

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GISELLE DE SOUZA SILVA

EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE MICROALGAS PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

CURITIBA

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GISELLE DE SOUZA SILVA

EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE MICROALGAS PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Fernando de Lima Luz Jr.

CURITIBA

2013

DEDICATÓRIA

“Aquele que começou a boa obra em minha vida.

É fiel, Ele é fiel!

Não descansará, não desistirá,

Enquanto não houver terminado

Não vivo do que vejo, mas vivo do que creio

E Ele é fiel, sim Jesus Cristo é fiel”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Jesus Cristo por tudo, por ter me dado à vida, pelas forças e amparo sempre que precisei.

A minha família que em meio a tantas dificuldades nunca desistiram de lutar por mim, agradeço a eles pela compreensão, dedicação e orações.

Ao Prof. Marcos Lúcio Corazza, pela orientação, amizade, paciência, por se dispor a me ajudar e por ter acreditado no meu trabalho, obrigada por tudo!

Ao Prof. Arion Zandoná Filho, pelo desenvolvimento das análises, e por toda ajuda e contribuição para melhoria do meu trabalho;

Ao Prof. Marcelo Kaminski Lenzi, pela amizade, incentivo, por estar disposto sempre a ajudar e aconselhar.

Ao Prof. Luiz Fernando de Lima Luz Jr pelo auxílio nas correções.

Ao Prof. Luiz Pereira Ramos, por disponibilizar o laboratório;

Ao Francis Joseane, Marcus Vinícius Brandalize e Vinícius Kothe pelo auxílio;

A Fabiane Hamerski, pela amizade e por ter me ajudado sempre que precisei;

Ao meu namorado Alexis Miguel Escorsim, pelo companheirismo, pela força, por sempre estar presente.

Aos meus grandes e inesquecíveis amigos do mestrado: Bruno Paulin, Caroline Carriel, Érika Vasques, Juliana Pedrilho Foltin, Larissa Cesa (Loira), Larissa Maria Pereira, Luís Ricardo Kanda, Paola Gashi e Odilon Allison da Silva Araújo.

À Coordenação do curso de Pós-Graduação em Engenharia Química e em especial a Cintya Kuznharski pela atenção e amizade.

Ao Reuni pela bolsa concedida.

“Acredito que só uma pessoa dentre mil, conhece o truque de viver verdadeiramente no presente. A maioria de nós passa cinquenta e oito minutos de cada hora ou vivendo no passado, lamentando por alegrias perdidas, sentindo vergonha pelas escolhas mal feitas (ambas inúteis e enfraquecedoras); ou vivendo no futuro pelo qual tanto ansiamos ou que tanto tememos. O único modo de viver é aceitar cada minuto como um milagre que não se repete, pois é exatamente isso que a vida é, um milagre que jamais se repetirá”.

Autor: Desconhecido

RESUMO

A produção de biodiesel a partir do óleo de microalgas tem sido evidenciada na literatura usando rotas que envolvem a extração do óleo seguida pela sua conversão para ésteres graxos. A extração do óleo é uma etapa importante do processo para a produção de biodiesel a partir da biomassa de microalgas. Este trabalho teve como objetivo estudar métodos de extração em microalgas da espécie *Chlorella pyrenoidosa* e *Chlorella powder* com solvente pressurizado em leito fixo e em banho de ultrassom. Foram avaliados os rendimentos das extrações em diferentes condições e analisadas as conversões dos extratos em biodiesel através da esterificação pelo método Hartman e Lago modificado. Também foram feitas caracterizações físico-químicas das matérias-primas usadas nas extrações (medições dos teores de umidade, voláteis e cinzas) e a caracterização dos ácidos graxos representados na forma de seus ésteres metílicos (cromatografia gasosa, espectrometria de massa, cromatografia de permeação em gel e espectrometria de infravermelho). Os métodos de extração utilizados envolveram o uso de um extrator de leito fixo e de um banho de ultrassom, na presença de etanol, n-hexano e metanol. Os rendimentos obtidos no presente trabalho foram comparados a resultados obtidos por pesquisadores do grupo CEPESQ/UFPR que utilizaram o método de Soxhlet para os respectivos solventes: etanol (7,5% m/m de rendimento), clorofórmio/metanol (2:1 v/v) (8,7% m/m) e n-hexano (3,2% m/m). Os melhores resultados de extração foram obtidos a partir do uso de ultrassom usando a biomassa *Chlorella pyrenoidosa* com etanol+água (4% v/v), onde o rendimento foi de 15,9 % m/m; seguido dos valores das extrações com etanol, com rendimentos de 15,5 % m/m. Para a biomassa *Chlorella powder* os melhores rendimentos de extração, 14,1% m/m, foram obtidos com etanol+água (10% v/v), seguido de um rendimento de 10,9% m/m para extração feita com etanol. A presença dos ácidos graxos C14:0, C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, e C20:0 foi confirmada pelas análises de cromatografia gasosa nos extratos a partir da microalga *Chlorella pyrenoidosa*, com variação de 19,27% a 49,02% nas conversões totais em ésteres das massas esterificadas.

Palavras-chave: Microalgas. Extração. Ésteres metílicos de ácidos graxos. Biodiesel.

ABSTRACT

Microalgae oil have been pointed out in literature as a promising renewable source to produce biodiesel. The oil extraction is a key step in the process of biodiesel production from microalgae biomass. In this sense, this work aims to study different extraction methods in microalgae of the species *Chlorella pyrenoidosa* and *Chlorella powder*, by using pressurized solvent in a fixed bed, and using an ultrasound bath. Ethanol, n-hexane, water and methanol were used as solvent and cosolvent. The extractions yields were evaluated at different conditions and Hartman and Lago modified method of esterification was used to assess the fatty acids conversion of the extracts to biodiesel. Furthermore, a physical-chemical characterization of the raw materials used in the extractions was performed (moisture measurements, volatiles and ashes content). Also, the fatty acids profile obtained from the different extractions, represented by their respective methyl esters production (using gas chromatography, mass spectrometry, gel permeation chromatography and infrared spectroscopy) was evaluated. The yields obtained in this work were compared to those obtained by researchers from CEPESQ/UFPR group, who used a Soxhlet method and the following solvents with respective yields: ethanol (yield of 7.5% m/m), chloroform/methanol (2:1 v/v) (8.7% m/m) and n-hexane (3.2% m/m). Higher extraction yields were obtained when the ultrasound bath was used for the extraction of oil from the biomass *Chlorella pyrenoidosa* with ethanol + water (4% v/v) as solvent, in which the yield was 15.9% (m/m); followed by the extractions with pure ethanol, whose yield was 15.5% (m/m). Concerning the biomass *Chlorella powder*, the better yields were observed for the same method, where a yield of 14.1% (m/m) using ethanol + water (10% v/v) was obtained, followed by a yield of 15.5% (m/m) for the extraction using ethanol. The presence of the fatty acids C14:0; C16:0; C18:0; C18:1; C18:2; C18:3 and C20:0 was confirmed by a gas chromatography analysis of the extracts obtained from the microalgae *Chlorella pyrenoidosa*, achieving a total conversion of the esterified material ranging between 19.27% and 49.02%.

Key-words: Microalgae; extraction; fatty acid ethyl esters; biodiesel.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	III
AGRADECIMENTOS	IV
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
1. MOTIVAÇÃO E RELEVÂNCIA	1
1.1 OBJETIVOS	4
1.2 Objetivo Geral	4
1.3 Objetivos Específicos	4
1.4 Escopo	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 MICROALGAS	5
2.1.1 <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	12
2.2 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO	14
2.3 PERFIL GRAXO DAS MICROALGAS	21
2.4 BIODIESEL DE MICROALGAS	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 MATERIAIS	27
3.1.1 Biomassa	27
3.1.2 Equipamentos, Reagentes e Padrões	27
3.2 MÉTODOS EXPERIMENTAIS	34
3.2.1 ENSAIOS PARA COMPOSIÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA e MATERIAL EXTRAÍDO	34
3.2.2 COMPOSIÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	35
3.2.2.1 Determinação do teor de umidade por balança de infravermelho	35
3.2.2.2 Determinação do teor de umidade e voláteis por secagem	35
3.2.2.3 Determinação do teor de cinzas	35
3.3 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO	36
3.3.1 Extrações em leito fixo	36
3.3.2 Extrações em banho de ultrassom	38
3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS	39
3.4.1 Identificação dos ácidos graxos	39
3.4.1.1 Método de esterificação	39
3.4.1.2 Determinação de mono-, di- e tri (acilgliceróis) por Derivatização	42
3.4.1.3 Determinação de mono-, di- e tri- (acilgliceróis) por GPC.	43

3.4.1.4	Teor de Cinzas do extrato	43
3.4.1.5	Determinação do teor de água por Karl Fischer	43
4.	RESULTADOS DE DISCUSSÕES	45
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA	45
4.2	PROCESSOS DE EXTRAÇÃO	46
4.2.1	Extrações com leito fixo	46
4.2.2	Extrações com ultrassom	48
4.2.3	Comparação entre os métodos de extrações.	52
4.3	CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO.....	53
4.3.1	Identificação dos ácidos graxos.....	54
4.3.2	Rendimentos em ésteres	61
6.	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
	ANEXOS	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Fotobiorreator utilizado para cultivo de microalgas. Fonte: (site OILGAE, 2013).	9
Figura 2.2 - Sistema de cultivo de microalgas em sistemas abertos. Fonte: (site OILGAE, 2013).....	10
Figura 2.3- Fotografia microscópica da <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	13
Figura 2.4 - Fotografia <i>Chlorella pyrenoidosa</i> em pó.	13
Figura 2.5 - Transesterificação do triacilgliceróis na presença de metanol e hidróxido de sódio	25
Figura 2.6 - Esterificação de ácidos graxos catalisadas por ácido sulfúrico	26
Figura 3.1 - Módulo Experimental. Desenho cedido por: Eng. Marcus Vinícius Brandalize (2013).	28
Figura 3.2 - Sistema de recirculação. Desenho cedido por: Eng. Marcus Vinícius Brandalize (2013)	29
Figura 3.3 – Fotografia do banho de ultrassom usado neste trabalho.	30
Figura 3.4 - Esquema usado para extração com ultrassom	38
Figura 3.5 – Fluxograma das etapas do método de esterificação aplicado nas amostras dos extratos de microalgas.	40
Figura 4.1- Curvas cinéticas experimentais do processo de extração do óleo de microalga com diferentes condições de extração utilizando o etanol como solvente, com tempo de retirada das alíquotas de 5 em 5 minutos.....	47
Figura 4.2- Curvas cinéticas experimentais do processo de extração do óleo de microalga com diferentes condições de extração utilizando o etanol como solvente, com tempo de retirada das alíquotas de 15 em 15 minutos.....	47
Figura 4.3- Curvas cinéticas experimentais do processo de extração do óleo de microalga com diferentes condições de extração utilizando o etanol como solvente, com tempo de retirada das alíquotas de 15 em 15 minutos.....	48
Figura 4.4 - Cinética e comparação entre os valores obtidos para o rendimento em massa do processo de extração em banho de ultrassom	50
Figura 4.5 - Cinética e comparação entre os valores obtidos para os rendimentos obtidos em etanol e etanol+água 10% (v:v).....	51
Figura 4.6 - A: alíquotas retiradas durante o processo de extração em leito fixo; B: amostra após a separação da biomassa residual do método em banho de ultrassom.	54
Figura 4.7 – Extrato da microalga após a secagem dos solventes.	54
Figura 4.8 - Espectrograma dos ésteres metílicos obtidos da <i>Chlorella pyrenoidosa</i> pela esterificação <i>in situ</i> através do método de Hartman e Lago (modificado).....	55
Figura 4.9 – Cromatograma dos ácidos graxos representados na forma de seus ésteres metílicos.	58
Figura 4.10 – Representação dos percentuais dos teores ácidos graxos, presente nos extratos da microalga <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Teor de lipídeos e produtividades de diferentes espécies de microalgas.	6
Tabela 2.2- Efeito das diferentes culturas no perfil graxo das microalgas.	8
Tabela 2.3 - Comparação da produtividade de óleo entre microalgas e oleaginosas convencionais.....	11
Tabela 2.4- Composição da fração lipídica das microalgas de acordo com o solvente extrator.	18
Tabela 2.5 - Métodos mais utilizados e sua eficácia na extração de lipídeos e produtos lipídicos.....	19
Tabela 2.6 - Vantagens e limitações dos métodos de extrações mais utilizados para recuperação do óleo a partir de microalgas.	20
Tabela 2.7 - Ácidos graxos da <i>Chlorella pyrenoidosa</i> sob diferentes formas de cultivo, expresso em % de massa.....	22
Tabela 3.1- Matriz dos ensaios para caracterização da matéria-prima e extratos.	34
Tabela 3.2 – Condições experimentais das extrações em leito fixo.....	37
Tabela 4.1- Aspectos físico-químicos da biomassa <i>in natura</i> utilizada nas extrações.	45
Tabela 4.2 - Condições das extrações em leito fixo do óleo da microalga <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	46
Tabela 4.3 - Condições das extrações em banho de ultrassom do óleo da microalga <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	49
Tabela 4.4 - Condições das extrações em banho de ultrassom do óleo da microalga <i>Chlorella powder</i>	51
Tabela 4.5 - Aspectos dos extratos provenientes da microalga <i>Chlorella pyrenoidosa</i> com seus respectivos desvios padrões.	53
Tabela 4.6 – Representação dos componentes químicos da <i>Chlorella pyrenoidosa</i> , esterificação <i>in situ</i> , analisados no CG/MS.	56
Tabela 4.7 – Constituintes de ácidos graxos da microalga <i>Chlorella pyrenoidosa in situ</i> identificados na espectrometria de massas com seus respectivos percentuais.....	57
Tabela 4.8 – Porcentagem em massa seca de ácidos graxos encontrados nas amostras analisadas.	59
Tabela 4.9– Tabela do perfil químico dos ácidos graxos da <i>Chlorella pyrenoidosa</i> , presentes na literatura.....	61
Tabela 4.10 - Percentual em ésteres dos extratos provenientes da microalga <i>Chlorella pyrenoidosa</i> em diferentes métodos de extração.	62

LISTA DE ABREVIATURAS

AM - Agitação Magnética

AOCS - American Oil Chemists' Society

CEPESQ - Centro de Pesquisa em Química Aplicada

CG - Cromatografia Gasosa

CG/MS - Cromatografia Gasosa com espectrometria de massa

FAME – Fatty acid methyl ester

GPC – Cromatografia permeação em gel

ha – hectare

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

LACTA - Laboratório de Cinética e Termodinâmica Aplicada

LF – Leito fixo

PUFAs - Polyunsaturated Fatty Acids

SOX - Soxhlet

US – Ultrassom

CAPÍTULO 1 – MOTIVAÇÃO E RELEVÂNCIA

1. MOTIVAÇÃO E RELEVÂNCIA

Nos últimos anos, o interesse nos lipídeos de microorganismos como microalgas, alguns fungos e bactérias tem aumentado, devido à essencial importância destes nas diversas cadeias tróficas e na possibilidade da aplicação comercial em distintas áreas como nutrição, saúde humana e animal, tratamento de águas residuais, produção de energia e obtenção de compostos de interesse das indústrias alimentícia, química e farmacêutica (RICHMOND, 2004).

Com a crescente atenção mundial para as tecnologias limpas, desenvolvimento sustentável e preocupação ambiental, as microalgas estão alcançando um patamar elevado como alternativa para obtenção limpa de energia (DABDOUB *et al.*, 2009). Essa energia proveniente de biomassa é apontada como uma grande opção na procura por novas fontes de bioenergia. Dentre elas, destaca-se o biodiesel por ser renovável, biodegradável, não tóxico, livre de enxofre e aromáticos e com propriedades físico-químicas semelhantes ao diesel de petróleo (DEMIRBAS, 2008; FERREIRA, 2010).

Segundo Richmond (2004), as microalgas tem demonstrado serem uma solução promissora, considerando a maior taxa de sequestro CO₂ quando comparado com plantas superiores (fonte de carbono utilizada na biossíntese de lipídeos), e, ainda não necessitam de terras aráveis, sendo o espaço para o cultivo das microalgas destinado apenas como suporte. MENG *et al.* (2009), afirmam que por utilizarem CO₂ como nutriente as microalgas contribuem benéficamente para o meio ambiente. Elas também são os organismos fotossintetizantes mais eficazes no processo de conversão da energia luminosa em energia química.

Reunindo todas essas vantagens é perceptível que com relação às oleaginosas convencionais, muitas destas características citadas acima favorecem a utilização destes microorganismos como matéria-prima na produção de biocombustíveis (TEIXEIRA e MORALES, 2011).

Um dos grandes destaques da atualidade na área de interesse pelo uso de recursos naturais baseados em materiais com fontes produtoras de lipídeos é o

biodiesel. O biodiesel é o nome dado à mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos, desde que atendam os certos parâmetros de qualidade estabelecidos pelas normas (BIODIESEL STANDART, 2012). Além de esses ésteres serem derivados de fontes biológicas como plantas e animais, atuam como combustível a fim de amenizar o uso do diesel de petróleo, com desempenho muito próximo, não exigindo modificações nos motores (BOROWIZTKA *et al.*, 1998). De uma forma geral o biodiesel pode ser produzido por diferentes métodos e utilizando várias matérias-primas como óleos vegetais, gorduras animais, resíduos de óleos e gorduras, além dos microorganismos de microalgas conforme já mencionado (CHISTI, 2007).

Tradicionalmente o biodiesel é produzido através das reações de transesterificação de triacilgliceróis, usando geralmente catalisadores alcalinos ou da esterificação de ácidos graxos livres, sendo que neste último caso, os ácidos graxos livres (AGLs) são submetidos à reação direta com um álcool de 4 carbonos ou menos, na presença de catalisadores ácidos (DABDOUB *et al.*, 2009).

Esses óleos vegetais podem ser extraídos de oleaginosas como soja (MARCHETTI, 2007; FERRARI, 2005), girassol (MARTÍN, 2007), arroz (LIN, 2009) e outras. As gorduras animais podem obtidas de aves, suínos e bovinos, enquanto que resíduos de óleos e gorduras são obtidos de abatedouros, restaurantes e também de estações de tratamento de esgotos.

A extração de óleo de microalgas é na maioria das vezes derivados de técnicas de extração de óleo de vegetais convencional onde provoca a ruptura da parede celular, onde os métodos empregados são: ultrassom, choque osmótico, solventes orgânicos, extração com fluidos supercríticos, etc. (CHISTI, 2008).

Os métodos de ultrassom e leito fixo com solvente pressurizado foram escolhidos para a extração do óleo de microalgas deste trabalho.

A escolha da técnica em que se utiliza o ultrassom para extração de óleo de biomassa de microalgas deve-se as seguintes vantagens: simplicidade do equipamento, na economia do custo inicial, na possibilidade de usar diferentes solventes para a extração (quando necessário), bem como diminuir o tempo necessário para realizá-las, além de apresentar uma boa reprodutibilidade (THOE, 1998). Todavia, a extração com ultrassom depende da intensidade da cavitação, tempo de extração e temperatura, sendo necessário otimizar estes parâmetros para a utilização desta técnica. Diante disso, e da falta de dados literários com ênfase em rendimento de extrato ao longo do tempo, definiu-se que esse trabalho

desenvolveria um estudo cinético da relação da massa extraída pela massa de matéria-prima usada nos ensaios.

O método de extração em que envolve um leito fixo com solvente pressurizado, embora tenha trabalhos com extração de óleos vegetais na utilização dessa técnica, não há registros, até o presente momento, deste método para a extração do óleo de microalgas. O método utiliza temperatura e pressão para a extração. A temperatura pode ser utilizada acima do ponto de ebulição do solvente, porém a pressão dentro do extrator deve ser suficientemente elevada para manter o solvente no estado líquido (MOZAJSKA *et al.*, 2001). O principal objetivo desse estudo, é analisar as variáveis aplicadas ao processo de extração em leito fixo com solvente pressurizado, podem influenciar no rendimento do óleo.

Neste contexto, o presente trabalho tem como foco a obtenção de informações experimentais de diferentes métodos de extração, em leito fixo com solvente pressurizado e em banho de ultrassom, e a posterior caracterização dos extratos em termos de rendimento em ésteres e caracterização da mistura de ésteres obtidos.

1.1 OBJETIVOS

1.2 Objetivo Geral

- Estudar a viabilidade técnica da extração de óleo de microalgas usando solvente orgânico em coluna de leito fixo e um banho de ultrassom.

1.3 Objetivos Específicos

- Obtenção das curvas cinéticas de extração em leito fixo e em banho de ultrassom;
- Avaliar as variáveis do processo: temperatura, pressão, vazão, tempo de confinamento, tempo de extração e quantidade de solvente por carga de matéria-prima;
- Avaliar os rendimentos em ácidos graxos esterificáveis;
- Comparar os rendimentos da extração usando solventes orgânicos via Soxhlet;
- Análisar a composição química do óleo obtido para conversão em biodiesel pelo método de cromatografia gasosa.

1.4 Escopo

No Capítulo 2 é apresentada uma revisão bibliográfica sobre microalgas, suas formas de cultivo e métodos de extração do óleo. Na sequência disserta-se o perfil graxo das microalgas e maneiras de obtenção de biodiesel partindo da biomassa de microalgas.

O Capítulo 3 inicia-se com a apresentação dos materiais, equipamentos e reagentes utilizados na extração do óleo de microalgas. Em seguida apresentam-se uma descrição detalhada dos processos de extração, dos métodos utilizados para caracterização da matéria-prima e do material extraído, e da conversão dos ácidos graxos para seus respectivos ésteres metílicos.

No Capítulo 4 são apresentados os resultados obtidos neste trabalho bem como a comparação destes dos dois métodos de extração empregados, e também a composição do extrato.

No Capítulo 5 são apresentadas as conclusões e algumas sugestões de trabalhos futuros.

CAPÍTULO 2 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo é apresentada uma revisão literária em relação a conceito de microalgas, formas de cultivos, métodos de extração do óleo, perfil graxo e biodiesel de microalgas.

2.1 MICROALGAS

O termo "microalgas" é utilizado para dar nome a diversos grupos diferentes de organismos vivos. Elas variam desde os pequenos organismos unicelulares até os multicelulares. As microalgas também incluem os organismos com estrutura celular procariótica e eucariótica, que, mesmo sendo estruturalmente e morfológicamente diferentes entre si, são fisiologicamente parecidas e possuem um metabolismo semelhante ao dos vegetais superiores (RICHMOND, 2004).

