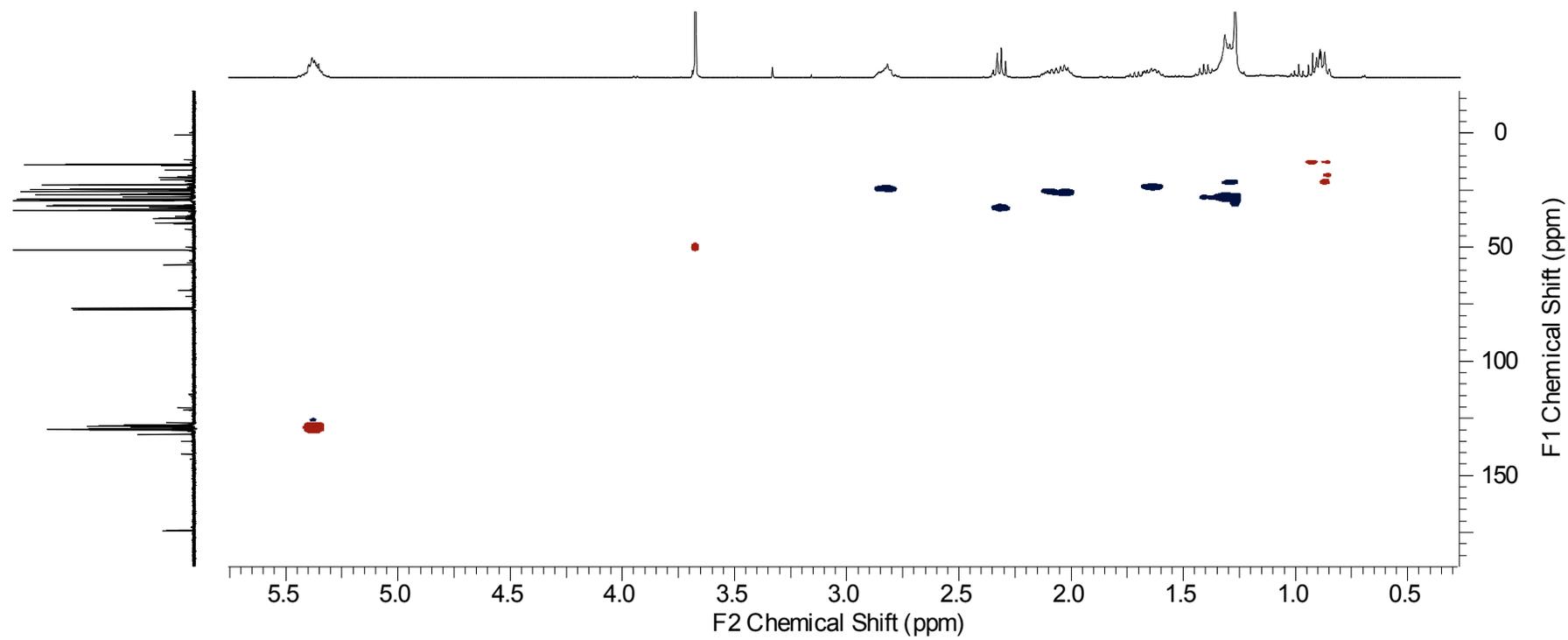


Figura 40. RMN HSQC (CDCl₃, 400/100MHz) dos FAMES derivados da microalga *C. gracilis*

Marcelo_RenataM_1696_IGHE2_H.001.esp

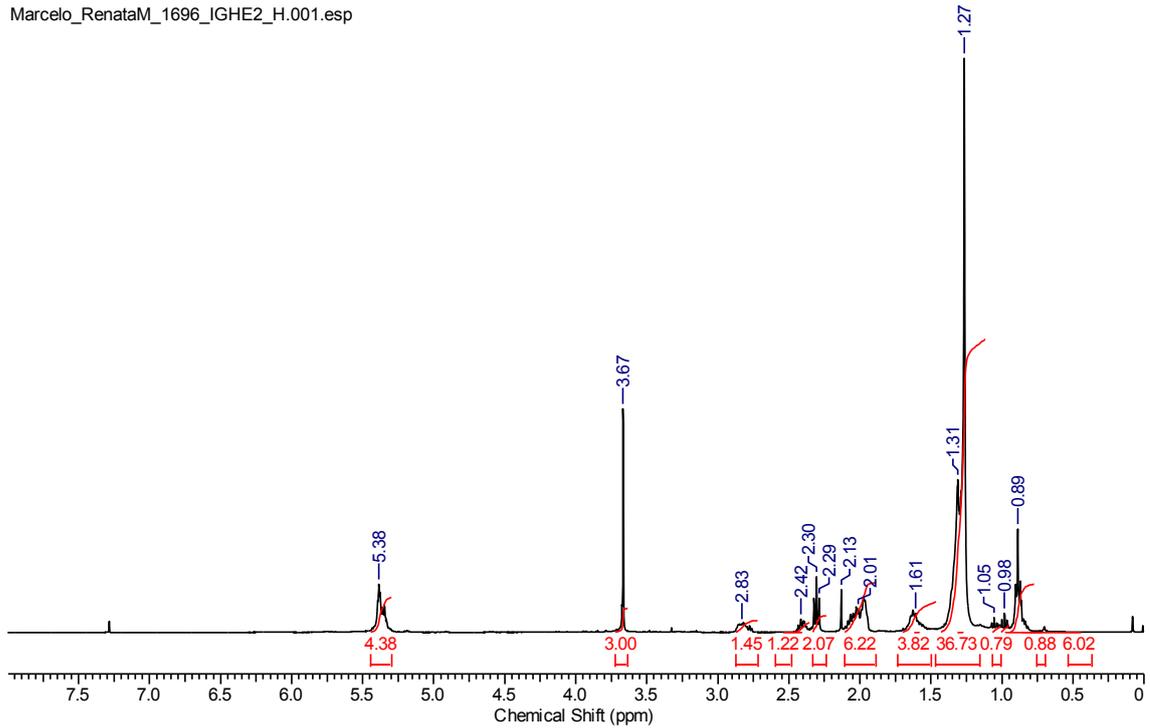


Figura 41. RMN¹H (CDCl₃, 400MHz) dos FAMES derivados da microalga *I. galbana*

Marcelo_RenataM_1699_IGHE2_C.002.esp

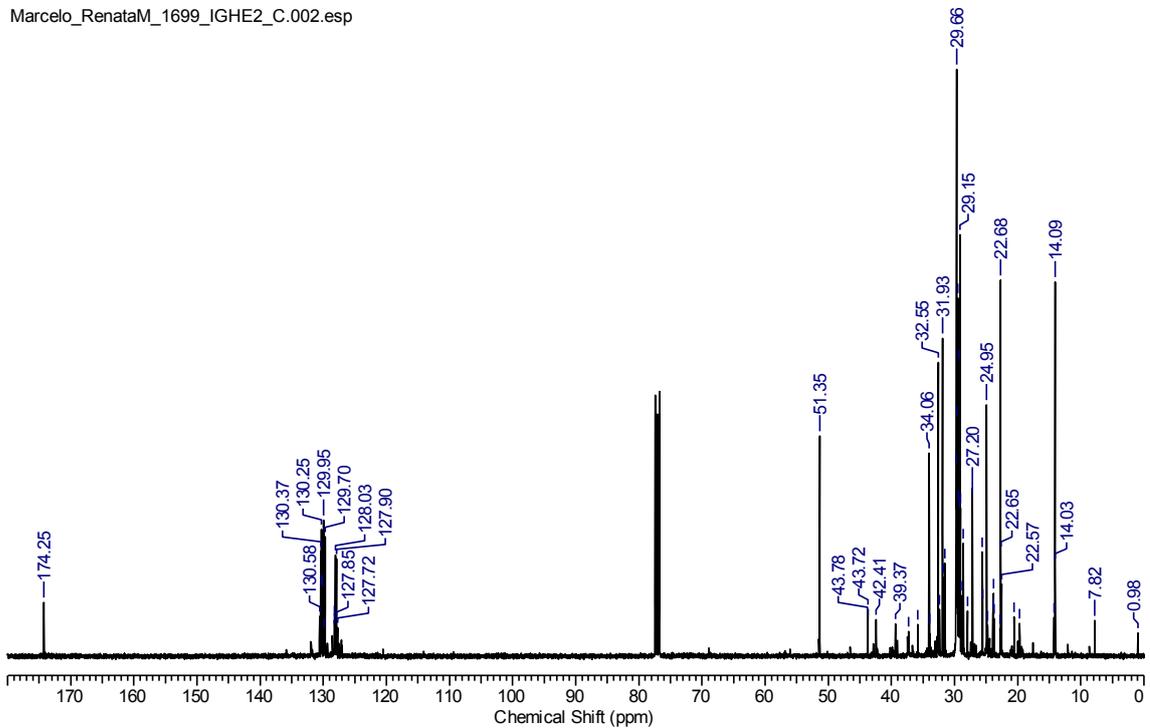