As microalgas são encontradas nos mais diversos habitats, como em rios e lagos de água doce, no meio marinho e até em terra firme. No entanto, seu crescimento depende de um conjunto de fatores químicos, físicos e biológicos, uma vez que os fatores biológicos estão relacionados às taxas metabólicas da espécie em questão. Estima-se que mais de 50.000 espécies existam, mas somente um número de aproximadamente 30.000 já foram estudadas e analisadas (RICHMOND, 2004). As microalgas são classificadas em grandes grupos como: algas verdes (*Chlorophyceae*), algas verde-amarelas (*Xanthophyceae*), algas vermelhas (*Rhodophyceae*), algas marrons (*Phaeophyceae*), cianobactérias (*Cyanophyceae*), dinoflagelatos (*Dinophyceae*) e pico-plâncton (*Prasinophyceae* e *Eustigmatophyceae*) (VAN DEN HOEK *et al.*, 1995).

A capacidade intrínseca de produzir óleo em grandes quantidades é específica de espécies individuais e de algumas linhagens (HU *et al.*, 2006). Na Tabela 2.1 é apresentada a capacidade de produção de lipídios de algumas espécies de microalgas.

Tabela 2.1 - Teor de lipídeos e produtividades de diferentes espécies de microalgas.

Espécies de Microalga	Teor de lipídeos - Peso seco da biomassa %	Produtividade do teor lipídico (mg/L/dia)	Volume de biomassa produzida (g/L/dia)	Área destinada à produção (g/m ² /dia)
<i>Ankistrodesmus sp.</i>	24,0–31,0	-	-	11,5–17,4
<i>Botryococcus braunii</i>	25,0–75,0	-	0,02	3,0
<i>Chaetoceros muelleri</i>	33,6	21,8	0,07	-
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	14,6–16,4/39,8	17,6	0,04	-
<i>Chlorella emersonii</i>	25,0–63,0	10,3–50,0	0,036–0,041	0,91–0,97
<i>Chlorella protothecoides</i>	14,6–57,8	1214	2,00–7,70	-
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19,0–22,0	44,7	0,23–1,47	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	5,0–58,0	11,2–40,0	0,02–0,20	0,57–0,95
<i>Chlorella sp.</i>	10,0–48,0	42,1	0,02–2,5	1,61–16,47/25
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2,0	-	2,90–3,64	72,5/130
<i>Chlorella</i>	18,0–57,0	18,7	-	3,50–13,90
<i>Chlorococcum sp.</i>	19,3	53,7	0,28	-
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20,0–51,1	-	10	-
<i>Dunaliella salina</i>	6,0–25,0	116,0	0,22–0,34	1,6–3,5/20–38
<i>Dunaliella primolecta</i>	23,1	-	0,09	14
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16,7–71,0	-	0,12	-
<i>Dunaliella sp.</i>	17,5–67,0	33,5	-	-
<i>Ellipsoidion sp.</i>	27,4	47,3	0,17	-
<i>Euglena gracilis</i>	14,0–20,0	-	7,70	-
<i>Haematococcus pluvialis</i>	25,0	-	0,05–0,06	10,2–36,4
<i>Isochrysis galbana</i>	7,0–40,0	-	0,32–1,60	-
<i>Isochrysis sp.</i>	7,1–33	37,8	0,08–0,17	-
<i>Monodus subterraneus</i>	16,0	30,4	0,19	-
<i>Monallanthus salina</i>	20,0–22,0	-	0,08	12
<i>Nannochloris sp.</i>	20,0–56,0	60,9–76,5	0,17–0,51	-
<i>Nannochloropsis oculata.</i>	22,7–29,7	84,0–142,0	0,37–0,48	-
<i>Nannochloropsis sp.</i>	12,0–53,0	37,6–90,0	0,17–1,43	1,9–5,3
<i>Neochloris oleabundans</i>	29,0–65,0	90,0–134,0	-	-
<i>Pavlova salina</i>	30,9	49,4	0,16	-
<i>Pavlova lutheri</i>	35,5	40,2	0,14	-
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18,0–57,0	44,8	0,003–1,9	2,4–21
<i>Porphyridium cruentum</i>	9,0–18,8/60,7	34,8	0,36–1,50	25
<i>Scenedesmus obliquus</i>	11,0–55,0	-	0,004–0,74	-
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1,9–18,4	35,1	0,19	-
<i>Scenedesmus sp.</i>	19,6–21,1	40,8–53,9	0,03–0,26	2,43–13,52
<i>Skeletonema sp.</i>	13,3–31,8	27,3	0,09	-
<i>Skeletonema costatum</i>	13,5–51,3	17,4	0,08	-
<i>Spirulina platensis</i>	4,0–16,6	-	0,06–4,3	1,5–14,5/24–51
<i>Spirulina máxima</i>	4,0–9,0	-	0,21–0,25	25
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	20,6	17,4	0,08	-
<i>Tetraselmis suecica</i>	8,5–23,0	27,0–36,4	0,12–0,32	19
<i>Tetraselmis sp.</i>	12,6–14,7	43,4	0,30	-
<i>Oocystis pusilla</i>	10,5	-	-	40,6–45,8

FONTE: (MATA *et al.*, 2010)

De uma maneira geral, algas verdes oleaginosas apresentam em média 27% do peso da célula seca em óleo, percentual que pode duplicar ou triplicar quando são cultivadas sob condições de estresse (foto-oxidativo ou falta de nutrientes

específicos). Já no caso de cianobactérias, apesar de serem capazes de produzir lipídeos, estes não são acumulados em quantidades consideráveis (BASOVA, 2005; COBELAS e LECHADO, 1989).

Para o desenvolvimento do cultivo maciço de microalgas, é necessário isolar e caracterizar as espécies, aprimorando as ferramentas genéticas em busca de características específicas tais como, o aumento da produtividade de lipídeos por quantidade de cultivo. No cultivo, alguns fatores podem influenciar na produção desses lipídeos como: pH, nutrientes, intensidade de luz e temperatura. Estas condições ambientais podem ser controladas e as espécies selecionadas de acordo com os ácidos graxos desejados (CERTIK e SHIMIZU, 1999).

Em contraste com outras plantas superiores, a variação da composição química em ácidos graxos nas microalgas é muito grande, dentro e entre os grupos taxonômicos. A escolha certa da matéria-prima na produção do biodiesel dependerá, em primeira instância, da composição química do óleo extraível (COBELAS e LECHADO, 1989). Neste sentido, a produção de ácido graxo, tanto podem ser os poliinsaturados de cadeia longa (PUFAs), tais como C20:4; C20:5; C22:5; C22:6, quanto os ácidos graxos de 16 e 18 carbonos com cadeias saturadas ou com diferentes padrões de monoinsaturação, C16:0; C16:1; C18:1 (COBELAS e LECHADO, 1989; BASOVA, 2005; OHLROGGE, 1995; BOROWITZKA *et al.*, 1998).

Os triacilgliceróis produzidos por essas microalgas podem, ainda ter a sua composição química modificada em teores de ácidos graxos, de acordo com as condições de crescimento fototrópicas (intensidade de luz, temperatura) e/ou heterotrópicas (suplementação ou restrição de determinadas substâncias químicas que influenciam o metabolismo) (COBELAS e LECHADO, 1989; XU *et al.*, 2006). O cultivo de microalgas com dióxido de carbono e bicarbonato de sódio é um exemplo disso, porque estes organismos têm a habilidade de alterar seu metabolismo de acordo com as mudanças na composição química do meio de cultura (BEHRENS, 1996). Por exemplo, o conteúdo lipídico da *Chlorella protothecoides* pode ser aumentando em 15% depois da adição de glucose em meio sob limitação de nutrientes como nitratos resultando na produção e acúmulo de 55,2% de lipídeos de composição química considerada excelente para ser usado como matéria-prima na produção de biodiesel (XU *et al.*, 2006). Os principais componentes do óleo formado foram os ácidos oleico (C18:1) 60,8% e o linoleico (C18:2) 17,3%. Este óleo foi adequado à produção de um biodiesel de alta qualidade (DABDOUB *et al.*, 2009). A

temperatura ótima para o crescimento das microalgas é em torno de 20-35 °C e os nutrientes essenciais para o seu crescimento incluem nitrogênio, fósforo, ferro, enxofre e em menor quantidade, magnésio, cálcio e sílica. Água do mar complementada com nitratos, fertilizantes fosfatados e alguns outros micronutrientes comerciais, são comumente usados (BREITMAN e HSU, 2010). Na Tabela 2.2 é possível observar a influência de alguns parâmetros como, por exemplo, aumento e diminuição da concentração de nitrogênio e outros fatores que favorecem um aumento ou diminuição do teor lipídico.

Tabela 2.2- Efeito das diferentes culturas no perfil graxo das microalgas.

Tipo de cultura	Efeito do perfil graxo
Baixa concentração de N	Aumenta o conteúdo lipídico
Alta concentração de N	Diminui a quantidade de C ₂₂
Aumento na intensidade luminosa	Aumenta a quantidade de ácidos graxos
Baixa temperatura	Aumenta a quantidade de ácidos graxos insaturados
Mn ⁺²	Aumenta o conteúdo lipídico
Alta concentração de CO ₂	Aumenta a quantidade de ácidos graxos insaturados
Baixa concentração de P	Aumenta o conteúdo lipídico

FONTE: BEHRENS E KYLE, (1996).

Segundo Richmond (2004), existem desenvolvimentos tecnológicos para cultivo altamente eficiente para produção da biomassa em larga escala, esse desenvolvimento é conhecido como sistemas abertos como tanques e lagoas (conhecidos como *raceways*) ou em sistemas fechados conhecidos como fotobiorreatores.

O fotobiorreator Figura 2.1 têm características fototróficas (cultivo microbianos, microalgas ou células de plantas) em que a conversão biológica é alcançada. Esses sistemas são flexíveis e podem ser otimizados de acordo com as características fisiológicas das microalgas permitindo ainda o cultivo de espécies não cultiváveis em sistemas abertos. Dependendo de sua forma ou projeto, os FBRs podem trazer várias vantagens: não permite um contato direto com o ar, onde pode ocorrer a contaminação de microorganismo e poeira, oferecem melhor controle sobre condições de cultura e parâmetros de crescimento como, pH, temperatura, agitação, CO₂ e O₂, menor evaporação de água, reduz as perdas de CO₂,

possibilidade de cultivos com concentração celular e produtividade maiores, evita a incidência direta da luz no cultivo amenizando a intensidade dos raios devido a eles primeiro terem que atravessar as paredes transparentes do reator, e os cultivos em massa podem ser feitos em qualquer lugar por não utilizar o solo como habitat de sustentação (CHISTI, 2007).

O fotobiorreator também apresentam desvantagens como: super aquecimento, bioincrustação, acúmulo de oxigênio, maiores custos de construção e operação, e rompimento celular por cisalhamento (CHISTI, 2007).



Figura 2.1 - Fotobiorreator utilizado para cultivo de microalgas. Fonte: (site OILGAE, 2013).

Sistemas abertos consistem em canais feitos no solo com aproximadamente 0,3 m de profundidade, podendo ser construído em concreto ou chão batido, revestido por uma lona de polietileno de baixa densidade (PEBD). Esse sistema pode também alcançar uma conversão biológica satisfatória, os custos são menores com relação ao fotobiorreator, e também com uma capacidade de produção maior quando comparado com sistemas fechados (BARBOZA e SERRA, 1992).

No entanto os sistemas abertos como raceways como apresentado na Figura 2.2 podem usar mais energia para homogeneizar os nutrientes. Para tanto uma grande atenção deve ser dada na evaporação da água fazendo sempre o controle do nível da água. Geralmente, esses sistemas são mais suscetíveis a condições meteorológicas, não permitindo o controle da temperatura da água, evaporação e iluminação. Além disso, mesmo podendo produzir um volume maior de microalgas, esses sistemas ocupam uma área extensa de terra e se expõe facilmente a contaminações de bactérias ou microorganismos (RICHMOND, 2004).

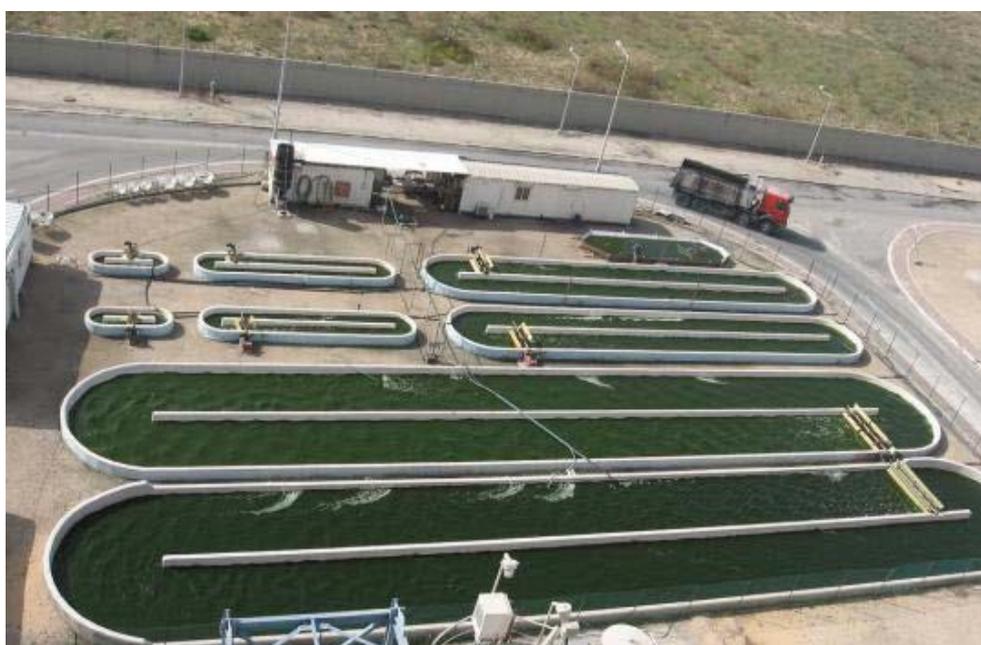


Figura 2.2 - Sistema de cultivo de microalgas em sistemas abertos. Fonte: (site OILGAE, 2013).

Conforme já foi visto na Tabela 2.2 alguns fatores que podem influenciar no crescimento das microalgas, é comum encontrar as mesmas em lugares ou regiões que apresentam um clima úmido ou tropical do que em regiões com clima mais seco. Todos esses aspectos estão diretamente relacionados ao acesso das microalgas à iluminação, temperatura adequada, salinidade e também à disponibilidade aos nutrientes necessários. Embora o rendimento de óleo das microalgas também seja dependente de vários fatores, esta quantidade ainda é muito superior às encontradas para as oleaginosas convencionais. Na Tabela 2.3 são apresentados dados que comparam a quantidade de óleo sobre o peso seco e o rendimento de óleo por hectare por ano bem como a produtividade de biodiesel por área de cultivo.

Tabela 2.3 - Comparação da produtividade de óleo entre microalgas e oleaginosas convencionais.

Oleaginosa	Óleo %	Rend. de óleo (L óleo/ha ano)	Área necessária (m ² ano/kg biodiesel)	Produtividade de biodiesel (kg biodiesel/ha ano)
Milho (<i>Zea mays</i> L.)	44	172	66	152
Maconha (<i>Cannabis sativa</i> L.)	33	363	31	321
Soja (<i>Glycine max</i> L.)	18	636	18	562
Jatropha (<i>Jatropha curcas</i> L.)	28	741	15	656
Camelina (<i>Camelina sativa</i> L.)	42	915	12	809
Canola (<i>Brassica napus</i> L.)	41	974	12	862
Girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.)	40	1307	11	946
Mamona (<i>Ricinus communis</i>)	48	1070	9	1156
Palma (<i>Elaeis guineensis</i>)	36	5366	2	4747
Microalga (baixo teor de óleo)	30	58.700	0.2	51.927
Microalga (médio teor de óleo)	50	97.800	0.1	86.515
Microalga (alto teor de óleo)	70	136.900	0.1	121.104

FONTE: (MATA *et al.*, 2010; COHEN, 1986; CHISTI, 2007).

Cohen *et al.* (1986) afirmou que a produção de microalgas pode ser justificada por apresentar diversas vantagens:

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

- O CO₂ emitido na queima desse biocombustível é reabsorvido pelos vegetais e microalgas.
- As microalgas podem ser utilizadas para o tratamento de efluentes contaminados com NH₄⁺, NO₃⁻, PO₄⁻, no qual utilizam esses nutrientes para o crescimento.
- Após a extração do óleo, a biomassa restante pode ser processada para a produção de bioetanol, utilizada como ração animal e fertilizante, pois é fonte de nitrogênio e fósforo ou simplesmente queimada para gerar energia.
- Dependendo da espécie da microalga, outros compostos podem ser extraídos para diferentes aplicações industriais, da química fina, como PUFA's, pigmentos, açúcares e antioxidantes.

A grande dificuldade na obtenção de biodiesel proveniente de microalgas está por conta da separação da biomassa e a extração eficiente do óleo produzido, assim estudos tem dado ênfase em encontrar formas economicamente e energeticamente viáveis.

2.1.1 *Chlorella pyrenoidosa*

Chlorella pyrenoidosa são algas unicelulares de água doce que pertencem à categoria de células eucarióticas presentes no planeta a milhões de anos. Seu tamanho é aproximadamente o mesmo de um eritrócito humano, entre 2-8 microns de diâmetro. O nome *Chlorella* deriva do prefixo "Chloros" (verde) e sufixo "Ella" (pequeno) como mostrado na Figura 2.3. A *Chlorella* contém um extraordinário conteúdo de clorofila que dá a característica cor de esmeralda-verde como representado na Figura 2.4. A espécie *Chlorella pyrenoidosa* também nomeada no oriente como "o rei das Chlorellas" pelas potencialidades peculiares em sua composição nutricional. Existem várias espécies de *Chlorellas* vendidas no mercado, mas a *Chlorella pyrenoidosa* é a única espécie que contém o fator de crescimento que promove o crescimento de célula e mantém saúde de organismo. São compostos em média de 65% proteína, 13% carboidrato, 9% gordura e 6% minerais biodisponíveis (DHYANA e BEVERLY, 1984).

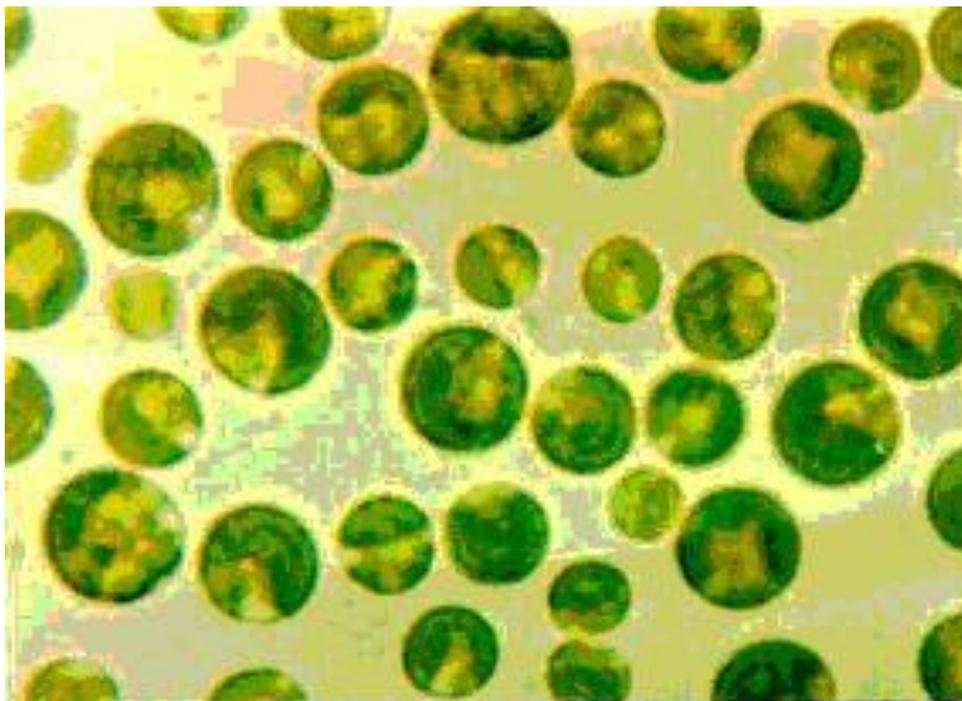


Figura 2.3- Fotografia microscópica da Chlorella pyrenoidosa. Fonte: (site THEHERBPROF, 2013)



Figura 2.4 - Fotografia Chlorella pyrenoidosa em pó.

O gênero *Chlorella* contém diversas espécies que produzem diferentes quantidades de lipídeos. Por exemplo, a *Chlorella vulgaris* apresenta 14-22% e a *Chlorella ellipsoidea*, 4,49%. De acordo com a literatura, a *Chlorella pyrenoidosa* apresenta de 2 % a 11,93 % de lipídeos (BECKER, 1994; LEVEILLE *et al.*, 1964) Variando as condições de cultivo, pode render de 18,9 % (com limitação de N) a

22,2 % de lipídeos (sob condições otimizadas) e ainda para esta mesmas condições de cultivo, foram obtidos 25,2 % e 38,0 %, respectivamente, para uma cepa mutante desta espécie (RAMAZANOV E RAMAZANOV, 2006).

2.2 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO.

A extração de óleos vegetais é uma técnica bastante antiga, que teve início com o linho e o algodão no antigo Egito (10.000 a.C). Com o passar dos anos, técnicas para extração foram desenvolvidas e em 1877 foi utilizada a primeira prensa hidráulica, resultando num melhor rendimento de óleo. Na ocasião, atingiu-se a extração de 90 a 95% de todo o óleo presente no vegetal. Foi somente em meados do século XIX que se efetuou a primeira extração com solvente (MANSANO, 2011).

No caso da extração de óleo de microalgas, para a extração da substância de interesse, é necessário primeiramente separar a biomassa do meio de cultura. O processo de separação envolve normalmente a floculação, centrifugação e filtração. Na sequencia, a biomassa obtida é desidratada e vários métodos podem ser aplicados, como *spray-drying*, *drum-drying* e *sun-drying* (MOLINA, 2004).

O método para extração do óleo deve ser rápido, termolábil, a fim de reduzir a degradação dos lipídeos e triacilgliceróis (MOLINA *et al.*, 1999). Há uma quantidade considerável de referências disponível na literatura sobre o tema, abordando desde os seus usos até seus potenciais. É apresentado na revisão bibliográfica os métodos de extrações mais relevantes relatados na última década. Um dos principais obstáculos no processo de extração é a capacidade em extrair o óleo da biomassa celular aproveitando todo o teor lipídico existente nas microalgas (MECER e ARMENTA, 2011). Alguns dos procedimentos mais utilizados são: prensagem mecânica, homogeneização, extração com solvente, extração com fluido supercrítico, extrações enzimática, extração por ultrassom e choque osmótico (CHISTI, 2008).