Figura 42. RMN¹³C (CDCl₃, 100MHz) dos FAMES derivados da microalga *I. galbana*

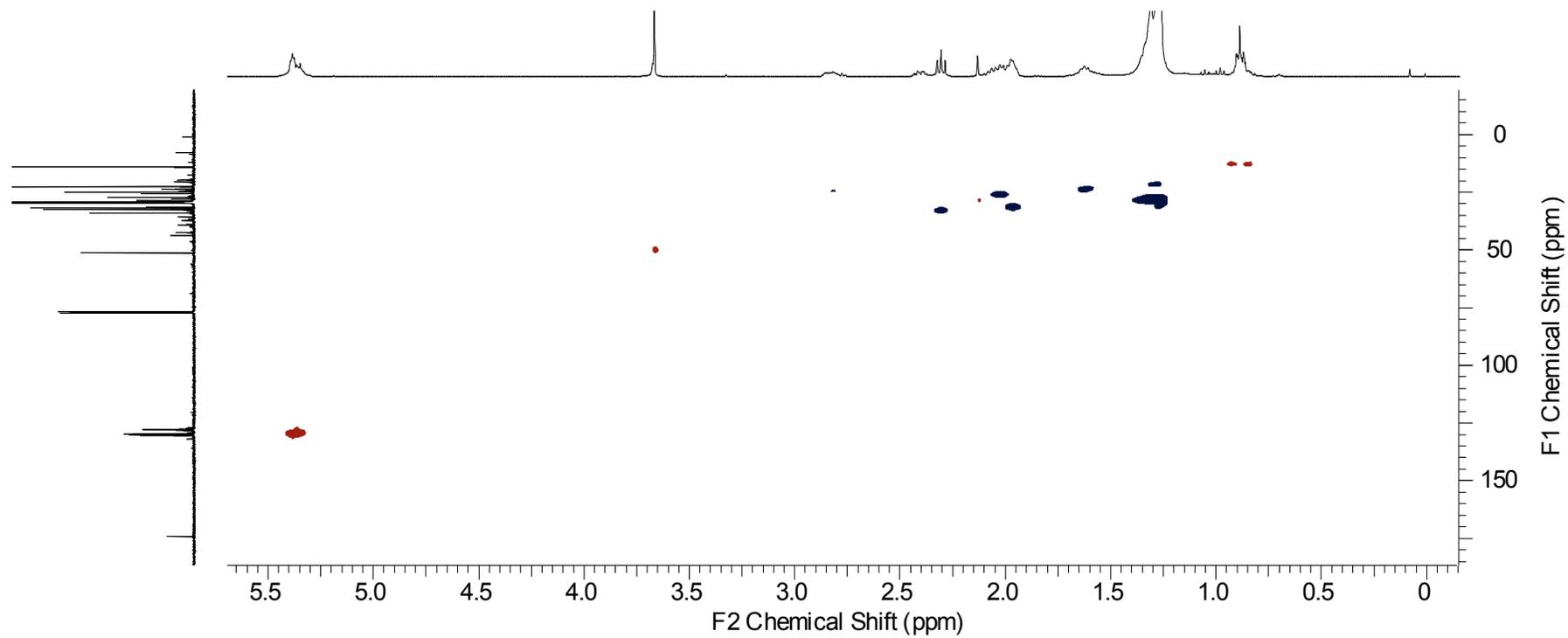


Figura 43. RMN HSQC (CDCl₃, 400/100MHz) dos FAMES derivados da microalga *I. galbana*