A técnica de extração por prensagem mecânica e homogeneização essencialmente envolvem o uso de pressões para romper as paredes celulares, a fim de recuperar o seu óleo. A extração mecânica, por exemplo, minimiza a contaminação da biomassa de microalgas a partir de fontes externas, enquanto mantém a integridade química da substância originalmente contida dentro das

células (GREENWELL *et al.*, 2010). A biomassa de microalgas é submetida à alta pressão, necessária para o rompimento da parede celular e consequente liberação do óleo intracelular. O desempenho do processo depende do grau de células desintegradas, dentre as variáveis mais importantes estão, a eficiência do contato entre a biomassa e os grânulos, o tamanho e a compacidade dos grânulos e da resistência das paredes celulares das microalgas dentre outros (DOUCHA e LIVANSKÝ, 2008). A operação mecânica é geralmente utilizada em combinação com solventes, o que pode facilitar o processo de separação do óleo extraído da biomassa. Normalmente, este tipo de rompimento celular se torna mais eficiente quando a concentração de biomassa está em torno de 100 a 200 gL⁻¹ (GREENWELL *et al.*, 2010).

A extração com fluido supercrítico ganhou aceitação nos últimos anos, tendo reconhecida a sua alta seletividade. Essa técnica necessita de um equipamento especial para o confinamento e a aplicação de fluidos supercríticos para extrair produtos de alto valor das microalgas, isso porque, o extrato é obtido altamente purificado e livre dos resíduos de solventes (MENDES *et al.*, 2003; MENDIOLA *et al.*, 2007; SAHENA *et al.*, 2009). A extração com fluidos supercríticos depende de quatro fatores fundamentais para sua eficiência de extração, sendo eles: pressão, temperatura, tempo de extração e a vazão do solvente. O fluido amplamente usado para a extração supercrítica é o dióxido de carbono. Seu uso é favorecido devido a sua temperatura crítica ser relativamente baixa (31,1 °C) e pressão (72,9 atm) (CONNEY *et al.*, 2009). A utilização bem sucedida dessa técnica deve-se ao fato desse fluido apresentar propriedades semelhantes as de solventes líquidos. O que implica num comportamento do mesmo como líquido e gás. Isso explica seu alto poder de solvatação (ANDRICH *et al.*, 2006; XU *et al.*, 2008; SAHENA *et al.*, 2009; HARUN *et al.*, 2010).

Em se tratando de extração com fluidos supercríticos e/ou gases pressurizados, outro fator interessante é o uso de um cossolvente, o mais comumente é o etanol. Quando o etanol é utilizado como cossolvente à polaridade do meio pode aumentar propiciando um aumento no rendimento e/ou seletividade da extração (MENDES *et al.*, 2005; HERRERO *et al.*, 2006; MENDES E REIS, 2006; MENDIOLA *et al.*, 2007).

A extração enzimática também pode ser usadas para facilitar o rompimento da parede celular, através da hidrólise para liberação do óleo. Devido a um aumento

no rendimento na obtenção de óleo, essa técnica fornece resultados promissores quando aplicada simultaneamente com processos puramente mecânicos (GOMES, 2012). A partir das observações feitas sobre o acúmulo de óleo nos espaços intracelulares em células vegetais, os pesquisadores têm estudado substâncias capazes de afetar a estrutura das células com objetivo de melhorar a extração de óleo, mas a aplicação de um tratamento enzimático requer uma estratégia específica para cada caso. Esse processo usa enzimas para degradar a parede celular da microalga, facilitando a extração do óleo. O processo possui maior custo quando comparado com a extração com n-hexano (FUA *et al.*, 2010).

Outra técnica que tem sido eficientemente aplicada é a utilização de um banho de ultrassom (sonicador) que melhora o processo de extração significadamente. A cavitação consiste na criação e implosão de micro-bolhas de gás na fase líquida. A variação de pressão cria em um ponto do líquido, momentos de compressão e descompressão (rarefação) alternados. A cavitação pode ser afetada por diversos parâmetros, tais como: frequência, intensidade de irradiação, tipo de solventes empregados e temperaturas aplicadas (BARBOZA e SERRA, 1992).

O ultrassom é um método promissor para as extrações de óleo das microalgas, por ser de baixo custo, com alta eficiência, redução no tempo de extração e aumento nos rendimentos. Um exemplo disto é mostrado por experimentos realizados usando a microalga da espécie *Cryptocodinium cohnii*, onde o ultrassom foi mais eficaz no rompimento das paredes celulares, com o aumento do rendimento do óleo de 25,9% comparado ao 4,8% do método de soxhlet com hexano (CRAVOTTO *et al.*, 2008; WEI *et al.*, 2008).

O método de choque osmótico é uma redução repentina na pressão osmótica, que pode causar a ruptura das paredes das células das microalgas em solução. O choque osmótico é usado para liberar componentes celulares, tais como o óleo. No entanto, para obtenção de melhores resultados na extração de óleo, faz-se necessário incluir uma etapa posterior com uso de solvente (MOHEIMANI, 2005).

FOLCH *et al.* (1957) desenvolveram um método utilizando clorofórmio/metanol (2:1 v/v), seguida pela adição de solução de cloreto de potássio, visando uma melhor separação das fases e reconheceram que estas características são intrínsecas para extração de lipídeos.

BLIGH e DYER (1959) geraram uma versão simplificada baseado no método de Folch *et al.* (1957) propondo uma rápida extração e purificação de lipídeos totais utilizando clorofórmio/metanol/água (2:1:0,8 v/v). A formação de um sistema bifásico a partir das proporções de solventes adicionados durante o processo de extração esta baseada na teoria do equilíbrio líquido-líquido desses três componentes (clorofórmio/metanol/água). A determinação das solubilidades de cada componente pode ser avaliada através de um diagrama ternário de solubilidade de dois líquidos parcialmente miscíveis entre si (clorofórmio e água) com um terceiro (metanol), completamente miscível nos outros dois.

Tanto o método de Folch *et al.* (1957) como o de Bligh e Dyer (1959) são métodos de extração a frio para que a qualidade da fração lipídica não seja afetada. Apesar de algumas desvantagens, como a toxidez dos solventes usados e a indesejável extração dos contaminantes não lipídicos da fase orgânica, os métodos de Folch e Bligh e Dyer são largamente utilizados, tanto como propostos originalmente, quanto MODIFICADOS (CHRISTIE, 1982; HANSON e OLLEY, 1963; NELSON, 1991; HOLE e TAYLOR, 1996; SMEDES e ASKLAND, 1999; UNDELAND *et al.*, 1998; IVERSON *et al.*, 2001).

No método de extração por solvente se extrai o óleo de microalgas por repetição de lavagem ou percolação com um solvente orgânico, podendo ser realizada isoladamente ou em conjunto com outros métodos, buscando, assim, um maior rendimento do óleo (PÉREZ, 2007). Em geral, são encontradas na literatura uma ampla variedade de solventes e métodos para a extração do óleo de microalgas. Além disso, um solvente adequado para extração deve ser insolúvel em água, preferencialmente solubilizar o composto de interesse, ter um baixo ponto de ebulição para facilitar sua remoção após a extração e uma densidade consideravelmente diferente da água. Também, para a rentabilidade do processo, ele deve ser acessível, com baixo custo e reutilizável (BANERJEE, 2002).

Uma extração eficiente requer que o solvente penetre totalmente a biomassa e entre em contato com a polaridade alvo. O etanol, por exemplo, é um bom solvente polar, e o mesmo foi escolhido para as extrações nesse trabalho pela sua principal característica de extração que é a de enfraquecer as ligações de hidrogênio onde se obtém lipídeos polares como fosfolipídeos e glicolipídeos, porém, acaba se extraíndo alguns contaminantes como açúcares, aminoácidos, sais, proteínas hidrofóbicas e pigmentos que não são desejáveis na composição dos lipídeos. Em

microalgas, a composição dos lipídeos pode sofrer alterações de acordo com a polaridade do solvente (Tabela 2.4) utilizado para sua extração (MOLINA, 1999).

Tabela 2.4- Composição da fração lipídica das microalgas de acordo com o solvente extrator.

Solventes	Componentes extraídos
Clorofórmio	Hidrocarbonetos, carotenoides, clorofila, esteróis, triacilgliceróis, ceras, aldeídos e ácidos graxos.
Acetona	Diacilgliceróis, cerebrosídeos e sulfolipídeos.
Metanol e etanol	Fosfolipídeos e glicolipídeos.
Hexano	Hidrocarbonetos, triacilgliceróis e ácidos graxos.

FONTE: (MOLINA, 1999).

Outro método muito mencionado na literatura para extração com solvente é a utilização do equipamento de Soxhlet, que apresenta algumas vantagens em relação aos outros métodos tais como: a amostra está sempre em contato com o solvente, havendo sua constante renovação; a temperatura do sistema mantém-se relativamente alta, visto que o calor aplicado para o processo de evaporação é constante. É uma metodologia muito simples que não requer treinamento especializado e que possibilita a extração de uma quantidade considerável de óleo em relação a outros métodos, sem a necessidade de filtração após o término da extração. O procedimento clássico é feito com refluxo de solvente por muitas horas é sem dúvida o um dos métodos mais utilizado para extração de óleos devido a sua grande eficiência apresentada perante as matrizes vegetais e animais (LUQUE e GARCÍA, 1998). Todos estes métodos têm as suas vantagens e desvantagens individuais. Na Tabela 2.5 são apresentados os métodos de extração e suas capacidades para extrair o óleo, mais especificamente, a ácidos graxos de maior valor.

Tabela 2.5 - Métodos mais utilizados e sua eficácia na extração de lipídeos e produtos lipídicos.

Microalga	Método de Extração	Óleo extraído% (m/m)	Ácidos graxos (óleo extraído %) (m/m)
<i>Porphyridium cruentum</i>	Saponificação/solvente	59,5	EPA – 79,5 ARA – 73,2
<i>Mortierella alpina</i>	Bligh and dyer (seco)	27,6	N/A
	Bligh and dyer (úmido)	41,1	Oleico – 49,3
<i>Arthrospira (spirulina) maxima</i>	SC-CO ₂	2,1	Palmítico – 15,3
	Bligh and dyer	5,5	GLA – 31,3
<i>Nannochloropsis sp.</i>	SC-CO ₂	25	EPA – 32,1 Palmítico – 17,8
<i>Arthrospira (spirulina) maxima</i>	SC-CO ₂	40	GLA – 13,0
<i>Spirulina (arthrospira) platensis</i>	SC-CO ₂	77,9	GLA – 20,2 Palmítico – 40,0
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Solvente	96,1	EPA – 23,7 Palmitoleico – 19,2
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	Ultrassom	25,9	DHA – 39,3 Palmítico – 37,9
	Soxhlet	4,8	DHA – 39,5 Palmítico – 38,0
<i>Chlorella vulgaris</i>	Bligh and dyer (úmido)	52,5	N/A
<i>Botryococcus braunii</i>	Solvente/transesterificação	12,1	Oleico – 56,3 Linolênico – 19,0
<i>Synechocystis sp.</i>		7,3	Palmítico – 59,2 Oleico – 16,7
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	Moagem úmida	25,3	
	Prensagem	21,2	
	Sonicador	21,0	
	Soxhlet	6,3	
<i>Chlorella protothecoides</i>	Prensagem	14,9	
	Moagem úmida	14,4	
	Sonicador	10,7	
	Soxhlet	5,6	
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	SC-CO ₂	8,6	DHA – 42,7 Palmítico – 25,3
	Bligh and dyer	19,9	DHA – 49,5 Palmítico – 22,9

SC-CO₂= Extração supercrítica com dióxido de carbono, UAE= Extração ultrassom assistido, EPA= ácido eicosapentaenóico C20:5 (ω-3), ARA= ácido araquidônico, C20:4 (ω-6), oleico= ácido oleico (C18:1), palmítico= ácido palmítico (C16:0), GLA= γ-ácido linoleico, C18:3 (ω-6), DHA= ácido docosahexaenóico C22:6 (ω-3), linoleico= ácido linoleico (C18:3).

FONTE: GUIL-GUERREIRO *et al.*, 2000; ZHU *et al.*, 2002; MENDES *et al.*, 2005; MENDES *et al.*, 2006; ANDRICH *et al.*, 2005; ANDRICH *et al.*, 2006; FARJADO *et al.*, 2007; WIDJAJA *et al.*, 2009; TRAN *et al.*, 2009; COUTO *et al.*, 2010; CRAVOTO *et al.*, 2008; SHEN *et al.*, 2009.

Na Tabela 2.6 são apresentadas as vantagens e desvantagens dos métodos mais encontrados na literatura.

Tabela 2.6 - Vantagens e limitações dos métodos de extrações mais utilizados para recuperação do óleo a partir de microalgas.

Métodos de extração	Vantagens	Limitações
Prensagem	Fácil de manipular, sem uso de solventes.	Processo lento e requer uma grande quantidade de matéria prima.
Extração com solvente	Os solventes utilizados são relativamente baratos, os resultados são reprodutíveis.	Maioria dos solventes orgânicos são altamente inflamáveis e/ou tóxicos, a recuperação desses solventes são caros, um volume grande de é necessário para extração.
Extração com fluido supercrítico	Não é tóxico, não deixa resíduo de solvente no extrato, é fluido não inflamável.	Processo caro, e com alto consumo de energia.
Ultrassom	Tempo de extração reduzido, quantidade de solvente reduzido, melhor ruptura da parede celular.	Consumo alto de energia e dificuldades em larga escala.

FONTE: POPOOLA E YANGOMODOU, 2006; HERRERO *et al.*, 2004; GALLOWAY *et al.*, 2004; MACÍAS *et al.*, 2005; PAWLISZYN, 1993; LUQUE e CASTRO, 2003; MARTIN, 1993.

Os métodos que se baseiam no rompimento da parede celular, que tem como objetivo, liberar o óleo que está localizado no interior das células para produção de biodiesel. Esse processo deve ser o mais eficiente tanto energeticamente como economicamente, já que dependendo da qualidade da ruptura celular, serão evitadas grandes quantidades de solventes e a extração será mais eficaz. Esse passo é particularmente importante porque o rendimento global de biodiesel vai depender tanto do método de ruptura quanto do equipamento empregado (AMARO *et al.*, 2011). O processo de extração do óleo representa a principal limitação para produção de produtos com baixo custo (combustíveis e alimentos) e aos co-produtos de valor mais elevado como (β -caroteno, polissacarídeos).

2.3 PERFIL GRAXO DAS MICROALGAS

A composição dos ácidos graxos nas microalgas varia de espécie para espécie, diferindo na composição do conteúdo de ácidos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados. É possível observar uma grande variação na composição dos ácidos graxos presentes no óleo das microalgas, sendo constituído essencialmente de ácidos graxos insaturados como o palmitoleico, oleico, linoleico e linolênico e de ácidos graxos saturados como o palmítico e o esteárico, também são encontrados em pequena quantidade (D'OCA *et al.*, 2011).

A quantidade de ácidos graxos saturados nas microalgas está, em geral, situada entre 13,6% - 58,9% da soma de todos os ácidos graxos. Entre os ácidos graxos saturados ocorre uma predominância de palmítico (C16:0), variando entre 2,9% - 63%, como por exemplo, na espécie *Spirulina*, que tem 25,8% - 63% desse ácido. O ácido mirístico (C14:0) predomina em certas espécies da classe *Prymnesiophytia* e *Bacillariophyta* contendo entre 2,0% – 3,7 %.

Em muitas espécies, a quantidade de ácido esteárico constitui entre 0,1 – 16,3 % e o ácido láurico (C12:0), entre 0,1–8,6%. Nas microalgas *Thalassionema nitzschioides* e *Thalassiothrix heteromorpha* o ácido láurico predomina com uma quantidade entre 23,3 - 28,9% enquanto que a quantidade de ácido palmítico está entre 6,6 - 29%. Ácidos graxos como C15:0 e C17:0 estão presentes em menores quantidades 1 - 2% o C24:0 é raramente observado (BASOVA, 2005).

As cadeias saturadas em contrapartida têm a vantagem de apresentar uma maior estabilidade à auto-oxidação fazendo com que parâmetros de estabilidade à oxidação, sejam atendidos mais facilmente do que no caso da presença majoritária de cadeias insaturadas ou poliinsaturadas. Além disso, ésteres monoalquílicos de ácidos graxos com cadeias acima de C20:0, assim como cadeias saturadas de C14:0 (palmítico) C16:0 (palmítico) e C18:0 (esteárico), têm uma tendência maior a se solidificarem a baixa temperatura do que as cadeias de até 18 carbonos com uma ou mais insaturações podendo, portanto, tornar o biodiesel impróprio para o uso em climas frios. Essa característica (tendência a solidificar-se) pode ser verificada através do ponto de névoa (PN), ou o ponto de entupimento do filtro a frio (PEFF) (DABDOUB *et al.*, 2009).

De acordo Petkov e Garcia (2007), a composição dos ácidos graxos de *Chlorella pyrenoidosa* (Tabela 2.7) podem sofrer variações a partir de diferentes modos de cultivo: fototrófico, fototrófico sem adição de nitrogênio e heterotrófico.

Tabela 2.7 - Ácidos graxos da *Chlorella pyrenoidosa* sob diferentes formas de cultivo, expresso em % de massa.

Ácidos graxos	Fototrófico	Fototrófico sem adição de N	Heterotrófico
C14:0	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,2	1 ± 0,5
C16:0	22 ± 4	25 ± 2	22 ± 6
C16:1	2 ± 0,5	2,1 ± 0,5	5 ± 2
C16:1*	1 ± 0,5	0,4 ± 0,2	2 ± 1
C16:2	7 ± 2	9 ± 2	7 ± 3
C16:3	14 ± 4	9 ± 3	8 ± 3
C18:0	0,8 ± 0,4	1,1 ± 0,4	4 ± 2
C18:1*	5 ± 2	8 ± 2,5	6 ± 2
C18:1	1,5 ± 0,7	1,4 ± 0,2	4 ± 2
C18:2	18 ± 1,5	27 ± 2	21 ± 4
C18:3	27 ± 3	17 ± 2	18 ± 2

*(CHISTI, 2007).

A presença de cadeias insaturadas ameniza a possibilidade de gelificação do biodiesel, portanto, o PN e o PEFF serão um inconveniente menor em climas frios. O aumento do teor de ácidos graxos, com uma, duas, ou mais duplas ligações aumenta o grau de insaturação total do biodiesel e conseqüentemente ocasiona posições alílicas (CH₂ vizinhos às duplas ligações) reagirem com o oxigênio atmosférico por via radicalar, formando peróxidos que se decompõem dando origem a compostos de cadeia carbônica menores como, por exemplo, aldeídos. O maior problema decorrente da decomposição dos peróxidos é a possibilidade de reação dos radicais livres com os sítios insaturados através de ligações cruzadas, dando origem a materiais poliméricos que causariam depósitos nos sistemas de injeção dos motores, os bicos injetores, ou promovendo o travamento do cabeçote da bomba de injeção de combustível (KNOTHE, 2010).

Dentre os ácidos graxos poliinsaturados de cadeias longas (PUFAs) das microalgas, os ácidos linoleico e linolênico são predominantes em quase todas as espécies. A quantidade de ácido linoleico é principalmente alta em espécies como *Spirulina platensis* (Cyanophyceae), *Tetraselmis suecica* (Prasinophyceae), *Nannochloris atomus*, Chlorophyceae (*Chlorella* e *Dunaliella*), e *Porphyridium cruentum* (Bangiophyceae) (BASOVA, 2005).

Algumas algas produzem grandes quantidades de lipídeos com (PUFAs), exemplo disso é a alga verde *Parietochloris incise*, cujo óleo contém de 34 a 42% de PUFAs, como o ácido araquidônico (C20:4), ácido eicosapentanóico – EPA (C20:5) e o ácido docosa-hexanóico – DHA (C22:6) Embora possam ser transformados em ésteres, tornam-se inadequados para a utilização do biodiesel, como já mencionado, e que ainda resulta também uma maior instabilidade do biodiesel durante períodos longos de estocagem (BIGOGNO *et al.*, 2002).

Diversos tipos de lipídeos são produzidos pelas microalgas e a distribuição destes lipídeos incluem fosfolipídeos, glicolipídeos, mono-, di- e triacilgliceróis, entre outros (GREENWELL *et al.*, 2010). A avaliação dos triacilgliceróis quanto à sua composição em ácidos graxos é de fundamental importância, dada a influência destes sobre propriedades do biodiesel como: a viscosidade cinemática, a massa específica, o ponto de entupimento de filtro a frio e a estabilidade oxidativa (FRANCO *et al.*, 2013)

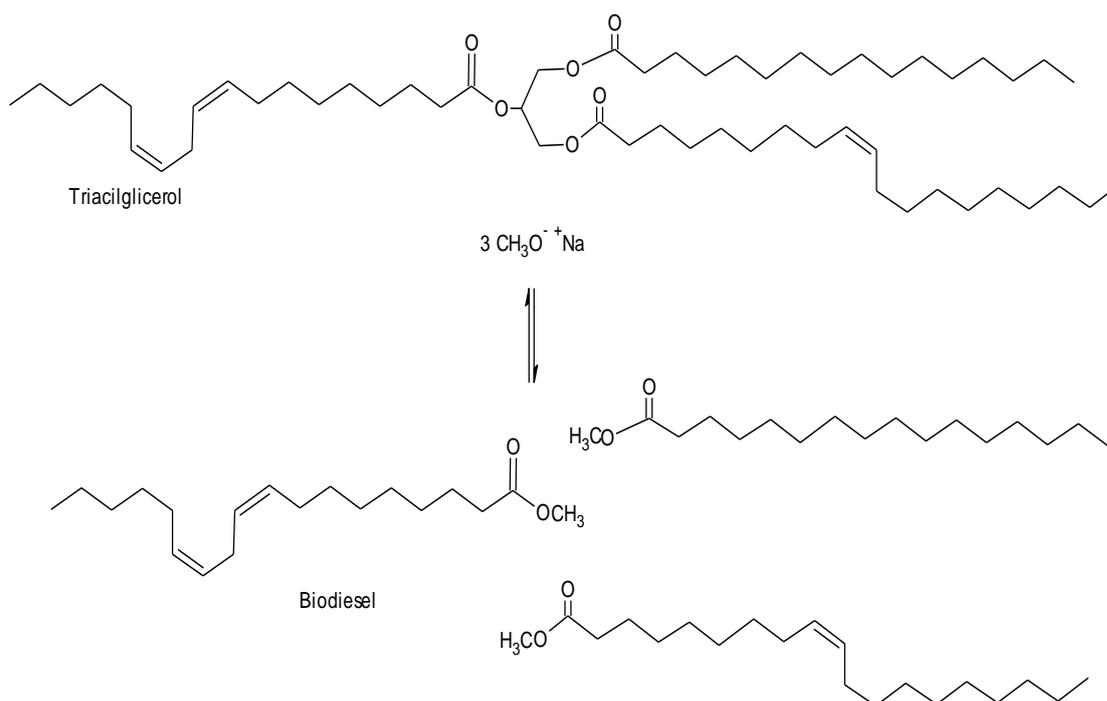
Diversos autores têm trabalhado na prospecção de microalgas adequadas para a produção de biodiesel e para isso concentram seus trabalhos, além do cultivo, da colheita e separação das microalgas, nos processos de extração e caracterização dos compostos extraídos.

2.4 BODIESEL DE MICROALGAS

Pesquisas estão sendo desenvolvidas para utilização de microalgas como matéria-prima para produção de biodiesel com o objetivo de avaliar as variáveis que influenciam no rendimento e na qualidade do produto, assim como nos custos do processo. Esse processo envolve as etapas de extração dos lipídeos da biomassa de microalgas, a remoção do excesso de solvente e a produção de biodiesel por transesterificação ou esterificação (QIUL *et al.*, 2011).

A transesterificação é a reação entre um óleo vegetal com um álcool de cadeia curta como metanol e etanol para formar monoésteres e glicerol. Esta reação é reversível e um excesso de álcool é usado para deslocar o equilíbrio para o lado dos produtos. Estequiometricamente, a reação de transesterificação requer 3 mol de álcool para cada mol de triglicerídeo para produzir 1 mol de glicerol e 3 de ésteres. Industrialmente, por se tratar de processo reversível são utilizados pelo menos 6 mols para cada 1 mol de triglicerídeo. Para que a reação de fato aconteça, o primeiro passo é a conversão dos triacilglicerol à diacilglicerol, em seguida, a conversão de diacilglicerol à monoacilglicerol e, por fim, monoacilglicerol se convertem em monoésteres alquílicos e glicerol (FUKUDA *et al.*, 2001).

Na Figura 2.5 é apresentada a reação de transesterificação.



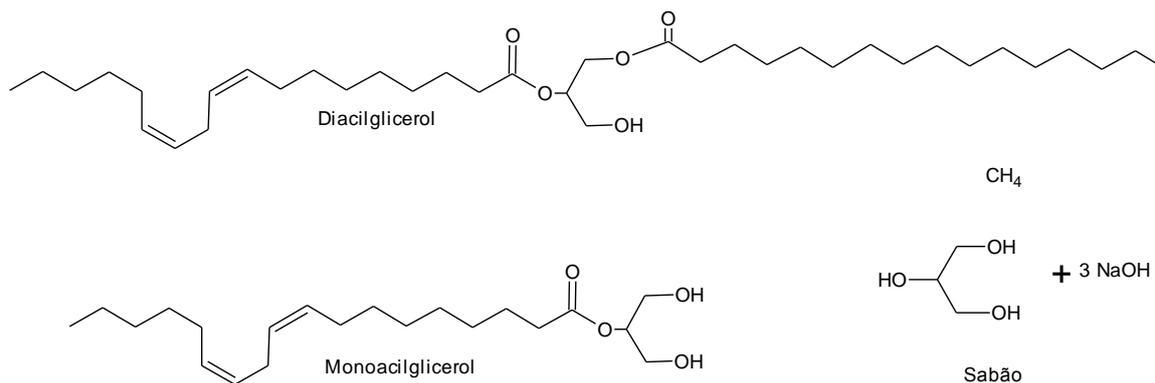


Figura 2.5 - Transesterificação do triacilgliceróis na presença de metanol e hidróxido de sódio

Miao e Wu (2006), ao utilizar óleo de microalgas, observaram que catalisadores alcalinos convencionais não eram adequados para a sua transesterificação, provavelmente devido ao elevado índice de acidez do óleo ($8,97 \text{ mg KOH.g}^{-1}$), que conduz a reações secundárias, como a saponificação. Os autores realizaram experimentos para determinar as condições ideais para a transesterificação ácida de óleo de microalgas. Utilizou-se o óleo da microalga *Chlorella protothecoides*, obtida em cultivo heterotrófico. O rendimento e a densidade do biodiesel foram avaliados, sob diferentes temperaturas e quantidades de catalisador (com base no peso de óleo). Economicamente, a combinação do processo com 100% de catalisador em relação à massa do óleo e temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ foi à condição mais favorável, pois neste caso o custo de produção foi inferior à alternativa de uso do catalisador H_2SO_4 em alta temperatura por um longo tempo. Foram estudados ainda os efeitos da variação na razão molar metanol/óleo sobre o rendimento e a densidade do biodiesel. Foram obtidos rendimentos de 68 e 63% em biodiesel na razão molar 45:1 e 56:1, respectivamente.

A esterificação também é utilizada para produção de biodiesel, consiste na reação entre os ácidos graxos, encontrados nos óleos vegetais, com metanol ou etanol para formar ésteres metílicos ou etílicos, respectivamente, e água. Geralmente, a reação de esterificação é catalisada por ácidos inorgânicos como o ácido sulfúrico. A reação é reversível e o ácido catalisa tanto a reação direta (a esterificação) como a reação inversa (a hidrólise do éster). Assim, para deslocar o equilíbrio em favor dos produtos, podem-se utilizar dois métodos: remoção de um dos produtos, preferencialmente a água, ou utilizar um excesso de um dos reagentes, como o álcool (D'OCA *et al.*, 2011).

Na Figura 2.6 é apresentada a reação de esterificação do ácido oleico com metanol.

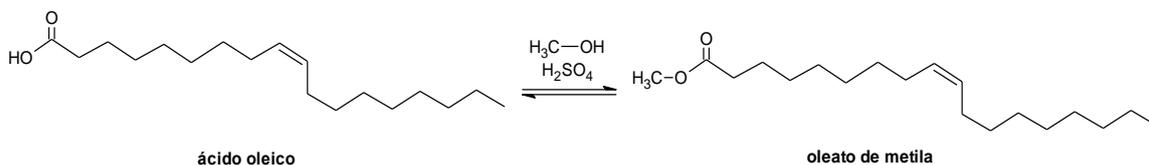


Figura 2.6 - Esterificação de ácidos graxos catalisadas por ácido sulfúrico.

O rendimento de formação de ésteres graxos é influenciado pela quantidade de álcool no meio reacional, porque a transesterificação e a esterificação são reações de equilíbrio. Dessa forma um excesso de álcool é necessário para deslocar a reação para formação dos ésteres. Para máxima conversão de ésteres, geralmente é utilizada uma razão molar de na faixa de 6:1 a 13:1 álcool/óleo, porém a otimização da razão molar depende das características da matéria prima utilizada (MA e HANNA, 1999).

No presente trabalho a extração do óleo de microalgas teve como método de extração em banho de ultrassom e leito fixo com solvente pressurizado.

A técnica em ultrassom para extração de óleo de biomassa de microalgas teve como objetivo a obtenção de curvas cinéticas do rendimento em extrato uma vez que não se encontra dados literários com ênfase em rendimento de extrato ao longo do tempo. O método de extração em que envolve um leito fixo com solvente pressurizado, embora tenha trabalhos com extração de óleos vegetais na utilização dessa técnica, também não há registros até o presente momento, deste método para a extração do óleo de microalgas.

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os materiais, equipamentos e reagentes utilizados na extração do óleo de microalgas. Em seguida são descritos os processos de extração, dos métodos utilizados para caracterização da matéria-prima e extrato, e a conversão dos ácidos graxos para seus respectivos ésteres metílicos.

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Biomassa

As microalgas utilizadas nos experimentos foram da espécie *Chlorella pyrenoidosa ssp*, obtida comercialmente da empresa Quimer® (Campinas-SP, Brasil), as especificações declaradas pelo fabricante indicam: 61,3% de proteínas, 21,0% de carboidratos e 2,3% de clorofila sendo a sua granulometria de 120 mesh.

As microalgas da espécie *Chlorella powder* foram obtidas da empresa Genix® (Goiania-GO, Brasil), sem laudo de especificações.

As mesmas foram conservadas em geladeira com temperatura de aproximadamente 5° C e retirada somente no momento do uso.

3.1.2 Equipamentos, Reagentes e Padrões.

a) Teor de umidade

Para os ensaios do teor de umidade na matéria-prima utilizou uma balança de infravermelho semi-analítica (marca Labstore modelo IV2000) e pratos de alumínio tamanho P, como suporte da amostra no interior do equipamento, e uma balança analítica (marca Bel Enginnerring modelo 250A) para pesagem das amostras.

b) Teor de umidade e voláteis

Para determinação do teor de umidade e voláteis utilizou uma estufa (marca Solab modelo SL 1000) e cadinhos de porcelana para o depósito das amostras e uma balança analítica (marca Bel Enginnerring modelo 250A).

c) Teor de Cinzas

Para os experimentos do teor de cinzas utilizou-se uma estufa (marca Solab modelo SL 1000) para secagem da matéria-prima em cadinhos de porcelana, uma chapa de aquecimento (marca Edulab modelo XM-TD701) para incineração das amostras, e uma mufla (marca Quimis modelo Q.318.D25T).

d) Extrator de leito fixo

O extrator de leito fixo apresentado na Figura 3.1, consiste de um reservatório de solvente (recipiente de vidro), um banho termostático (marca Quimis modelo Q214S2), uma bomba de HPLC (marca Shimadzu modelo LC – 20AT), um extrator de aço inox AISI 312 com capacidade de 72 cm³, uma válvula micrométrica na saída do extrator, um indicador de pressão (fabricante Parr instruments modelo A1960E), tubos de ensaio para coleta das alíquotas.

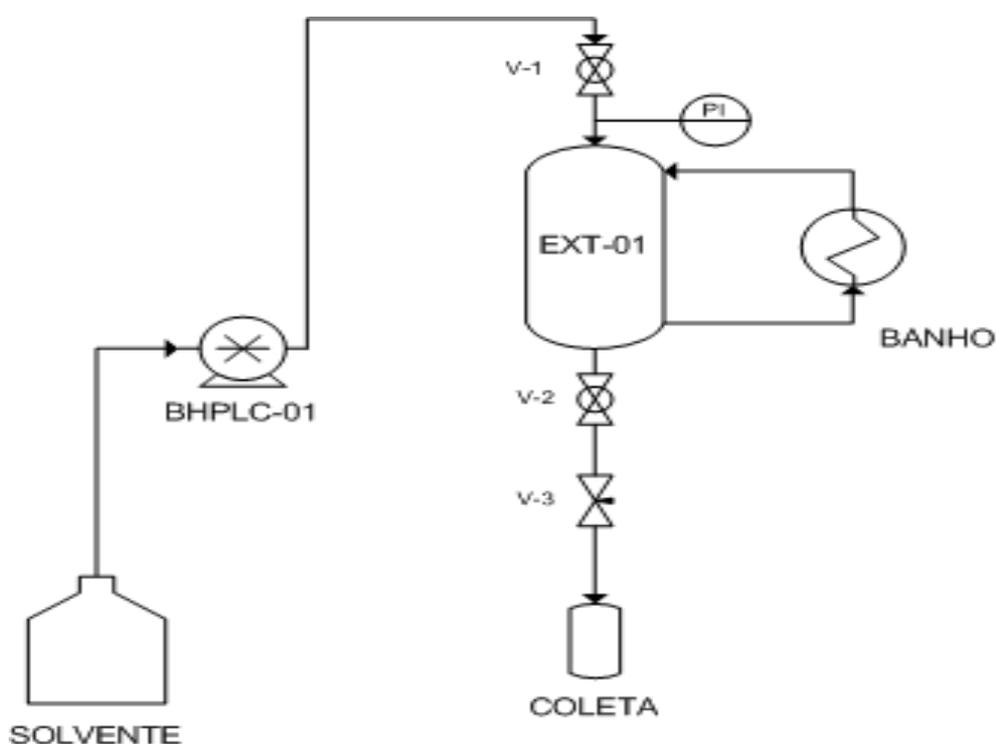


Figura 3.1 - Módulo Experimental. Desenho cedido por: Eng. Marcus Vinícius Brandalize (2013).

Os solventes usados na extração foram etanol (marca Vetec grau P.A 95%), metanol (marca Vetec grau P.A 99,8%) e n-hexano (marca Synth grau P.A 98,5%). Para secagem dos solventes presentes nas amostras fez-se o uso de uma estufa de circulação (marca Labstore modelo 12471/09).

Para o sistema de recirculação foi utilizado o mesmo extrator em leito fixo como representado na Figura 3.2. O solvente usado na extração de recirculação foi etanol (marca Vetec grau P.A 95%).

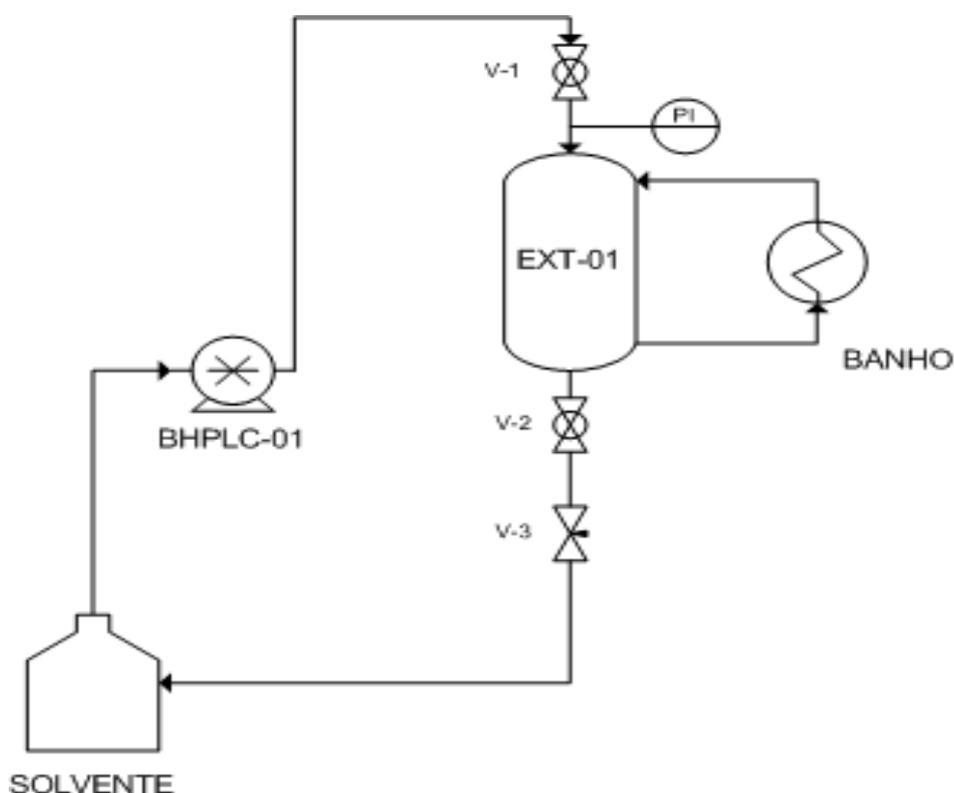


Figura 3.2 - Sistema de recirculação. Desenho cedido por: Eng. Marcus Vinícius Brandalize (2013).

e) Extrator de ultrassom (US)

Para as extrações em banho de ultrassom, utilizou o equipamento apresentado na Figura 3.3, marca Fisher Scientific Ultrasonic Cleaner, modelo FS30, potência de 117 W com uma frequência de 42 kHz e intensidade de radiação de $0,27 \text{ W/cm}^2$. O solvente etanol usado em todo o processo de extração com banho de ultrassom foi da marca Vetec, grau P.A 95%. A água destilada foi usada como cossolvente em alguns dos ensaios.

Foram usados erlenmeyers de 250 mL durante as extrações como recipiente da biomassa e solvente (extrator batelada). O monitoramento da temperatura foi

feito com termômetro calibrado (marca Alla France). A separação da biomassa residual da solução (etanol, água e extrato) foi feita com papel filtro qualitativo e um funil de vidro onde a solução filtrada era transferida para um balão de fundo redondo. Para separar o solvente do extrato fez-se o uso de um rotaevaporador (marca Heidolph modelo 517-02000-01-0), ligado a uma bomba de vácuo (marca Quimis modelo ISQ 9002). A remoção do extrato do balão após a destilação do solvente era feito com n-hexano da marca Synth grau P.A 98,5%. E para secagem das amostras utilizou uma estufa de circulação (marca Labstore modelo 12471/09).



Figura 3.3 – Fotografia do banho de ultrassom usado neste trabalho.

f) Esterificação

Os reagentes utilizados para reação de esterificação das amostras dos extratos de microalgas obtidas no presente trabalho foram: NaOH (grau P.A 99%), NH_4Cl (grau P.A 99,5%), ácido sulfúrico (grau P.A 95-99%), metanol (grau P.A 99,8%) e n-heptano (grau P.A 99,5%) todos da marca Vetec, tubos de ensaio com tampas e ótimas vedações (marca Schott, 18 x 180mm) para reações de esterificação, agitador magnético (marca Edutec modelo EEQ9008) usado para auxiliar o preparo das solução saponificação e solução esterificante, um banho com refluxo usado de um rotaevaporador (marca Heidolph modelo 517-02000-01-0) para o aquecimento das reações e vials de 1,5 mL onde eram transferidos as alíquotas das amostras para posteriormente serem injetadas no CG-FID.

g) Derivatização

Para as reações de derivatização foi utilizado N-Metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) (marca Sigma Aldrich grau P.A 99,9%) e Piridina (marca Synth grau P.A 99,0%).

h) Teor de ésteres metílicos

Nas análises de quantificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos, dos extratos etanólicos e hexânicos, empregou-se a cromatografia á gás (Shimadzu, modelo 2010 plus® – CG), com um detector de ionização em chama. A coluna capilar usada foi Select Biodiesel for Glycerides 15 m + RG (15,0 m x 0,32 mm de diâmetro interno x espessura do filme de 0,45 µm). O gás de arraste utilizado foi o Hélio 5.0 (Analítico), e os gases auxiliares o Nitrogênio 4.6 (FID), Ar Sintético 4.7 (FID), e o Hidrogênio 4.5 (FID) todos da White Martins®.

Os padrões primários empregados foram adquiridos da Sigma-Aldrich, como segue: Éster metílico do ácido láurico (Part.no. 234591), éster metílico do ácido mirístico (Part.no. M3378), éster metílico do ácido palmítico (Part.no. W509531), éster metílico do ácido palmitoleico (Part.no. 76176), éster metílico do ácido esteárico (Part.no. W504807), éster metílico do ácido oleico (Part.no. 75160), éster metílico do ácido linoleico (Part.no. 47791), éster metílico do ácido linolênico Part.no. 47792), éster metílico do ácido araquídico (Part.no. 10941) e padrão interno metilheptadecanoato (Part.no. 286087), todos da Sigma-Aldrich.

i) Análises Espectrométricas

Para confirmação dos ésteres metílicos nos extratos etanólicos e hexânicos utilizou-se cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. O sistema cromatografico utilizado foi um cromatógrafo gasoso (Varian 320 MS modelo 2510-CG) com injetor split/splitless acoplado a um detector de massas 320 MS. A coluna utilizada foi uma capilar VF 5 MS® (5% Fenil, 95% Dimetilpolisiloxano Varian Inc.) de 30,0 m x 0,25 mm de diâmetro interno x espessura do filme de 0,25 µm), com baixa polaridade. O gás de arraste utilizado foi Hélio 5.0 (Analítico)-W&M®. Os padrões verdadeiros utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich através de um mix denominado Supelco 37 FAME mix (catalog. no. 18919 - ampola com 100 mg). A solução foi diluída primeiramente em balão volumétrico de 10 mililitros (SM10 mg/ml) e posteriormente diluições do padrão foram preparadas a partir dessa solução Mãe.

Esse mix continha 37 componentes de ésteres metílicos de ácidos graxos representados a seguir:

- Éster metílico do ácido cis-13,16-Docosadienóico 2 m/m %
- Éster metílico do ácido cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenóico 2 m/m %
- Éster metílico do ácido cis-11,14-Eicosadienóico 2 m/m %
- Éster metílico do ácido cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenóico 2 m/m %
- Éster metílico do ácido cis-8,11,14-Eicosatrienóico 2 m/m %
- Éster metílico do ácido cis-11,14,17-Eicosatrienóico 2 m/m %
- Éster metílico do ácido cis-11-Eicosenóico 2 m/m %
- Éster metílico do ácido cis-10-heptadecenoate 2 m/m %
- Hexanoato metílico 4 m/m %
- γ -linolenato metílico 2 m/m %
- Araquidato metílico 4 m/m %
- Araquidonato metílico 2 m/m %
- Behenato metílico 4 m/m %
- Butirato metílico 4 m/m %
- Decanoato metílico 4 m/m %
- Dodecanoato metílico 4 m/m %
- Elaidato metílico 2 m/m %
- Erucato metílico 2m/m %
- Eneicosanoato metílico 2m/m %
- Heptadecanoato metílico 2 m/m %
- Linoleato metílico 2 m/m %
- Linolelaidato metílico 2 m/m %
- Linolenato metílico 2 m/m %
- Miristato metílico 4 m/m %
- Mirístoleato metílico 2 m/m %
- Oleato metílico 4m/m %
- Octanoato metílico 4 m/m %
- Palmitato metílico 6 m/m %
- Palmitoleato metílico 2 m/m %
- Pentadecanoato metílico 2m/m %
- cis-10-pentadecenoate metílico 2 m/m %

- Estearato metílico 4 m/m %
- Tricosanoato metílico 2 m/m %
- Tetracosanoato metílico 4 m/m %
- Tridecanoato metílico 2 m/m %
- Undecanoato metílico 2m/m %
- cis-15-tetracosenoato metílico 2m/m %

j) Análises Cromatografia de permeação em gel

Para as análises realizadas em cromatografia de permeação em gel (GPC), foi utilizado equipamento da marca Waters modelo 1515, provido de um detector de índice de refração Waters 2414, injetor 2707. A eluição das amostras utilizou o solvente tetrahidrofurano (THF) (marca Carlo Erba grau P.A 99,9%) e os padrões verdadeiros de Monoestearina 99% (Nu-schek prep - Cat. no. T160J28P), Diestearina 99,9% (Sigma - Cat. no. R476205), Triestearina (Nu-schek prep- Cat. no. T160J28P), Glicerol (Sigma - Cat. no. G9012).

k) Determinação de umidade por Karl Fischer

Para análise do teor de água em cada fase amostrada foi utilizado titulador potenciométrico (fabricante Metrohm modelo Titrand 836), no qual o método é baseado na titulação potenciométrica empregando o reagente de Karl Fischer (5RV, mín. 5.0 mg de H₂O marca Panreac) e metanol seco (max. 0,005% de água marca Panreac). Para transportar uma parte da solução previamente preparada para o equipamento potenciométrico fez-se o uso de seringa descartáveis de 5 mL com agulhas, que em seguidas eram pesadas em balança analítica da (marca Shimadzu modelo AY220).