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25 (2007) 294-306.
2. Cheng, J.; Sun, J.; Huang, Y.; Feng, J.; Zhou, J.; Cen, K. Dynamic microstructures and fractal characterization of cell wall disruption for microwave irradiation-assisted lipid extraction from wet microalgae. *Bioresource Technology* 150 (2013) 67-72.
3. Alaswad, A.; Dassisti, M.; Prescott, T.; Olabi, A.G. Technologies and developments of third generation biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 51 (2015) 1446–1460.
4. Chia, S.R.; Chew, K.W.; Show, P.L.; Ong, H.C.; Phang, S-M.; Ling, T.C.; Nagarajan, D.; Lee, D-J.; Chang, J-S. Sustainable approaches for algae utilization in bioenergy production, *Renewable Energy* (2017), doi: 10.1016/j.renene.2017.04.001.
5. Lourenço, S. O. *Cultivo de Microalgas Marinhas – princípios e aplicações.* – São Carlos: RiMa, **2006**.
6. Demirbas, A. Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems. *Applied Energy* 88, 10 (2011) 3541-3547.
7. Okuda, K. Structure and phytoeny of cell coverings. *Journal of Plant Research* (2002) 283-288.
8. D'Oca, M. G. M.; Viêgas, C. V.; Lemões, J. S.; Miyasaki, E. K.; Morón-Villarreyes, J. A. M.; Primel, E.; Abreu, P. Production of FAMEs from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. *Biomass and Bioenergy* 35 (2011) 1533-1538.
9. Knothe, G.; Razon, L.F. Biodiesel fuels. *Progress in Energy and Combustion Science* 58 (2017) 36–59.
10. Knothe, G. A technical evaluation of biodiesel from vegetable oils vs. algae. Will algae-derived biodiesel perform? *Green Chemistry* 13 (2011) 3048-3065.
11. Chisti, Y. Constraints to commercialization of algal fuels. *Journal of Biotechnology* 167 (2013) 201– 214.
12. Lardon, L.; Elias, A.; Sialve, B.; Steyer, J-F.; Bernard, O. Life-Cycle Assessment of Biodiesel Production from Microalgae. *Environmental Science & Technology* 43, 17 (2009) 6475-6481.

13. Song, C.; Liu, Q.; Ji, N.; Deng, S.; Zhao, J.; Li, S.; Kitamura, Y. Evaluation of hydrolysis–esterification biodiesel production from wet microalgae. *Bioresource Technology* 214 (2016) 747–754.
14. Velasquez-Orta, S.B.; Lee, J.G.M. Evaluation of FAME production from wet marine and freshwater microalgae by in situ transesterification, *Biochemical Engineering Journal* (2013) 76, 83–89
15. Cao, H.; Zhang, Z.; Wu, X.; Miao, X. Direct biodiesel production from wet microalgae biomass of *Chlorella pyrenoidosa* through *in situ* transesterification. *BioMed Research International* (2013) 1-6.
16. Sathish, A.; Smith, B.R.; Sims, R.C. Effect of moisture on in situ transesterification of microalgae for biodiesel production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 89 (2014) 137-142.
17. Ehimen, E.A.; Sun, Z.F.; Carrington, C.G. Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids. *Fuel* 89 (2010) 677–684.
18. Takisawa, K.; Kanemoto, K.; Miyazaki, T.; Kitamura, Y. Hydrolysis for direct esterification of lipids from wet microalgae. *Bioresource Technology* 144 (2013) 38–43.
19. Chisti, Y. Fuels from microalgae. *Biofuels* 1(2010) 233–235.
20. Medina, A.R.; Grima, E.M.; Giménez, A.G.; González, M.J.I. Downstream Processing of Algal Polyunsaturated Fatty Acids. *Biotechnology Advances* 16, 3 (1998) 517-580.
21. Halim, R.; Danquah, M. K.; Webley, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances* 30 (2012) 709–732.
22. P.M. Dey, J.B. Harborne. *Plant Biochemistry*. Londres: Academic Press, 1997.
23. P.M. Dewick. *Medicinal Natural Products - A Biosynthetic Approach*.- 2 ed. Inglaterra: John Wiley & Sons, 2002.
24. Brown, M.R.; Jeffrey, S.W.; Olkman, J.K.; Dunstan, G.A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151 (1997) 315-331.
25. Sánchez, S.; Martínez, M.E.; Espinola, F. Biomass production and biochemical variability of the marine microalgae *Isochrysis galbana* in relation to culture medium. *Biochemical Engineering Journal* 6 (2000) 13-18.
26. Gonzalez-Rodriguez, E.; Maestrini, S.Y. The Use of Some Agricultural Fertilizers For The Mass Production of Marine Algae. *Aquaculture* 36 (1984) 245-256.

27. J.A. Simental, M.P. Sánchez-Saavedra. The effect of agricultural fertilizer on growth rate of benthic diatoms. *Aquacultural Engineering* 27 (2003) 265-272.
28. Roselet, F.; Vandamme, D.; Roselet, M.; Muylaert, K.; Abreu, P.C. Screening of commercial natural and synthetic cationic polymers for flocculation of freshwater and marine microalgae and effects of molecular weight and charge density. *Algal Research* 10 (2015) 183–188.
29. Knothe, G. Fuel Properties of Highly Polyunsaturated Fatty Acid Methyl Esters. Prediction of Fuel Properties of Algal Biodiesel. *Energy Fuels* 26 (2012) 5265–5273.
30. Bucy, H.B.; Baumgardner, M.E.; Marchese, A.J. Chemical and physical properties of algal methyl ester biodiesel containing varying levels of methyl eicosapentaenoate and methyl docosahexaenoate. *Algal Research* 1 (2012) 57–69.
31. Lee, A.K.; Lewis, D.M.; Ashman, P.J. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: processes and specific energy requirements, *Biomass Bioenergy* 46 (2012) 89-101.
32. Chen, C-L.; Huang, C-C.; Ho, K-C.; Hsiao, P-X.; Wua, M-S.; Chang, J-S. Biodiesel production from wet microalgae feedstock using sequential wet extraction/transesterification and direct transesterification processes. *Bioresource Technology* 194 (2015) 179–186.
33. Lee, J.Y.; Yoo, C.; Jun, S.; Ahn, C. Y.; Oh, H. M. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology* 101 (2010) S75–S77.
34. Dong, T.; Wang, J.; Miao, C.; Zheng, Y.; Chen, S. Two-step in situ biodiesel production from microalgae with high free fatty acid content. *Bioresource Technology* 136 (2013) 8–15.
35. Martinez-Guerra, E.; Gude, V.G.; Mondala, A.; Holmes, W.; Rafael Hernandez, R. Extractive-transesterification of algal lipids under microwave irradiation with hexane as solvent. *Bioresource Technology* 156 (2014) 240–247.
36. Lemões, J.S.; Alves-Sobrinho, R.C.M.; Farias, S.P.; Moura, R.R.; Primel, E.G.; Abreu, P.C.; Martins, A.F.; D'Oca, M.G.M. Sustainable production of biodiesel from microalgae by direct transesterification. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 3 (2016) 33–38.
37. Fernando, S.; Samarasinghe, N.; Lacey, R.; Faulkner, W. B. Algal cell rupture using high pressure homogenization as a prelude to oil extraction. *Renewable Energy* 48 (2012) 300-308.