3.2 MÉTODOS EXPERIMENTAIS

3.2.1 ENSAIOS PARA COMPOSIÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA e MATERIAL EXTRAÍDO

Devido à complexidade na composição molecular das microalgas, fez-se necessário o uso de algumas ferramentas de análise para a identificação e quantificação e análises físico-químicas dos componentes da matéria-prima e do extrato, conforme apresentado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1- Matriz dos ensaios para caracterização da matéria-prima e extratos.

Ensaio	Matriz		
	Matéria-prima	Material extraído	Ésteres metílicos
Teor umidade e voláteis (Secagem estufa)	x		
Teor umidade (Balança de Infravermelho)	x		
Teor de cinzas	x	x	
Karl Fischer		x	
Esterificação (Hartman e Lago modificado)	x	x	
Cromatografia gasosa (CG)	x	x	x
Espectrometria de massa (CG/MS)	x		
Cromatografia de permeação em gel		x	x

3.2.2 COMPOSIÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

3.2.2.1 Determinação do teor de umidade por balança de infravermelho

O teor de água livre foi determinado por uma balança infravermelho semi-analítica. O programa de aquecimento atingiu 135 °C, em seguida as amostras foram transferidas para a balança de infravermelho em um prato de alumínio tarado e analisadas individualmente, toda as biomassas usadas nos ensaios foram previamente pesadas em uma balança analítica com massa de 1,5 g ($\pm 0,01$ g). Durante a análise ocorreu a mensuração de massa e a secagem pela radiação do infravermelho, ou seja, o resultado do teor de umidade foi obtido quando a secagem das amostras atingiram peso constante e expressado diretamente em porcentagem de sólidos no visor do equipamento (CECCHI, 1999).

3.2.2.2 Determinação do teor de umidade e voláteis por secagem

Para determinação do teor de água livre e voláteis das biomassas seguiram as seguintes etapas: Foram pesadas 3 gramas ($\pm 0,01$ g) em balança analítica cada amostra, adicionadas em cadinhos de porcelana tarados (limpos e calcinados antes do uso), em seguida colocadas em estufa para a secagem em temperatura de 110 °C até peso constante. As amostras foram resfriadas em um dessecador com sílica gel até que atingissem a temperatura ambiente e em seguida foram pesadas. A massa seca foi o resultado obtido no final dos ensaios, quando a massa medida permaneceu constante ao longo do tempo (IAL, 1985).

A massa seca (MS) da amostra foi obtida através da equação:

$$MS (\%) = 1 - \frac{\text{Massa final da amostra após secagem (g)}}{\text{Massa inicial da amostra úmida (g)}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

3.2.2.3 Determinação do teor de cinzas

Para determinação do teor de cinzas foi utilizada a norma AOCS Ca 11-55 (American Oil Chemists' Society). Primeiramente foi feita a incineração das amostras em uma chapa de aquecimento (marca Edulab modelo XM-TD701) a 300 °C, e estas foram mantidas na chapa até cessar a fuligem emitida pela biomassa durante a

queima. Em seguida os cadinhos com as amostras foram introduzidos na mufla (marca Quimis modelo Q.318.D25T) para calcinação com temperatura de 550 °C por 4 horas. Ao término do tempo as amostras foram retiradas da mufla, aguardou o esfriamento até temperatura ambiente em um dessecador com sílica gel. O tempo foi de 1 hora para a pesagem final das cinzas. Essas cinzas residuais foram calculadas pela diferença de peso com a amostra inicial e o peso do cadinho (IAL, 1985).

Os resultados foram expressos em porcentagem, através do cálculo:

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{\text{massa residual (g)}}{\text{massa da amostra inicial (g)}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

3.3 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO

3.3.1 Extrações em leito fixo

Para as extrações em leito fixo, inicialmente o extrator de inox foi carregado com cartuchos feitos de papel filtro contendo de 25 - 30 g de biomassa de microalgas, em seguida ajustava-se a temperatura e pressão do extrator para as condições desejadas. O controle da temperatura do extrator era feito usando-se um banho ultratermostático ligado ao equipamento. A pressão foi controlada manualmente, através de uma válvula micrométrica e acompanhada pelo indicador de pressão conectado no extrator e no visor da bomba de HPLC. Para a pressurização do sistema era feita a alimentação com solvente extrator pela bomba de HPLC numa vazão de 5 mL/min até atingir a pressão dos experimentos. Essa pressurização do sistema acontecia ao longo do tempo de 20 minutos, tempo este necessário para preencher a capacidade volumétrica do extrator com solvente de extração.

Assim que a temperatura e a pressão desejada foram atingidas, as microalgas eram submetidas à etapa de confinamento por 1 hora no extrator para então começar a retirada das alíquotas. Em seguida, abria-se a válvula micrométrica para iniciar a coleta das amostras. O extrato foi coletado, em intervalos de tempo pré-definidos em tubos de ensaio. O tempo de coleta para o intervalo de cada alíquota foi de 5 minutos para uma determinada extração, de 10 minutos, de 15 minutos para outras extrações. As vazões programadas na bomba HPLC foram de

5, 2 e 1 mL/min. Cada processo de extração teve sua vazão correspondente fixa durante toda a extração conforme apresentado na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Condições experimentais das extrações em leito fixo

Condição	Solvente	Temperatura (°C)	Pressão (MPa)	Vazão (mL/min)	Tempo retirada aliquotas
1	Etanol	40	5 – 5,4	2	5
2	Etanol	40	5 – 5,4	2	5
3	Etanol	40	5 - 5,4	1	15
4	Etanol	80	15 - 16	1	15
5	Hexano	40	48 - 54	2	10
6	Hexano/etanol (6:1 v:v)	90	16 - 17	2	10
7	Hexano/metanol (6:1 v:v)	90	16 - 17	5	10
8	Etanol	40	5 - 5,4	2	240

Para determinação do rendimento em extrato, após o termino da extração as alíquotas eram transferidas para a estufa de circulação com temperatura programada no ponto de ebulição do solvente. Após as amostras terem sido secadas, foram retiradas da estufa, resfriadas em dessecador até a temperatura ambiente, e pesadas para determinação do rendimento segundo a equação:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Massa do extrato (g)}}{\text{Massa da biomassa inicial (g)}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Este procedimento foi executado com os solventes, etanol, metanol, n-hexano, hexano/etanol (6:1 v:v) e hexano/metanol (6:1 v:v).

Outro método testado com o extrator em leito fixo foi montar um esquema de recirculação, no que consistiu em conduzir o sistema para que ao mesmo tempo ocorresse a alimentação do solvente e coleta da amostra no extrator durante o processo de extração em etanol. Após o término da extração o procedimentos de secagem foi o mesmo das extrações em leito fixo em sistema contínuo em leito fixo e a determinação do rendimento foi feita conforme a equação 3.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cinética e Termodinâmica Aplicada (LACTA) do Departamento de Engenharia Química da UFPR – Universidade Federal do Paraná.

3.3.2 Extrações em banho de ultrassom

O método consistiu em adicionar água no banho de ultrassom um pouco menos da metade de sua capacidade (4 litros), em seguida foi introduzido no interior do banho de ultrassom o erlenmeyer contendo a biomassa da microalga com seu peso conhecido, conforme a Figura 3.4, tendo o mesmo procedimento repetido para cada processo de extração. A temperatura das extrações foi controlada constantemente por um termômetro e essa temperatura foi mensurada em intervalos de 10 minutos, uma vez que a programação do banho de ultrassom, não permitia fixar a temperatura. A temperatura final para cada processo de extração em banho de ultrassom foi de 67 °C, tendo 25 °C como temperatura inicial. Para cada extração o banho foi mantido inicialmente a 25 °C, fazendo a troca da água que ficava no interior do banho, para evitar que esse parâmetro influenciasse nas no inícios das extrações.

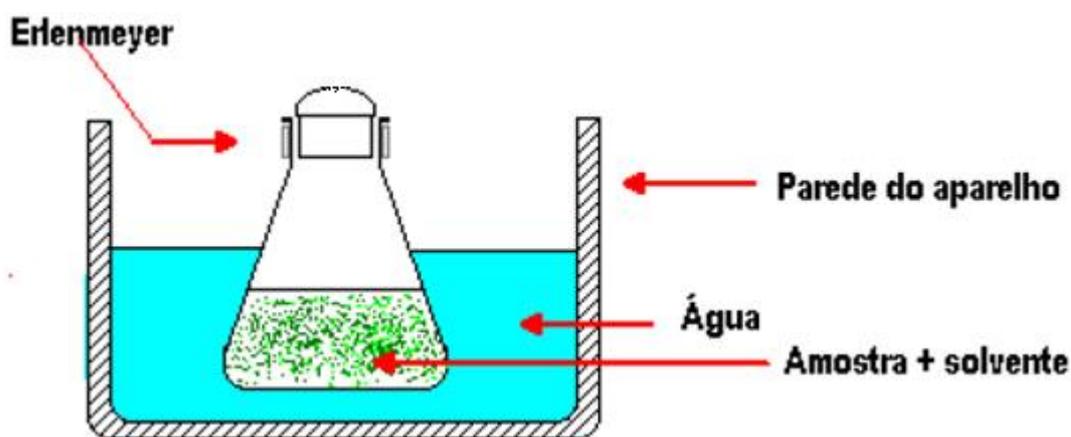


Figura 3.4 - Esquema usado para extração com ultrassom.

Após o término do tempo de extração as amostras foram filtradas e rotaevaporadora para a retirada do solvente. Depois de separado o solvente, a remoção do extrato foi feita cuidadosamente com um pequeno volume n-hexano e levado para uma estufa de circulação a 65°C para evaporação do n-hexano. Após a

secagem as amostras eram transferidas para um dessecador e resfriadas até temperatura ambiente, então pesadas e determinado o rendimento conforme a Equação 3.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS

3.4.1 Identificação dos ácidos graxos

Para identificação e quantificação dos ácidos graxos contidos nos extratos etanólicos, hexânicos, e da matéria-prima foram empregadas técnicas cromatográficas e espectrométricas. Para tanto derivatizou-se esses ácidos graxos a ésteres metílicos de acordo com a metodologia de HARTMAN E LAGO, modificado por MENEZES *et al.* 2013, e trimetil-silanos pela metodologia.

3.4.1.1 Método de esterificação

a) Preparo da amostra por Hartman e Lago (modificado)

A esterificação pelo método de Hartman e Lago modificado seguiu as etapas apresentadas Figura 3.5.

As soluções usadas na reação tiveram os seguintes preparo:

Solução de Metóxido ($\text{NaOH}/\text{CH}_3\text{OH } 0,5 \text{ mol.L}^{-1}$)

Pesados 2g de hidróxido de sódio, transferidos para um balão volumétrico de 100 mL e adicionado o metanol aos poucos com agitação vigorosa até completar o volume.

Solução Esterificante

Em um enlarmeyer foi adicionado 2,0 g de cloreto de amônia, 60,0 mL de metanol e 3,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, submetida a mistura a agitação por 15 minutos.

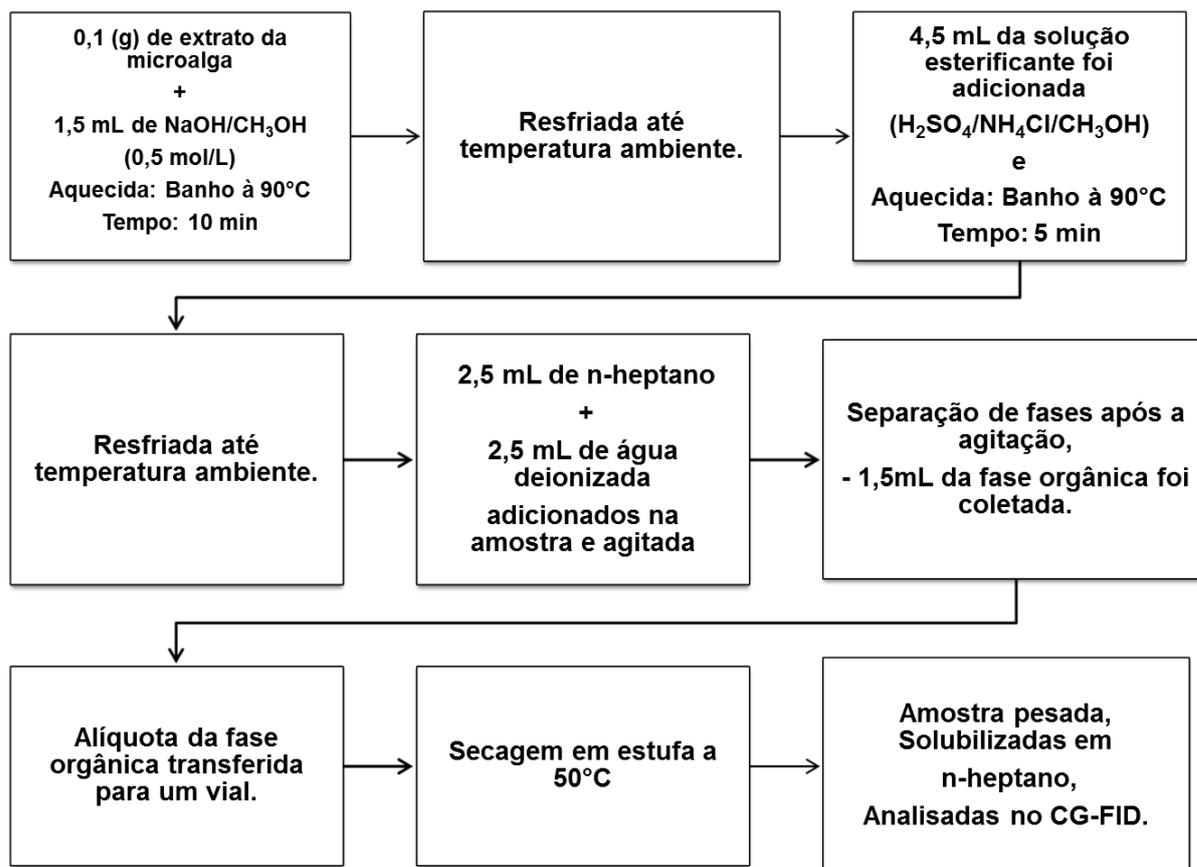


Figura 3.5 – Fluxograma das etapas do método de esterificação aplicado nas amostras dos extratos de microalgas.

b) Análise qualitativa/quantitativa dos ácidos graxos, representados na forma de seus ésteres metílicos.

Os ácidos graxos constituintes do material extraído foram identificados e quantificados utilizando-se dois processos cromatográficos:

O qualitativo por espectrometria de massa;

O quantitativo por detector de ionização de chama. Em ambos utilizou-se o processo de normalização de área para determinação do percentual dos componentes presente nas amostras.

Na qualificação e na quantificação empregou-se também o método da padronização externa, na presença de padrões verdadeiros para confirmar os tempos de retenções e os fatores de respostas dos analitos para cada um dos sistemas cromatográficos. O padrão verdadeiro usado FAME MIX 37 componentes em ésteres metílicos.

Para a qualificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos do extrato de microalgas, o espectrômetro de massas foi calibrado, utilizando 5 fragmentos principais no modo impacto de elétrons (EI). A coluna capilar usada foi a VF-5 MS, que serviu de referência para a cromatografia a gás FID. A faixa de detecção de massas ficou estabelecida entre 32,00 e 380,00 daltons. A leitura do sinal, após ensaios de varredura de massas, foi definida para 0,5 segundos, sob uma fonte de 1.435 volts. O modo de leitura foi de MRM a 0,70 AMV com tempo de início das análises 1,8 por minuto. A temperatura inicial da coluna foi mantida a 100 °C por 1 minuto e elevada a 200 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min e mantida por 2 minutos, e a uma taxa de 3,5 °C/min foi elevada até 260 °C. O gás de arraste utilizado foi Hélio mantido a uma vazão constante de 0,8 mL/minuto. A representação da rampa de aquecimento da coluna encontra-se no Anexo I. As análises foram realizadas com injetor no modo de injeção split de 1:100 com temperatura de 315 °C e detector com temperatura de 320 °C. O módulo de integração, tanto para o modelo normalização de área como padronização externa, usou quantificação de íons por RIC, ruído do sinal (RMS) e sensibilidade igual a 4. Os espectrogramas dos resultados obtidos para o FAME 37 mix estão apresentados no Anexo II. As análises feitas na espectrometria de massa (CG/MS) dos padrões verdadeiros estão com seus componentes químicos detalhados na tabela do Anexo III.

A quantificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos do extrato de microalgas foi feita por cromatografia gasosa utilizando coluna capilar Select Biodiesel. A temperatura inicial da coluna de 100°C com tempo de permanência de 1 minuto e elevada a 200°C a uma taxa de aquecimento de 10°C/min e mantida por 2 minutos, e a uma taxa de 3,5°C/min foi elevada até 260 °C com tempo de permanência de 2 minutos. O gás de arraste utilizado foi o Hélio mantido a uma vazão constante de 25 mL/min minuto. O volume de injeção foi 1,0 µL, operando no modo split de 1:10 com temperatura de 315 °C e detector FID com temperatura de 320 °C.

Os cromatogramas dos resultados obtidos para o FAME 37 mix estão apresentados no Anexo IV. A tabela com os detalhes dos componentes químicos identificados do padrão FAME 37 mix no CG-FID com seus respectivos nomes e tempo de retenção encontra-se no Anexo V. Ainda, foram construídas curvas de

padronização externa para os componentes de ácidos graxos do Fame 37 mix as quais estão apresentadas no Anexo VI.

A quantificação/qualificação dos ácidos graxos foi realizada no Centro de Pesquisa em Química Aplicada (CEPESQ), localizado na Universidade Federal do Paraná em Curitiba-PR.

3.4.1.2 Determinação de mono-, di- e tri (acilgliceróis) por Derivatização

a) Preparo das amostras por sililação.

A derivatização dos ácidos graxos foi realizada de acordo com a metodologia de sililação (derivados-TMS), onde foram pesados de 1 a 5 mg de amostras do extrato de microalgas e colocadas em vials, sendo adicionado 100 µl do reagente MSTFA e em seguida adicionado 50 µl de piridina. Em seguida as amostras foram aquecidas em banho-maria a 60 °C por 5 minutos, e depois aguardou-se o resfriamento das mesmas em temperatura ambiente, em seguida procedeu-se para a injeção no cromatógrafo a gás.

b) Análise quantitativa de derivados (CG)

Para quantificação dos derivados do extrato de microalgas, por cromatografia gasosa foi utilizado coluna capilar Select Biodiesel, com temperatura inicial da coluna de 180 °C sem tempo de permanência e elevada a 230 °C a uma taxa de aquecimento de 7 °C / min também sem tempo de permanência, depois a uma taxa de 10 °C/min foi elevada até 380 °C mantida por 10 minutos. O gás de arraste utilizado foi Hélio, mantido a uma vazão constante de 25 mL/min minuto. O volume de injeção foi 1,0 µL, operando no modo split de 1:10 com temperatura de 315 °C e detector com temperatura de 320 °C.

A quantificação dos derivados foi realizada no Centro de Pesquisa em Química Aplicada (CEPESQ), localizado na Universidade Federal do Paraná em Curitiba-PR.

3.4.1.3 Determinação de mono-, di- e tri- (acilgliceróis) por GPC.

Para as análises do óleo esterificado foram utilizados padrões de ésteres metílicos de óleo de soja de forma quantitativa por cromatografia de permeação em gel (GPC). Foram utilizadas duas colunas: Styragel – THF (300 x 7,8 mm - Waters) e Lichrosorb 10 Diol (250 x 4,6 mm Spectra physics) em série, mantidas a 40 °C e eluídas com tetrahidrofurano (THF) com vazão de 0,8 mL/min. As análises foram efetuadas por normalização de área com base em soluções dos padrões verdadeiros de monoestearina, diestearina, triestearina e glicerol.

As análises foram realizadas no Centro de Pesquisa em Química Aplicada (CEPESQ), localizado na Universidade Federal do Paraná em Curitiba-PR.

3.4.1.4 Teor de Cinzas do extrato

Para determinação do teor de cinzas do extrato, foi utilizada a norma AOCS Ca 11-55 (*American Oil Chemists' Society*), a massa pesada para cada amostra foi de 0,5 g ($\pm 0,004$ g), e todo o processo foi feito conforme a Equação 2.

3.4.1.5 Determinação do teor de água por Karl Fischer

Este método consiste em uma reação de oxidação do dióxido de enxofre por iodo, na presença de água. Foi adicionada uma base na reação para promover o deslocamento da reação e o reagente de Karl Fischer, que é composto por uma mistura de iodo e dióxido de enxofre. O solvente utilizado para realizar a titulação foi uma mistura de metanol seco. O álcool utilizado como solvente de titulação reage com o dióxido de enxofre para formar um sal, que é oxidado pelo iodo de reagente de Karl Fischer. Esta reação de oxidação é finalizada após o consumo de toda a água presente na mistura. Portanto, a porcentagem de água é quantificada através do volume de reagente de Karl Fischer consumido durante a titulação de uma amostra com quantidade conhecida. As massas das amostras que devem ser adicionadas para a caracterização encontram-se na faixa de 0,1 g a 0,2 g (IAL, 1985).

A reação da titulação proposta por Karl Fischer é representada através das equações:

$$A \rightarrow \%B$$

$$A (g) \times \frac{B}{100} (g) = C(g)H_2O$$

$$A (g) \rightarrow C(g) H_2O$$

$$D (g) \rightarrow x$$

$$x = E$$

$$\frac{E}{F} = G$$

$$G \times 100 = G\%$$

Onde:

A= Solução injetada no Karl Fischer (g)

B= Resultado da porcentagem de água da solução injetada %

C= Quantidade de água total na alíquota retirada da solução de análise (g)

D= Massa total da solução preparada para análise (massa extrato + massa solvente) (g)

E= Quantidade de água total na solução (g)

F= Massa do extrato (g)

G= Quantidade de água total na massa utilizada na análise.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

4. RESULTADOS DE DISCUSSÕES

Neste capítulo são apresentados os resultados e discussões obtidos para a caracterização da biomassa, extração do óleo de microalgas com solvente orgânico em leito fixo e banho de ultrassom, bem como a caracterização dos extratos obtidos.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA

A primeira etapa do trabalho foi o estudo sobre os extraíveis das microalgas. Para tanto foi necessário conhecer alguns parâmetros físico-químicos considerados importantes da biomassa utilizada, a fim de se entender a dinâmica da extração, e tornar os resultados confiáveis, com relação aos rendimentos obtidos e posteriormente a conversão desses extratos em biodiesel.