38. Halim, R.; Harun, R.; Danquah, M.K.; Webley, P.A. Microalgal cell disruption for biofuel development. *Applied Energy* 91 (2012) 116-121.
39. McMillan, J.R.; Watson, I.A.; Ali, M.; Jaafar, W. Evaluation and comparison of algal cell disruption methods: Microwave, waterbath, blender, ultrasonic and laser treatment. *Applied Energy* 103 (2013) 128-134.
40. Ali, M.; Watson, I.A. Microwave treatment of wet algal paste for enhanced solvent extraction of lipids for biodiesel production, *Renewable Energy* 76 (2015) 470-477.
41. Teo, C.L.; Idris, A. Enhancing the various solvent extraction method via microwave irradiation for extraction of lipids from marine microalgae in biodiesel production. *Bioresource Technology* 171 (2014) 477–481.
42. Im, H.J.; Lee, H.S.; Park, M.S.; Yang, J.W.; Lee, J.W. Concurrent extraction and reaction for the production of biodiesel from wet microalgae. *Bioresource Technology* 152 (2014) 534-537.
43. Suh, W.I.; Mishra, S.K.; Tae-Hyoung Kim, T-H.; Farooq, W.; Moon, M.; Shrivastav, A.; Park, M.S.; Yang, J-W. Direct transesterification of wet microalgal biomass for preparation of biodiesel. *Algal Research* 12 (2015) 405–411.
44. Park, J-Y.; Park, M.S.; Lee, Y-C.; Yang, J-W. Advances in direct transesterification of algal oils from wet biomass, *Bioresource Technology* (2015) 184, 267–275.
45. Levine, R.B.; Pinnarat, T.; Savage, P.E. Biodiesel Production from Wet Algal Biomass through in Situ Lipid Hydrolysis and Supercritical Transesterification. *Energy Fuels* 24 (2010) 5235–5243.
46. Alves-Sobrinho, R.C.M.; Vauchinski, L.; Moura, R.R.; Primel, E.G.; Abreu, P.C.V.; Marcelo G. Montes D'Oca, M.G.M.. FAME Production and Fatty Acid Profiles from Moist *Chlorella sp.* and *Nannochloropsis oculata* Biomass. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 92 (2015) 423–430.
47. Takisawa, K.; Kanemoto, K.; Kartikawati, M.; Kitamura, Y. Simultaneous hydrolysis-esterification of wet microalgal lipid using acid. *Bioresource Technology* 149 (2013) 16–21.
48. Rezaee, M.; Assadi, Y.; Hossein, M.M.; Aghaee, E.; Ahmadi, F.; Berijani, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal Chromatography A* 1116 (2006)1-9.
49. Harris DC. *Análise Química Quantitativa*. 8th ed. Rio de Janeiro: LTC; 2012. 886 p.

50. Martins, M.L.; Primel, E.G.; Caldas, S.S.; Prestes, O.D.; Adaime, M.B.; Zanella, R. Microextração Líquido-Líquido dispersiva. *Scientia Chromatographica* 4 (2012)35-51.
51. Maeda, Y.; Thanh, L.T.; Imamura, K.; Izutani, K.; Okitsu, K.; Boi, L.V. New technology for the production of biodiesel fuel. *Green Chem* 13 (2010) 1124-1128.
52. Thanh, L.T.; Okitsu, K.; Sadanaga, Y.; Takenaka, N.; Maeda, Y.; Bandow, H. A new co-solvent method for the green production of biodiesel fuel – Optimization and practical application. *Fuel* 103 (2013) 742–748.
53. Yamashita, C.; Magalhães, P.M.D.S. Métodos simples para o cultivo da alga *Tetraselmis chuii*. EMPARN-Boletim de Pesquisa 1984:1-20.
54. Roselet, F.; Burkert, J.; Abreu, P.C. Flocculation of *Nannochloropsis oculata* using a tannin-based polymer: Bench scale optimization and pilot scale reproducibility. *Biomass Bioenergy* 87 (2016) 55-60.
55. Guillard, R. R. L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: *Culture of Marine Invertebrates Animals* (ed.). Plenum Publishing, New York, New York, p. 29 – 60.
56. Zhu, M.; Zhou, P.P.; Yu, L. Extraction of lipids from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids. *Bioresource Technology* 84 (2002) 93–95.
57. Metcalfe, L.D.; Schmitz, A.A.; Pelka, J.R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas liquid chromatography. *Analytical Chemistry* 38 (1966) 514–515.
58. Rodrigues, M.I.; Iemma, A.F. Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos. – 1ª Ed. – Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005.
59. D'Oca M.G.M.; Soares, R.M.; Moura, R.R.; Granjão, V.D. Sulfamic acid: an efficient acid catalyst for esterification of FFA. *Fuel* 97 (2012) 884–886.
60. EN 14103: Determinação do Teor de éster e ésteres metílicos de ácido linolênico por cromatografia gasosa (2003). Disponível em < <http://www.en-standard.eu/csn-en-14103-fat-and-oil-derivatives-fatty-acid-methyl-esters-fame-etermination-of-ester-and-linolenic-acid-methyl-ester-contents/?gclid=CJuLuPqSgbECFQgGnQodrH1Y7A>>. Acesso em 23 mar.2017
61. Im, H.; Kim, B.; Lee, J.W. Concurrent production of biodiesel and chemicals through wet in situ transesterification of microalgae. *Bioresource Technology* 193 (2015) 386–392.