Os primeiros resultados físico-químicos dessa caracterização são apresentados na Tabela 4.1, com seus respectivos desvios padrões.

Tabela 4.1- Aspectos físico-químicos da biomassa *in natura* utilizada nas extrações.

Parâmetros medidos	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> Quimer®	<i>Chlorella powder</i> Genix®
Umidade BIV* (% m/m)	8,76 ± 0,7	6,73 ± 0,5
Água livre e voláteis** (% m/m)	7,77 ± 0,4	5,55 ± 0,5
Cinzas*** (% m/m)	5,75 ± 0,5	5,49 ± 0,2
Cor	Verde escuro	Verde escuro
Textura	Pó	Pó

* Balança de infravermelho ; ** Secagem em estufa ; *** Calcinação em mufla

Um dos fatores que pode ter sido a causa dos valores do teor de cinzas encontrados nas microalgas *Chlorella pyrenoidosa* e *Chlorella powder* deve-se a quantidade de sais usados cultivo dessas microalgas. A umidade pode ter sido acumulada ao longo do tempo conforme era necessária a manipulação da embalagem para os experimentos.

4.2 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO

Para comparar a eficiência dos métodos de extrações escolhidos nesse trabalho os rendimentos obtidos das extrações foram definidos pela razão da massa do extrato com relação à massa da microalga utilizada na extração. São comparados com os valores obtidos pelo método de Soxhlet, provenientes do trabalho de dissertação de Baumgardt (2013), com os seguintes rendimentos: de 7,58% m/m em etanol, 8,73% m/m em clorofórmio/metanol (2:1 v:v) e 3,2% m/m em n-hexano.

Na Tabela 4.2 são apresentados os resultados dos rendimentos das extrações em relação às diferentes condições experimentais de temperatura, pressão, vazão e volume do solvente, por quantidade de matéria-prima do processo de extração em leito fixo.

Tabela 4.2 - Condições das extrações em leito fixo do óleo da microalga *Chlorella pyrenoidosa*.

Condição	Método	Solvente	Biomassa (g)	Temperatura (°C)	Pressão (MPa)	Vazão (mL/min)	Tempo (min)	Rendimento em extrato (% m/m)
1	LF	Etanol	24,5	40	5 – 5,4	2	95	1,6
2	LF	Etanol	23,3	40	5 – 5,4	2	95	1,4
3	LF	Etanol	23,4	40	5 - 5,4	1	210	1,5
4	LF	Etanol	23,3	80	15 - 16	1	210	1,7
5	LF	Hexano	27,9	40	48 - 54	2	180	1,3
6	LF	Hexano/etanol (6:1 v:v)	24,5	90	16 - 17	2	130	2,2
7	LF	Hexano/metanol (6:1 v:v)	26,2	90	16 - 17	5	180	1,5
8	LF*	Etanol	23,9	40	5 - 5,4	2	240	2,3

*Sistema de recirculação. LF: Leito Fixo.

4.2.1 Extrações com leito fixo

Nas Figuras 4.1 a 4.3 são apresentadas as curvas de extração para as condições 1 e 2, 3 e 4, e 5, 6 e 7 da Tabela 4.2, respectivamente.

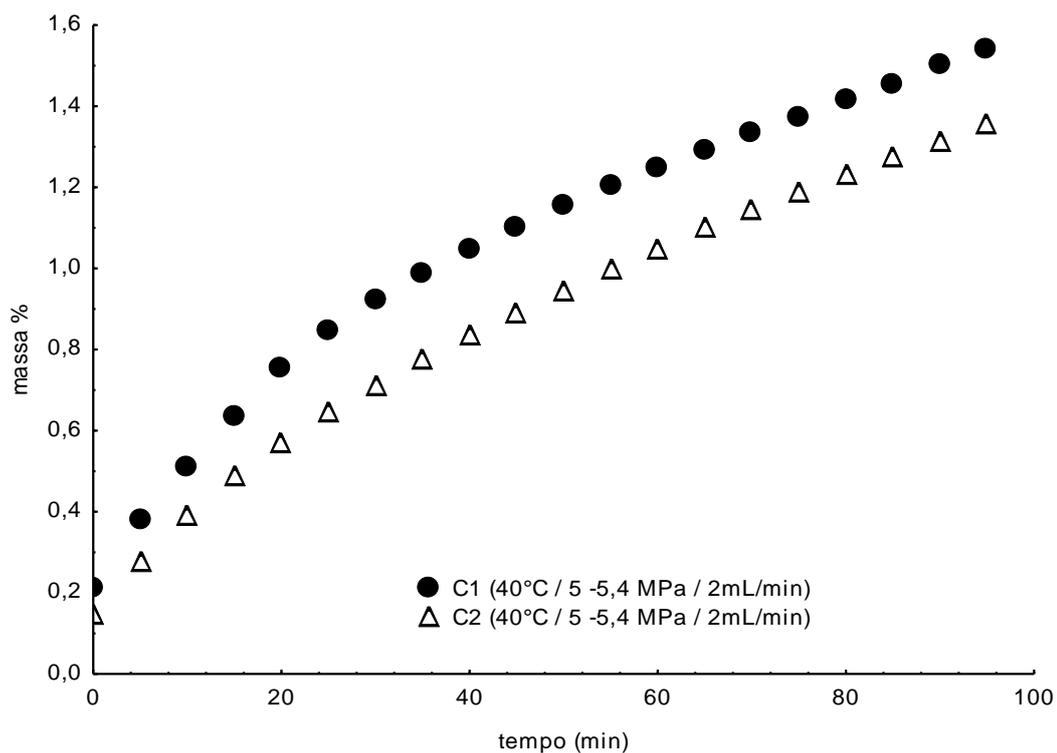


Figura 4.1 - Curvas cinéticas experimentais do processo de extração do óleo de microalga com as mesmas condições de extração utilizando o etanol como solvente, com tempo de retirada das alíquotas de 5 em 5 minutos

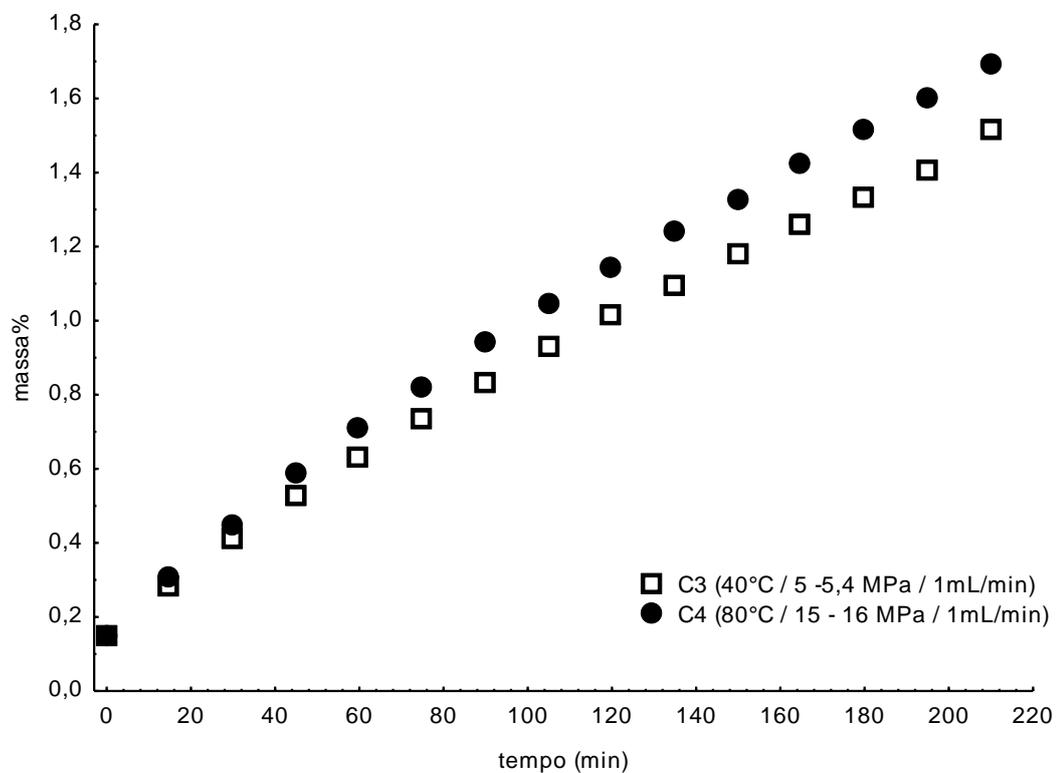


Figura 4.2- Curvas cinéticas experimentais do processo de extração do óleo de microalga com diferentes condições de extração utilizando o etanol como solvente, com tempo de retirada das alíquotas de 15 em 15 minutos.

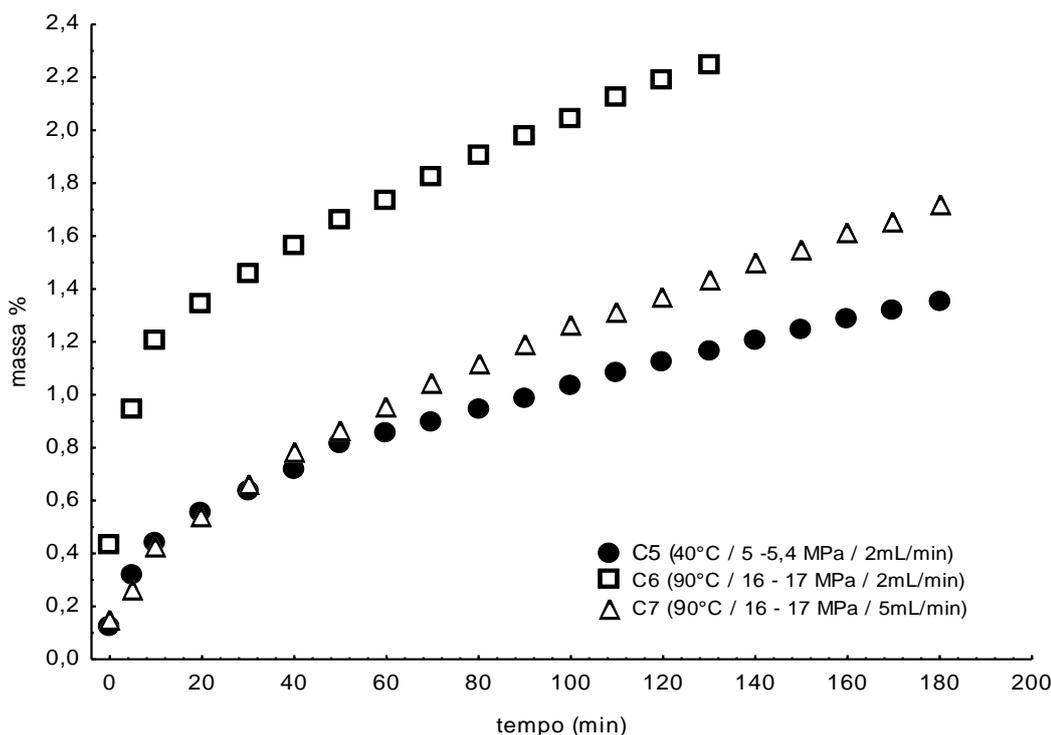


Figura 4.3- Curvas cinéticas experimentais do processo de extração do óleo de microalga com diferentes condições de extração utilizando o etanol como solvente, com tempo de retirada das alíquotas de 15 em 15 minutos.

Neste trabalho, com o intuito de se verificar a limitação por saturação do solvente em leito fixo, o processo de extração foi conduzido em num sistema com recirculação. Este experimento está apresentado na Tabela 4.2 na condição 8. O rendimento desse experimento foi de 2,3%.

A utilização de um extrator de leito fixo para as extrações de óleo de microalgas mostrou limitações devido ao baixo rendimento das extrações. Um fator que tem clara influência nos experimentos é o empacotamento da biomassa carregada no extrator. Este empacotamento do leito, devido às condições de altas pressões, pode não ter permitido a adequada permeação do solvente no interior do leito e dificultando a interação com a biomassa (penetração na parede celular) e prejudicando a solubilidade dos extraíveis no solvente.

4.2.2 Extrações com ultrassom

No presente trabalho o uso de um procedimento de extração em banho de ultrassom tem com objetivo principal a diminuição dos tempos de extração, em que

fixou-se um máximo de 120 min. As condições experimentais das extrações em banho de ultrassom com os melhores rendimentos estão apresentado na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Condições das extrações em banho de ultrassom do óleo da microalga *Chlorella pyrenoidosa*.

Condição	Método	Solvente	Biomassa (g)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Rendimento em extrato (% m/m)
9	US	Etanol (200 mL)*	12,8	25-67	120	15,5
10	US	Etanol (200 mL + H ₂ O (4% v:v)	13,5	25-67	120	15,9
11	US	Etanol (100 mL)*	13,2	25-67	120	14,7

US: ultrassom

Para os ensaios feitos nas condições 9, 10 e 11, da Tabela 4.3, o solvente utilizado foi o etanol e a biomassa foi a *Chlorella pyrenoidosa*.

Os dados cinéticos dessas extrações são apresentados Figura 4.4 onde os rendimentos tiveram um aumento significativo quando comparados aos resultados obtidos em leito fixo. As extrações foram realizadas nos tempos de 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos. Segundo Breitbach *et al.* (2003), o método de extração por ultrassom em geral apresenta melhores resultados do que métodos convencionais com solvente devido às ondas ultrassônicas, as quais provocaram mudanças físico-químicas provenientes da variação de pressão, o que provoca a cavitação e microfluxos de líquidos. Estas alterações extremamente rápidas no meio provocam aquecimento, ruptura nos sólidos e instabilidade na superfície de interfaces de sistemas líquido-líquido e líquido-gás, produção de bolhas com tamanhos diferentes. A associação destes eventos, em geral, provoca maior erosão na superfície dos sólidos e acelera o transporte de massa dos extraíveis para o solvente. Pode ser observado, a partir dos resultados apresentados na Figura 4.4 que houve um aumento expressivo nos rendimentos de extração de óleo de microalgas em banho de ultrassom.

De uma maneira geral observa-se, a partir da Figura 4.4, que as diferentes condições experimentais utilizadas em ultrassom não produziram grandes diferenças nas cinéticas de extração, em termos de rendimento de extrato. Tanto a adição de água (4% v:v em etanol), quanto a redução em 50% do volume de etanol em relação

a carga de biomassa, apresentaram comportamento cinético e rendimento máximo semelhantes.

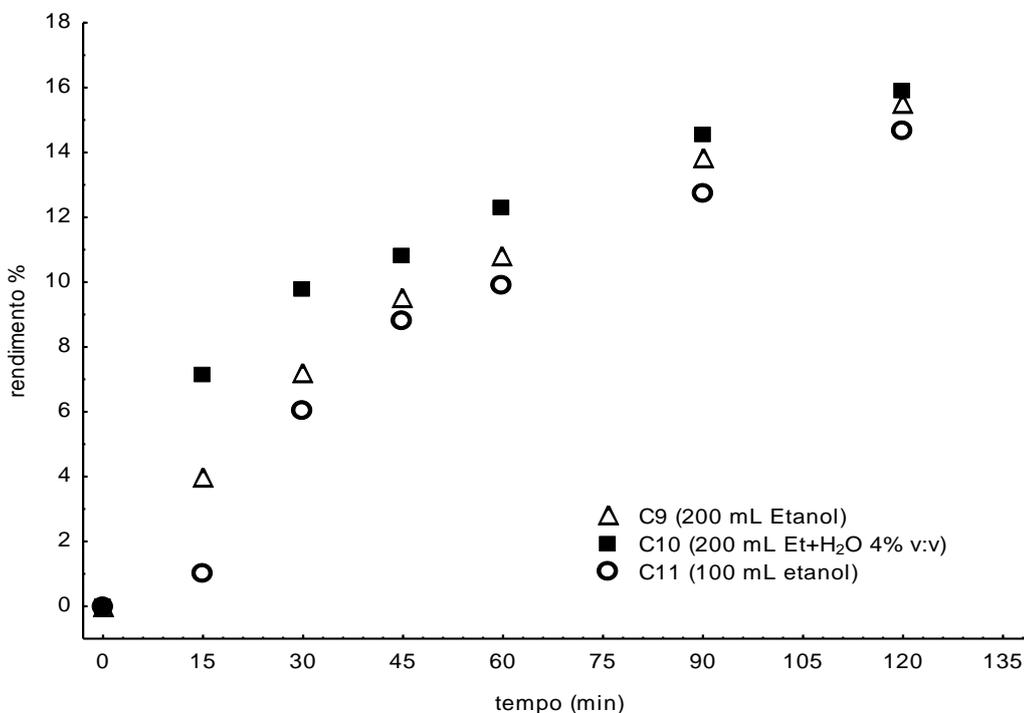


Figura 4.4 - Cinética e comparação entre os valores obtidos para o rendimento em massa do processo de extração em banho de ultrassom.

Na condição 11, a extração foi feita em etanol, porém com quantidade reduzida em 50% do volume (100 mL), com valores de massa de microalga semelhantes usadas nas extrações da condição 9. Os resultados mostraram que a redução no volume de etanol, não influenciou de forma significativa nos rendimentos das extrações, devida a proximidade dos resultados.

Observações feitas nos dados cinéticos mostraram que ao longo do tempo os rendimentos obtiveram valores próximos apresentados na condição 9. Os resultados tiveram características positivas com relação à semelhança dos rendimentos quando comparados com a condição 9, isso porque, com a redução de 50% do volume de etanol nas extrações, indica uma economia favorável na quantidade de solvente gasto nos experimentos.

Ao avaliar os rendimentos considerou que os valores obtidos com percentuais significativos, tiveram comportamento positivo quando houve alterações em uma das variáveis. Isso indicou um favorecimento no rendimento de extração. Diante disso foi necessário estudar as extrações com o uso novamente da água

como co-solvente, onde a mesma foi adicionada em 10% (v:v) em etanol, com os resultados e condições apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Condições das extrações em banho de ultrassom do óleo da microalga *Chlorella powder*.

Condição	Método	Solvente	Biomassa (g)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Rendimento em extrato (% m/m)
12	US	Etanol (200mL)	13,4	25-67	120	10,9
13	US	Etanol (200 mL+ H ₂ O (10% v:v))	13,6	25-67	120	14,1

US: ultrassom

As curvas cinéticas representadas na Figura 4.5, foram feitas com a microalga *Chlorella powder*. O motivo da troca de matéria-prima foi devido que a microalga da espécie *Chlorella pyrenoidosa* ter sido esgotada, encontrando assim dificuldades para adquirir novamente a mesma matéria-prima. Diante das dificuldades e a necessidade em continuar os experimentos, optou-se então por continuar os estudos com outra espécie.

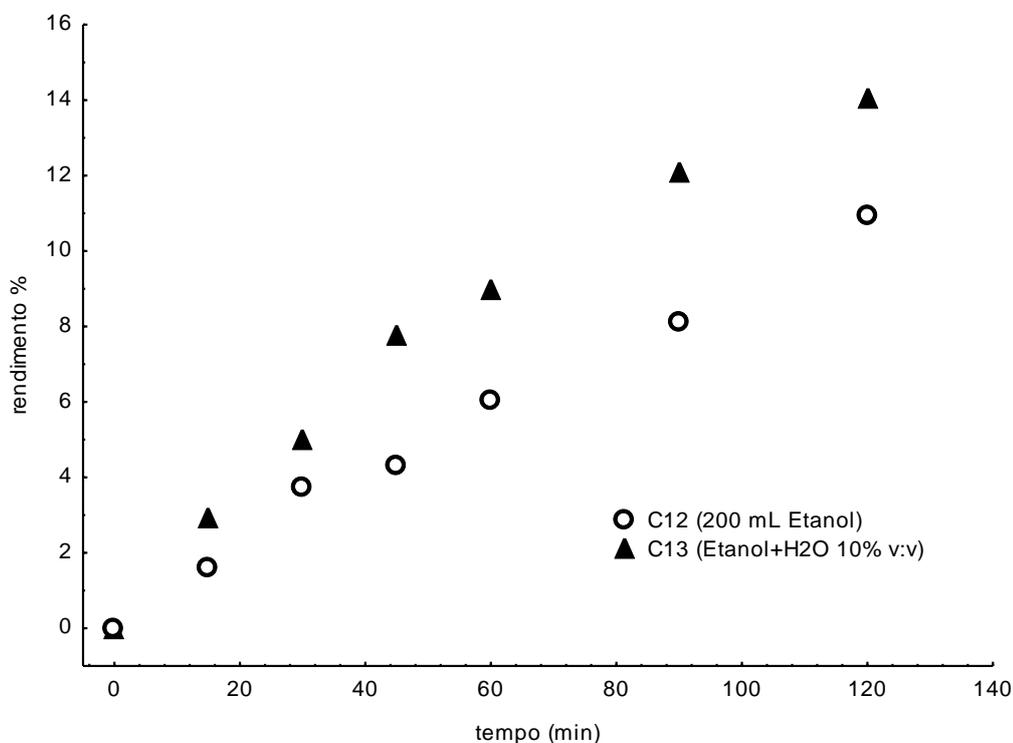


Figura 4.5 - Cinética e comparação entre os valores obtidos para os rendimentos obtidos em etanol e etanol+água 10% (v:v).

Conforme observado na Figura 4.5 quando os 10% (v:v) de água foi adicionado em etanol, os rendimentos aumentaram quando comparados com os rendimentos da condição 12. Entretanto, o único ponto que não houve um aumento significativo no rendimento foi no tempo de 30 minutos para ambas as condições. Nos tempos de 45, 60, 90 e 120 minutos da condição 13 os rendimentos aumentaram em função tempo.

4.2.3 Comparação entre os métodos de extrações.

Considerando os resultados obtidos, e com o objetivo de comparar a eficácia das extrações em leito fixo e com banho de ultrassom frente ao método de extração via Soxhlet, foram feitas então as seguintes observações:

- As extrações sucessivas do material de microalgas por Soxhlet, leito fixo e ultrassom, mostraram que com o aumento da polaridade dos solventes, aumentaram também a capacidade extrativa dos solventes.
- As extrações por leito fixo em etanol e n-hexano apresentaram os menores rendimentos em massa, em todos os ensaios comparados ao ultrassom e o Soxhlet.
- As extrações utilizando o método com banho de ultrassom apresentaram resultados satisfatórios em todos os pontos em etanol e etanol+água (4% e 10% v:v).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO

Para as etapas de caracterização do material advindo das extrações etanólicas e hexânicas, as seguintes quantidades de cinzas e teor de água nos materiais extraídos da *Chlorella pyrenoidosa*, estão apresentadas na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Aspectos dos extratos provenientes da microalga *Chlorella pyrenoidosa* com seus respectivos desvios padrões.

Extrações	Cinzas (%m/m)	Teor de água (%m/m)
Etanol 200 mL US*	2,87 ± 0,9	6,64 ± 0,2
Etanol 100 mL US*	3,18 ± 0,01	6,14 ± 0,3
Etanol+água (4% v:v) US*	3,17 ± 0,1	6,67 ± 0,1
Etanol LF**	3,17 ± 0,1	9,88 ± 0,1
Hexano LF**	3,20 ± 0,2	9,48 ± 0,05

*Ultrassom; **Leito fixo.

Observa-se que o teor de cinzas entre as amostras variou 0,75% motivado talvez pela maior presença de água, o que possibilitaria uma maior transferência de íons da massa bruta para o extrato (óleo). Com relação à quantidade de água nas amostras percebe-se que o material extraído com etanol e etanol+água (4% v:v) pelo método de ultrassom, não apresentaram diferenças significativas, porém quando comparadas com o método de extração de leito fixo, observa-se que os extratos desse método apresentam um aumento na quantidade de água. Este resultado pode ser devido à forma com que as amostras foram secas. As amostras obtidas pelo método de leito fixo foram secas em estufa nos próprios tubos de ensaios em que eram usados nas coletas das alíquotas. Depois de secas, pesadas e feitas às determinações dos rendimentos, as amostras foram solubilizadas novamente em n-hexano para reunir todo o material extraído em um único recipiente, e em seguida levado para outra secagem. Um segundo contato das amostras com solvente depois de secas pode ter influenciado no aumento do teor de água.

Outra característica importante e que deve ser destacada é a cor e textura do material extraído. Em todo material extraído independente do método empregado nas extrações, à cor verde escuro e textura graxa foi predominante. Na Figura 4.7 são imagens tiradas das amostras durante as extrações. Na Figura 4.8 apresenta o aspecto do extrato após a secagem dos solventes.

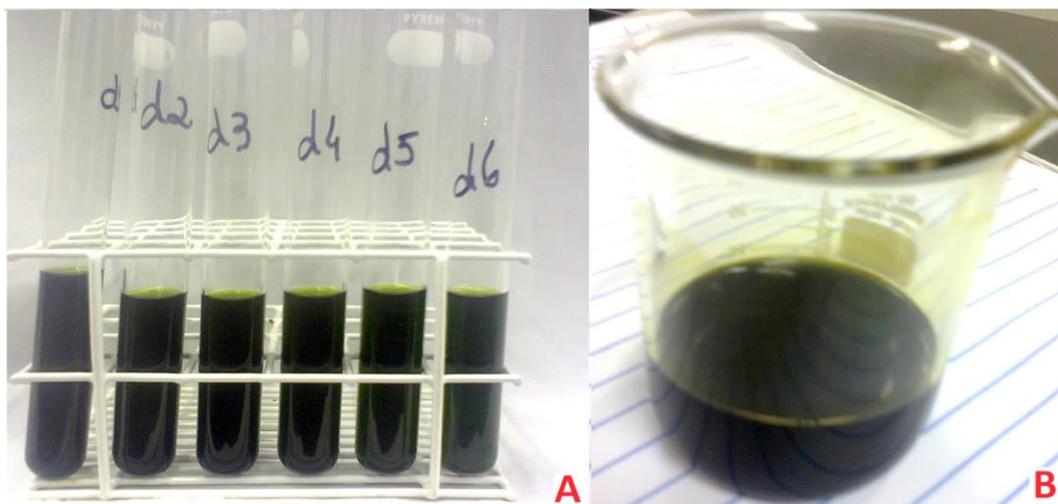


Figura 4.6 - A: alíquotas retiradas durante o processo de extração em leito fixo; B: amostra após a separação da biomassa residual do método em banho de ultrassom.



Figura 4.7 – Extrato da microalga após a secagem dos solventes.

4.3.1 Identificação dos ácidos graxos

Para a identificação dos ácidos graxos nos materiais extraídos, fez-se necessário avaliar o perfil graxo da biomassa usada nos experimentos (*Chlorella pyrenoidosa*) através da esterificação pelo método de Hartman e Lago (modificado) *in situ*, em seguida analisar essa amostra pela metodologia cromatográfica de espectrometria de massa descrita na seção 3.4.1.

Na Figura 4.9 é apresentado o espectrograma onde os tempos de retenções indicam a presença dos ácidos graxos presentes na amostra através dos seus respectivos ésteres metílicos.

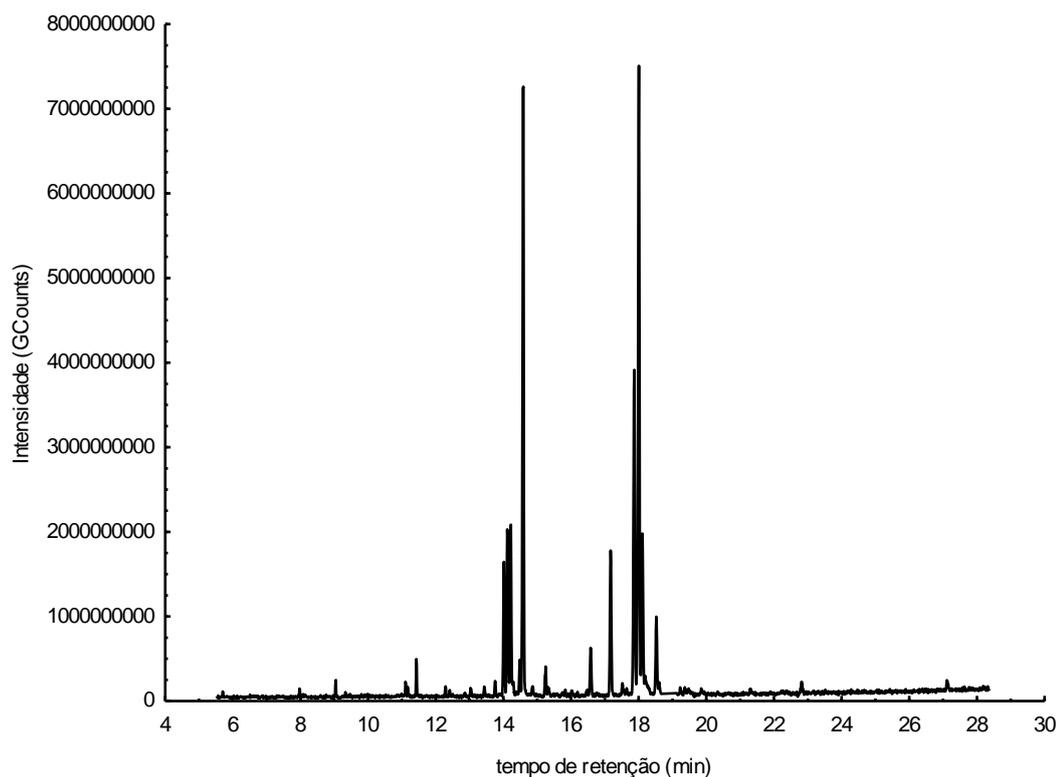


Figura 4.8 - Espectrograma dos ésteres metílicos obtidos da *Chlorella pyrenoidosa* pela esterificação *in situ* através do método de Hartman e Lago (modificado).

Para a identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos da Figura 4.9, os tempos de retenções foram comparados com os espectrogramas do Anexo II. Feita a comparação, foi verificado presença dos ácidos graxos na composição química da biomassa da microalga *Chlorella pyrenoidosa*. Na Tabela 4.6 é apresentado cada componente identificado com seus respectivos nomes e tempo de retenção.

Tabela 4.6 – Representação dos componentes químicos da *Chlorella pyrenoidosa*, esterificação *in situ*, analisados no CG/MS.

Tempo de retenção	Nome dos componentes	Número do Cas
5,701	Éster metílico do ácido 2-butenóico	4358-59-2
7,972	Éster metílico do ácido decanóico	110-42-9
9,049	Éster metílico do ácido dodecanóico	111-82-9
9,330	Hidrocarboneto-desconhecido	-
11,106	Heptadecano	629-78-7
11,165	Éster metílico do ácido tetradecenóico	562-19-06-8
11,427	Éster metílico do ácido tetradecanóico	124-10-7
12,290	Éster-desconhecido	-
12,416	Éster-desconhecido	-
13,028	Octadecanal	638-66-4
13,435	Álcool ramificado-desconhecido	-
14,017	Éster metílico do ácido 7,10-hexadecadienóico	16106-03-9
14,114	Éster metílico do ácido 7,10,13- hexadecatrienóico	56554-30-4
14,221	Éster metílico do ácido 9-hexadecenóico	1120-25-8
14,483	Éster metílico ácido 7-hexadecenóico	56875-67-3
14,590	Éster metílico do ácido hexadecanóico	112-39-0
14,861	Acetal-desconhecido	-
15,250	Lactona-desconhecido	-
16,579	Lactona desconhecido	-
17,171	Óleo essencial-citronelol	-
17,520	Éster metílico do ácido linolênico-gama	333650
17,870	Éster metílico do ácido 9,12-octadecadienóico	2462-85-3
18,005	Éster metílico do ácido 9,12,15-octadecatrienóico	301-00-8
18,103	Éster metílico do ácido 9-octadecenóico	112-62-9
18,520	Éster metílico do ácido octadecanóico	112-61-8
18,607	Éster metílico do ácido 10-octadecenóico	13481-95-3
19,228	Éster metílico do ácido 7,10-octadecadienóico	56554-24-6
19,364	Éster metílico do ácido 9-octadecenóico	112-80-1
19,480	Desconhecido	-
22,819	Éster metílico do ácido eicosanóico	506-30-9
27,109	Éster metílico do ácido tetracosanóico	557-59-5

Na Tabela 4.7 são apresentados os valores percentuais dos principais ácidos graxos em função das respostas obtidas das análises espectrométricas, onde os fatores experimentais para ácidos graxos saturados e insaturados apresentaram um perfil químico comparado com a literatura.

Tabela 4.7 – Constituintes de ácidos graxos da microalga *Chlorella pyrenoidosa in situ* identificados na espectrometria de massas com seus respectivos percentuais.

Ácidos graxos	Dados obtidos no CG/MS (%)	Literatura* (%)
C14:0	0,93	0,75
C16:0	22,16	17,32
C16:n	10,11	18,42
C18:0	3,05	0,99
C18:1	5,84	3,61
C18:2	13,31	18,02
C18:3	31,43	40,91
C20:0	0,54	-

*FONTE: D'OCA *et al.* (2011).

A espectrometria foi utilizada então para identificar os principais componentes constituintes dos extratos, embora a amostra tenha sido de uma única condição e sabendo que diferenças possam existir entre sistemas extrativos. A expectativa foi correlacionar uma técnica de elevado custo e alta especificidade (CG/MS).

As amostras foram injetadas e em seguida foram feitas às normalizações de área nas amostras extraídas sob mesmas condições e concentrações crescentes do padrão FAME 37 mix onde para cada analito foi determinada uma curva de calibração e seus respectivos fatores de respostas para o íon de maior intensidade de fragmentação. Para um melhor entendimento desses espectrogramas, correlacionou-se as massas, seu grau de ligações sigma (sp³ - sp³; sp³ - sp²) e os seus pontos de ebulição ao longo da rampa de aquecimento da coluna onde apresentam as curvas e suas equações que podem ser verificadas no Anexo VI.

A segunda técnica cromatográfica, empregada para caracterizar os extratos utilizou um cromatógrafo a gás conforme descrito nos procedimentos da seção 3.4.1. Depois de esterificadas e derivatizadas as amostras foram injetadas no sistema cromatográfico, com a mesma rampa de aquecimento utilizada no sistema CG/MS e comparadas com os resultados encontrados na coluna VF-5MS do CG/MS. A confirmação veio através da ferramenta matemática de correlação entre os tempos de retenção dos padrões verdadeiros Anexo VI e o espectrograma obtido na amostra (Figura 4.9).

Os principais ácidos graxos saturados e insaturados encontrados nos extratos foram analisados comparando a seletividade obtida entre as duas fases líquidas estacionárias das colunas VF-5MS do CG/MS e a Select Biodiesel do CG-

FID. O conceito de seletividade cromatográfica foi obtida pelo índice de retenção do conceito de Kovats, pelo número de pratos teóricos, pela resolução e a retenção relativa entre picos consecutivos. Esses parâmetros foram empregados para correlacionar às duas colunas na mesma rampa de aquecimento. O procedimento levou a proposição que os ésteres metílicos, principalmente os saturados, agem como uma série homóloga nos seus pontos de ebulição. Como a interpretação e correlação de cada tempo de retenção no CG-FID é relativa e as amostras extraídas apresentavam alto grau de complexidade, empregou então o modelamento para aumentar a precisão da existência de ácidos graxos nas amostras injetadas. O modelo usado é apresentado no Anexo VIII.

Depois de estabelecidos os parâmetros comparando os padrões verdadeiros, foram então realizadas as análises nos extratos. Na Figura 4.10 é apresentado o cromatograma de umas das amostras analisadas, que corresponde ao material extraído pelo método de ultrassom com 200 mL em etanol da microalga *Chlorella pyrenoidosa*, esterificada pelo método de Hartman e Lago (modificado).

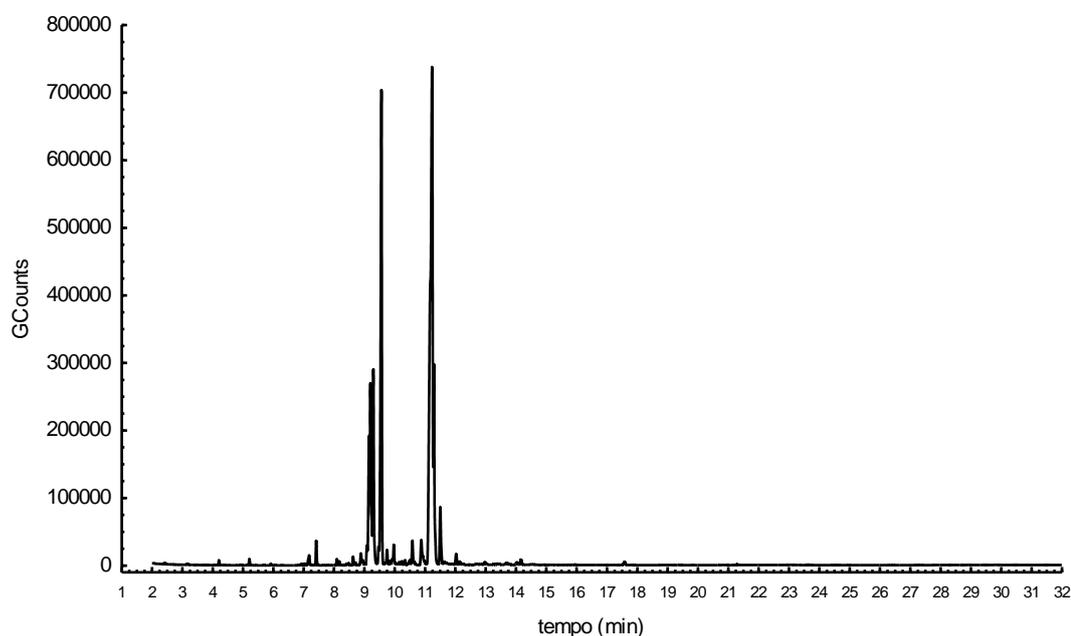


Figura 4.9 – Cromatograma dos ácidos graxos representados na forma de seus ésteres metílicos.

Os picos no cromatograma indicam nos tempos de retenções os seguintes componentes: C14n estão na faixa de 5,915 a 7,181 minutos, C14:0 está na faixa de 7,414 minutos, C16n está na faixa de 8,094 a 9,115 minutos, C16:0 está na faixa de 9,564 minutos, C18:2 está na faixa de 10,584 a 10,879 minutos, C18:3 está na faixa de 11,232 minutos, C18:1 está na faixa de 11,294 minutos, C18:0 esta na faixa de

11,504 minutos, C20:0 está na faixa de 14,167. A sequência dos demais cromatogramas das amostras do material extraído da microalga *Chlorella pyrenoidosa* analisadas pelos métodos em ultrassom (etanol+água 4% (v:v) e 100 mL de etanol) e leito fixo (etanol e n-hexano), encontram-se no Anexo IX.

Com base nas correlações dos tempos de retenções dos cromatogramas obtidos das amostras, na Tabela 4.8 são apresentados os valores percentuais normalizados para os componentes encontrados nos extratos esterificados da *Chlorella pyrenoidosa*.

Tabela 4.8 – Porcentagem em massa seca de ácidos graxos encontrados nas amostras analisadas.

		Ácidos graxos (%)									
Método	Solvente extrator	C14:0	C14:n	C16:0	C16:n	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C18n	C20:0
In situ CG-MS	-	0,93	0,21	22,16	10,11	3,05	5,84	13,31	31,40	2,20	0,54
In situ CG-FID	-	1,14	0,16	23,28	11,50	2,28	6,70	14,85	28,54	2,88	0,37
Ultrassom	Etanol (200 mL)	0,39	2,61	20,35	16,17	2,56	7,75	17,39	28,59	3,36	0,83
Ultrassom	Etanol (100 mL)	0,70	2,81	17,89	20,15	2,23	6,75	19,18	26,48	2,88	0,93
Ultrassom	Etanol+água 4% (v:v)	0,69	2,56	17,88	15,30	2,22	6,84	27,17	24,04	2,38	0,93
Leito fixo	Etanol	0,66	2,68	17,12	20,44	2,51	6,46	19,13	27,32	2,72	0,96
Leito fixo	N-hexano	0,61	4,88	14,19	16,53	2,59	6,41	26,37	24,42	2,90	1,09

A partir dos dados da Tabela 4.8 foi estabelecida a representação da Figura 4.11 dos principais componentes saturados e insaturados do material extraído, visto que os mais extraíveis estão na faixa de C14 - C18 em todos os extratos.

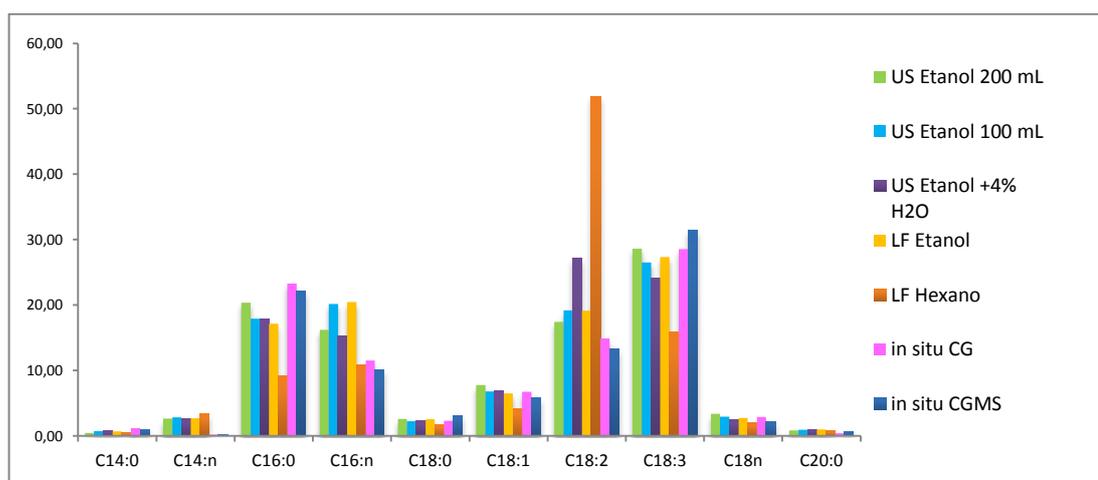


Figura 4.10 – Representação dos percentuais dos teores ácidos graxos, presente nos extratos da microalga *Chlorella pyrenoidosa*.

A presença do ácido graxo C18:3 ácido linolênico, foi encontrado em maior quantidade em todos os métodos (exceto a extração com leito fixo em etanol), onde

a variação foi entre 24,04% a 31,40%. Segundo Cobelas e Lechado (1989) é comum e abundante encontrar em microalgas de espécies verdes, ácidos graxos poliinsaturados. Em quantidades menores foi identificado o C18:2 com variação entre 13,31% a 27,17%, seguido do C18:1 com o percentual com variações entre 5,84% a 7,75%. A importância desses componentes com insaturações para produção de biodiesel torna esse combustível mais favorável a atender a demanda em regiões com baixa temperatura, isso porque as insaturações presente na cadeia do C18 diminuem o ponto de gelificação, ou seja, menor tendência de solidificação do biocombustível (DABDOUB *et al.*, 2009).

Outros ácidos graxos insaturados também foram identificados, como C16:1, C16:2 e C16:3 com o somatório total desses três componentes a variação foi entre 10,11% a 20,44%. Valores ainda menores de ácidos graxos insaturados foram detectados na faixa do C14, onde a variação foi de 0,16% a 4,88%.

Para os ácidos graxos saturados, o ácido esteárico (C18:0) presente nas amostras, apresentou baixas concentrações com variação 2,22% a 3,05%. O ácido palmítico (C16:0) apresentou concentrações com variação entre 14,19% a 23,28%. O ácido mirístico C14:0 expressou concentrações muito baixas em todas as amostras com variação entre 0,39% a 1,14%. Segundo Petkov e Garcia (2007) mesmo alterando as formas de cultivos da *Chlorella pyrenoidosa*, esse ácido corresponde o percentual em torno de 1%.

Os ésteres graxos obtidos a partir de cadeias saturadas C14:0 (mirístico) C16:0 (palmítico) e C18:0 (esteárico) para a produção de biodiesel, são propensos a solidificação em baixas temperaturas, mas isso não elimina a possibilidade do uso desses ésteres de serem utilizados na produção de biodiesel, mas limita seu uso em forma pura ou em misturas maiores que B20 apenas a climas tropicais (LIN, 2009). Em contrapartida eles têm a vantagem de apresentar uma maior estabilidade à auto-oxidação fazendo com que parâmetros de estabilidade à oxidação, sejam atendidos mais facilmente do que no caso da presença majoritária de cadeias insaturadas ou poliinsaturadas. Outra vantagem, que o número de cetano (NC), responsável pela ignição e queima do combustível de forma eficiente, tende a ser maior de acordo com o aumento do grau de saturação do biodiesel (KNOTHE, 2010).