62. Campos, V.B.; Barbarino, E.; Lourenço, S.O. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. *Ciência Rural* 40, 2 (2010) 339-347.
63. Nguyen-Deroche, T.L.N.; LE, T.T.; Bui, T.V.; Ringé, Y.; Tremblin, G.; Morant-Manceau, A. Effects of copper on growth and photosynthesis in marine diatoms: A comparison between species from two different geographical areas. *Cryptogamie, Algol* 30, 2 (2009) 1-13.
64. Moura-Junior, A.M.; Bezerra-Neto, E.; Koenig, M.L.; Leça, E.E. Composição química de microalgas em cultivo semi-intensivo: *Chaetoceros gracilis* Schutt, *Isochrysis galbana* Parke e *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) G. Fryxell & Hasle. *Revista Ciência Agronômica* 37, 2 (2006) 142-148.
66. Balasubramanian, S.; Allen, J.D.; Kanitkar, A.; Boldor, D. Oil extraction from *Scenedesmus obliquus* using a continuous microwave system e design, optimization, and quality characterization, *Bioresource Technology* 102 (2011) 3396-403.
66. Naghdi, F.G.; González, L.M.G.; Chan, W.; Schenk, P.M. Progress on lipid extraction from wet algal biomass for biodiesel production, *Microbial Biotechnology* 9, 6 (2016) 718-26.
67. Lee, S.H.; Karawita, R.; Affan, A.; Lee, J.B.; Lee, K.W.; Lee, B.J.; Kim, D.W.; Jeon, Y.J. Potential of Benthic Diatoms *Achnanthes longipes*, *Amphora coffeaeformis* and *Navicula* sp. (Bacillariophyceae) as Antioxidant Sources. *Algae* 24,1 (2009) 47-55.
68. Pimolrat, P.; Direkbusarakom, S.; Chinajariyawong, C.; Powtongsook, S. The Effect of Sodium Bicarbonate Concentrations on Growth and Biochemical Composition of *Chaetoceros gracilis* Schutt. *Kasetsart University Fisheries Reserch Bulletin* 34, 2 (2010) 40-47.
69. Gorgônio, C.M.S.; Aranda, D.A.G.; Couri, S. Morphological and chemical aspects of *Chlorella pyrenoidosa*, *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis gracilis microalgae*. *Natural Science* 5 (2013) 783-791.
70. Borges, L.; Morón-Villarreyes, J.A.; D'Oca, M.G.M.; Abreu, P.C. Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. *Biomass Bioenergy* 35 (2011) 4449-4454.
71. Adamczyk, M.; Lasek, J.; Skawińska, A. CO₂ biofixation and growth kinetics of *Chlorella vulgaris* and *Nannochloropsis gaditana*, *Applied Biochemistry and Biotechnology* (2016) 1-14.

72. Thanh,L.T.; Okitsu, K.; Sadanaga, Y.; Takenaka,N.; Maeda, Y.; Bandow, H. A new co-solvent method for the green production of biodiesel fuel – Optimization and practical application. *Fuel* 103 (2013) 742–748.
73. Sathish, A.; Sims, R.C. Biodiesel from mixed culture algae via a wet lipid extraction procedure. *Bioresource Technology* 118 (2012) 643–647.
74. Kaiser, C.R. RMN 2D: Detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. *Química Nova* 23, 2 (2000) 231-236.