Ácidos graxos com cadeias carbônicas maiores como C20, C22 e C24, não são abundantes em microalgas em espécies de água doce como a *Chlorella pyrenoidosa*. Nessa espécie são pouco evidentes ácidos graxos tanto de cadeias

carbônicas curtas (menores que C14) e cadeias muito longas (acima de C20). Nos resultados apresentados na Tabela 4.6 é observado o baixo valor para o C20:0 onde a variação foi entre 0,35% a 1,09%.

Na Tabela 4.9 podemos considerar a similaridade do perfil químico dos ácidos graxos extraídos da *Chlorella pyrenoidosa* comercial que estão sendo representado tanto pelos métodos de extração testado por D'oca *et al.* (2011) e Li *et al.* (2013).

Tabela 4.9– Tabela do perfil químico dos ácidos graxos da *Chlorella pyrenoidosa*, presentes na literatura

Referências	Método de extração	Ácidos graxos (%)										
		C14:0	C16:0	C16:1	C16:2	C16:3	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C18:4	C20:0
Doca <i>et al.</i> , 2011	AM*/etanol	0,75	17,32	2,39	6,91	9,12	0,99	3,61	18,02	40,91	ND	-
Doca <i>et al.</i> , 2011	US**/etanol	1,09	18,74	2,02	6,31	7,54	4,58	4,63	19,11	36,01	ND	-
Doca <i>et al.</i> , 2011	AM-hexano	0,71	17,6	1,62	6,97	7,42	1,34	4,21	19,77	37,33	3,04	-
Doca <i>et al.</i> , 2011	US-hexano	1,17	16,8	1,73	6,92	8,01	1,52	4,54	20,04	39,27	ND	-
Li <i>et al.</i> , 2011	trans***. <i>in situ</i>	0,68	10,48	0,31	-	-	3,21	70,18	14,53	-	-	0,24

*Agitação Magnética, **Ultrassom, ***Transesterificação.

Os resultados obtidos nas análises quantitativas e qualitativas em todas as amostras do extrato da microalga *Chlorella pyrenoidosa*, evidenciaram que mesmo em condições operacionais diferentes houve uma semelhança no perfil graxo e estão em concordância com a literatura.

4.3.2 Rendimentos em ésteres

Na Tabela 4.8 são apresentados os percentuais de conversão das amostras esterificadas e analisadas no CG-FID, com base nos extratos com valores descontados dos seus respectivos teores de água e cinzas. Diante dos resultados observou que na extração em banho de ultrassom na condição 1 (Tabela 4.10) com 49,02% seguido do método em leito fixo com n-hexano na condição 5 teve o maior rendimento em ésteres graxos, seguido da condição 3 com 45,74%.

Tabela 4.10 - Percentual em ésteres dos extratos provenientes da microalga *Chlorella pyrenoidosa* em diferentes métodos de extração.

Rendimentos em ésteres metílicos				
Condição	Método	Solvente	Massa de extrato (g)	Rendimentos em ésteres %
1	Ultrassom	Etanol (200 mL)	0,10	49,02
2	Ultrassom	Etanol (100 mL)	0,10	19,27
3	Ultrassom	Etanol+água 4% (v:v)	0,10	22,66
4	Leito Fixo	Etanol	0,10	39,22
5	Leito Fixo	N-hexano	0,10	45,74

Estes valores são considerados satisfatórios quando comparado às oleaginosas convencionais, onde apenas a semente que contém entre 18-50 % de óleo, que é destinado ao biodiesel, representa uma pequena fração em relação à planta como um todo (folhas, galhos e semente) (D'OCA *et al.*, 2011) .

Para a determinação de mono-, di- e tri (acilgliceróis) empregou a cromatografia de gel permeação que serviu como base para confirmar a não existência dessas substâncias, visto que a cromatografia a gás indicou a não disponibilidade de desses componentes.

CAPÍTULO 6 – CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

No presente trabalho foram avaliados dois métodos de extrações: o leito fixo com variações nas condições de temperatura e pressão; e extração com ultrassom para o estudo cinético do rendimento de extraíveis. Ambos usaram biomassa de microalgas para as extrações, com os solventes n-hexano, etanol e etanol+água (4% e 10% v:v).

Os resultados obtidos indicaram que o solvente mais apropriado para as extrações foi o etanol, e que vários fatores favoreceram essa escolha, tais como: quantidade de material extraído em menor tempo associado ao método de extração (ultrassom), por não ser tóxico e ser oriundo de fontes renováveis. O etanol também apresentou razões satisfatórias entre massa de material extraído por quantidade de solvente, quando o mesmo foi reduzido metade do seu volume, não diminuindo o seu potencial de extração.

O perfil químico das amostras dos extratos de microalgas obtidos por leito fixo e ultrassom são semelhantes com relação aos constituintes majoritários, tais como ácidos graxos, porém com diferenças nas concentrações dos componentes quando comparados entre os métodos. A polaridade do solvente mostrou ter influencia dominante nos processos de extrações quando se tratou na quantidade de material extraível e cinética de extração. Entretanto percentuais nos rendimentos na conversão de ésteres demonstraram grandes diferenças quando comparados o método de extração e o solvente utilizado.

Os resultados alcançados tanto para rendimento quanto na conversão em ésteres mostraram que, o método com banho de ultrassom foi o que proporcionou os melhores resultados, sendo ainda um método simples, barato e de fácil manuseio.

Propostas para trabalhos futuros:

- Estudo de extração com banho de ultrassom em n-hexano e n-hexano/etanol;

- A retirada de corantes por coluna contendo grânulos de uma resina de troca iônica.
- Aumentar o percentual de conversão em ésteres, testando outros solventes que proporciona melhor seletividade no material extraído em banho de ultrassom.
- Encontrar alternativas de aplicações da biomassa residual, ao invés de ser descartada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.S.C., **American Oil Chemists' Society**, method Ca 11-55, Washington, DC, 1993.

AMARO, H. M.; GUEDES, A. C.; MALCATA, F. X.; Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, p. 3402-3410, 2011.

ANDRICH, G.; NESTI, U.; VENTURI, F.; ZINNAI, A., FIORENTINI, R.; Supercritical fluid extraction of bioactive lipids from the microalga *Nannochloropsis* sp. **European Journal Lipid Science Technology**, p.107, 381–386, 2005.

ANDRICH, G.; ZINNAI, A.; NESTI, U.; VENTURI, F.; FIORENTINI, R.; Supercritical fluid extraction of oil from microalga *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis*. **Acta Aliment Hung**, p.35, 195–203, 2006.

BANERJEE, A., SHARMA, R., CHISTI, Y., BANERJEE, U. C.; *Botryococcus braunii*: A renewable source of hydrocarbons and other chemicals. **Critical Reviews Biotechnology**, p.22, 245, 2002.

BARBOZA, J.C.S.; SERRA, A.A; Ultra-som(l): influência do ultra-som na química. *Química Nova*, 15, 302, 1992.

BASOVA, M.M.; Fatty acid composition of lipids in microalgae. **Journal International on Algae**, p.33, 2005.

BAUMGARDT, F. J. L.; Extração de óleo de microalgas com fluidos pressurizados e avaliação de sua conversão em monoésteres graxos, Tese de mestrado, UFPR-Curitiba, 2013.

BECKER, E. W.; BADDILEY, J. et al.; *Microalgae: biotechnology and microbiology*. **Cambridge University Press**, p.178. Cambridge, New York 1994.

BEHRENS, P. W.; KYLE, D.J.; *Microalgae as a source of fatty acids*. **Journal of Food Lipids**, p.3, 259, 1996.

BIGOGNO, C.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; BOUSSIBA, S.; VONSHAK, A.; COHEN, Z.; Accumulation of Arachidonic Acid-Rich Triacylglycerols in the Microalga *Parietochloris incisa* (Trebuxiophyceae, Chlorophyta). **Phytochemistry**, p.60, 497, 2002.

BIODIESEL STANDARD; Resolução ANP nº 14, **Diário Oficial da União**, Brasil, 2012.

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

BOROWITZKA, M., BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J.; *Em Microalgal Biotechnology*; **Cambridge University Press**: p.257-287, Cambridge, 1998.

BREITBACH, M.; BARTHEN, D.; SCHMIDT-TRAUB, H.; *Ind. Eng. Chem. Res.*, p.5635-5646, 2003.

BREITMAN, C. S.; HSU, J. T.; Microalgae cultivation using photobioreactors for biodiesel production. **Recent Patents on Chemical Engineering**, p.180-194, 2010.

CERTIK, M.; SHIMIZU, S.; Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, p.87, 1999.

CECCHI, H. M.; **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Unicamp, 1999.

CHISTI, Y.; Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, p.126-131, 2008.

CHISTI, Y.; Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, p.25, 294, 2007.

CHRISTIE, W. W.; Lipid analysis. **Pergamon Press**: Oxford, cap.2, 1982.

COBELAS, M. A.; LECHADO, J. Z.; Lipids in microalgae. **Grasas y aceites**, p.40, 118, 1989.

COHEN, Z.; Products from microalgae. In: RICHMOND, A. **CRC Handbook of Microalgal Mass Culture**, p.421-454, 1986.

COONEY, M.; YOUNG, G.; NAGLE, N.; Extraction of bio-oils from microalgae. **Reviews Separation and Purification**, p.38, 291–325, 2009.

COUTO, R. M., SIMOES, P. C., REIS, A., SILVA, T. L. D.; Supercritical fluid extraction of lipids from the heterotrophic microalga *Cryptocodium cohnii*. **Engineer Life Science**, p.10 2010.

CRAVOTTO, G., BOFFA, L., MANTEGNA, S., PEREGO, P.; Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. **Ultrasonic Sonochemistry** p.898–902, 2008.

D'OCA, M. G. M., VIEGAS, C. V., LEMÕES, J. S., MIYASAKI, E. K., MORÓN-VILLARREYES, J. A., PRIMEL, E. G., ABREU, P. C.; Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. **Biomass and Bioenergy**, 2011.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A.; Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v.32, p.776-792, 2009.

DEMIRBAS, A.; Importance of biomass energy sources for Turkey. **Journal Energy Policy**, p.834-842, 2008.

DHYANA B., POTTER, B. A.; Chlorella: the Emerald food. **Book I The Chlorella Story**, 1984.

DOUCHA, J., LIVANSKÝ, K.; Influence of processing parameters on disintegration of Chlorella cells in various types of homogenizers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p.431–440, 2008.

FAJARDO, A. R., CERDA'N, L. E., MEDINA, A. R., FERNANDEZ, F. G. A., et al.; Lipid extraction from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **European Journal Lipid Science Technology**. p.120–126, 2007.

FERRARI, R.A.; OLIVEIRA, V.; SCABIO, A.; Biodiesel de Soja – Taxa de Conversão em Ésteres Etilícos, Caracterização Físico-Química e Consumo em Gerador de Energia. **Química Nova** vol. 28 nº 1, 2005.

FERREIRA, F. M.; Equilíbrio de Fases em Altas Pressões do Ácido Láurico e Metanol em CO₂. **Dissertação de mestrado** – PPGEQ – UFPR, 2010.

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

FRANCO, A. L. C.; LÔBO, I.P. E CRUZ, R.S.; Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, vol. 36, nº3, 2013.

FUA, C. C.; HUNGB, T.C.; CHENA, J.Y.; SUC, C.H.; WU, W.T.; Hydrolysis of microalgae cell walls for production of reducing sugar and lipid extraction, **Bioresource Technology**, p.22- 29, 2010.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H.; Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. **Journal Bioscience and Bioengineering**, p.405, 2001.

GALLOWAY, J. A.; KOESTER, K. J.; PAASCH, B. J.; MACOSKO, C. W.; Effect of sample size on solvent extraction for detecting cocontinuity in polymer blends. **Polymer Engineering e Science**, p.423– 428, 2004.

GOMES, C.; Extração aquosa enzimática de óleo de soja. **Embrapa**. Disponível em:<www.cnpso.embrapa.br/imprcon.htm> Acesso em: 15/12/2012.

GREENWELL, H. C., LAURENS, L. M. L., SHIELDS, R. J., LOVITT, R. W., FLYNN, K. J.; Placing microalgae on the biofuels priority list: A review of the technological challenges. **Journal of the Royal Society Interface**, p.703–726, 2010.

GUIL-GUERRERO, J. L., BELARBI, E. I. H., REBOLLOSO-FUENTES, M. M.; Eicosapentaenoic and arachidonic acids purification from the red microalga *Porphyridium cruentum*. **Journal Bioseparation**, p.299–306, 2000.

HANSON, S. W. F.; OLLEY, J.; Application of the Bligh & Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates **Journal Biochemistry**, p.89, 101, 1963.

HARUN, R.; SINGH, M.; FORDE, G. M.; DANQUAH, M. K.; Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable e Sustainable. Energy Reviews**, p.1037–1047, 2010.

HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBANEZ, E.; Pressurized liquid extracts from *Spirulina platensis* microalga: Determination of their antioxidant activity and preliminary analysis by micellar electrokinetic chromatography. **Journal Chromatography**, p.195–203, 2004.

HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBANEZ, E.; Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: **Journal Food Chemistry**, p.136–148, 2006.

HOLE, M.; TAYLOR, K. D. A.; Methods of extraction composition and stability of vitamin A and other components in dogfish (*Squalus acanthias*) liver oil. **Journal of Food Chemistry**, p.215, 1996.

HU, Q.; ZHANG, C. W.; SOMMERFELD, M.; Biodiesel from Algae: **Annual Meeting of the Phycological Society of America**, 2006.

IVERSON, S. J.; LANG, S. L. C.; Cooper, M. H.; Comparison of the Bligh & Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. **Lipids**, p.1283, 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ; Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 98

KNOTHE, G. J.; MUEHLER, C.J.; FISCHER, B. T.; Liquid-Phase Penetration under Unsteady In-Cylinder Conditions: Soy and Cuphea-Derived Biodiesel Fuels Versus Conventional Diesel. **Journal American Oil Chemical**, p.823, 2010.

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

LIN, L.; YING, D.; CHAITEP, S.; VITTAYAPADUNG, S.; Biodiesel production from crude rice bran oil and properties as fuel. **Applied Energy**, p.681, 2009.

LI, P.; MIAO, X.; LI, R.; ZHONG, J.; In Situ Biodiesel Production from Fast-Growing and High Oil Content *Chlorella pyrenoidosa* in Rice Straw Hydrolysate. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p.8, 2011.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; GARCÍA-AYUSO, L. E.; Where is supercritical fluid extraction going? **Analytical Chemistry**, p.369, 1998.

LUQUE-GARCÍA, J.L.; LUQUE DE CASTRO, M. D.; Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, 2003.

MA, F.; HANNA, M.A.; Biodiesel of Production, **Bioresource Technology**, p.1-15, 1999.

MACIAS-SANCHEZ, M. D., MANTELL, C., RODRIGUEZ, M., OSSA, E. MDL., et al.; Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Nannochloropsis gaditana*. **Journal of Food Engineering**,. p.245–251, 2005.

MANSANO, E.; Extração (<http://emersonam.tripod.com/extracao.html>) Acessado em 20/01/2013.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F.; Possible methods for biodiesel production. **Renewable e Sustainable Energy Reviews**, p.1300, 2007.

MARTÍN, M. A.; BERRIOS, M.; SILES, J.; MARTÍN, A.; A kinetic study of the esterification of free fatty acids (FFA) in sunflower oil. **Fuel**, p.2383, 2007.

MARTIN, P. D.; **Sonochemistry in industry**. Progress and prospects. Chemistry Ind-London, p.233–236, 1993.

MATA, T. M.; MARTINS, A.; CAETANO, N. S.; Microalgae for biodiesel production and other applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, p.217, 2010.

MENDES, R. L., NOBRE, B. P., CARDOSO, M. T., PEREIRA, A. P.; Palavra, A. F.; Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. **Inorgarnica Chimica Acta** p.328–334, 2003.

MENDES, R. L.; REIS, A. D.; Palavra, A. F.; Supercritical CO₂ extraction of g-linolenic acid and other lipids from *Arthrospira (Spirulina) maxima*: Comparison with organic solvent extraction. **Journal of Food Chemistry**, p.57–63, 2006.

MENDES, R. L.; REIS, A. D.; PEREIRA, A. P.; CARDOSO, M. T. et al.; Supercritical CO₂ extraction of g-linolenic acid (GLA) from the cyanobacterium *Arthrospira (Spirulina) maxima*: Experiments and modeling. **Journal of Chemistry Engineer**, p.147– 151, 2005.

MENDIOLA, J. A.; JAIME, L.; SANTOYO, S.; REGLERO, G. et al.; Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*. **Journal of Food Chemistry** p.1357–1367, 2007.

MENEZES R. S., LELES, M. I. G., SOARES, A. T., FRANCO, P. B. M., ANTONIOSI FILHO, N. R., SANT'ANNA C.L., VIEIRA, A. A. H.; Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, vol.36, p.10-15, 2013.

MENG, X; YANG, J.; XU, X; ZHANG, L; NIE, Q.; XIAN, M.; Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, p.341, 2009.

MERCER, P.; ARMENTA, R. E.; Developments in oil extraction from microalgae. **European Journal Lipid Science Technology** p.539–547, 2011.

MIAO, X.; WU, Q.; Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Department of Biological Sciences and Biotechnology**, p.841, 2006.

MOHEIMANI, N. R.; The culture of Coccolithophorid Algae for carbon dioxide bioremediation. 252f. **PhD thesis**. Murdoch University, Perth, Australia, 2005.

MOLINA G. et al.; Downstream processing of cellmass and products. In: RICHMOND, A.; **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, p.215-251, 2004.

MOLINA, G. E.; MEDINA, R. A.; GIMÉNEZ, G. A.; Recovery of algal PUFAs. In: Cohen, Z. **Chemicals from microalgae**, London, 1999.

MOZAJSKA, H. G.; BROWSKI. L.; NAMIESNIK, J.; Critical Reviews. **Analytical Chemistry**, p.149-165, 2001.

NELSON, J. G.; Em Analyses of fats, oils and lipoproteins; Perkins, E. G., ed.; **American Oil Chemists' Society**: Champaign, cap. 2, 1991.

OHLROGGE, J.; BROWSE, J.; Lipid biosynthesis. **The Plant Cell**, p.957, 1995.

OILGAE- <http://www.oilgae.com>. Acessada 08/02/2013.

ORATA, F.; Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Advanced Gas Chromatography – **Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications**, p. 93, 2012.

PAWLISZYN, J.; Kinetic model of supercritical fluid extraction. **Journal Chromatography Science** p.31–37, 1993.

PÉREZ, Homero E. B. Biodiesel de Microalgas, **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN**, p.1 - 19, 2007.

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

POPOOLA, T. O. S., YANGOMODOU, O. D., Extraction, properties and utilization potentials of cassava seed oil. **Biotechnology** p.38–41, 2006.

QIUL, J.; FAN, X.; ZOU, H.; Development of biodiesel from inedible feedstock through various production processes. **Chemistry Technology Fuels Oils**, p.102. 2011.

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

RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. **Blackwell Science**, 2004.

SAHENA, F., ZAIDUL, I. S. M., JINAP, S., KARIM, A. A., et al.; Application of supercritical CO₂ in lipid extraction. **Journal of Food Engineering** p.240–253, 2009.

SHEN, Y., PEI, Z., YUAN, W., MAO, E.; Effect of nitrogen and extraction method on algae lipid yield. **International Journal Agricultural and Biological Engineering**, p.230-241, 2009.

SMEDES, F.; ASKLAND, T. K.; Revisiting the development of the Bligh and Dyer total lipid determination method. **Journal Mar Pallut bull.** p.193, 1999.

TEIXEIRA, C. M.; MORALES, M. E.; Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel. **Instituto Nacional de Tecnologia**. Rio de Janeiro, 2011.

THEHERBPROF - <http://www.theherbprof.com/hrbChlorella.htm>. Acessada 08/02/2013.

THOE, T. B.; ASPINWALL, D. K.; WISE, M. L. H.; Review on ultrasonic machining. **International Journal of Machine Tools and Manufacture**, p. 239-255, 1998.

TRAN, H. L., HONG, S.-J., LEE, C.G.; Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from *Botryococcus braunii* LB 572 and *Synechocystis* sp. **Biotechnololy Bioprocess Engineering** p.187–192, 2009.

UNDELAND, I.; HÄRRÖD, M.; LINGNERT, H.; Comparison between methods using low-toxicity solvents for the extraction of lipids from herring. **Journal Food Chemistry** p.355, 1998.

VAN DEN HOEK, C.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M.; Algal: An Introduction to Phycology. **Cambridge University Press**: Cambridge, 1995.

WEI, F.; GAO, G.-Z.; WANG, X.-F.; DONG, X.-Y.; et al.; Quantitative determination of oil content in small quantity of oilseed rape by ultrasound-assisted extraction combined with gas chromatography. **Ultrasonic Sonochemistry** p.938–942, 2008.

WIDJAJA, A.; CHIEN, C.; JU, Y.; Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. **Chemistry Engineer**, p.13–20, 2009.

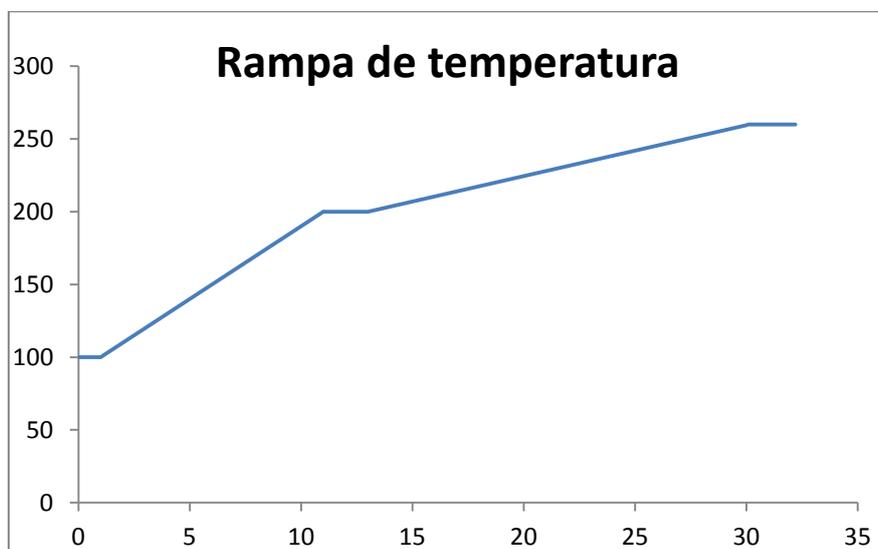
XU, H.; MIAO, X.; WU, Q.; J.; High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Department of Biological Science and Biotechnology**, p.499, 2006.

XU, X., GAO, Y., LIU, G., WANG, Q., ZHAO, J.; Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of sea buckthorn (*Hippophae thamnoides* L.) oil using response surface methodology. **Food Science Technology**, p.1223–1231, 2008.

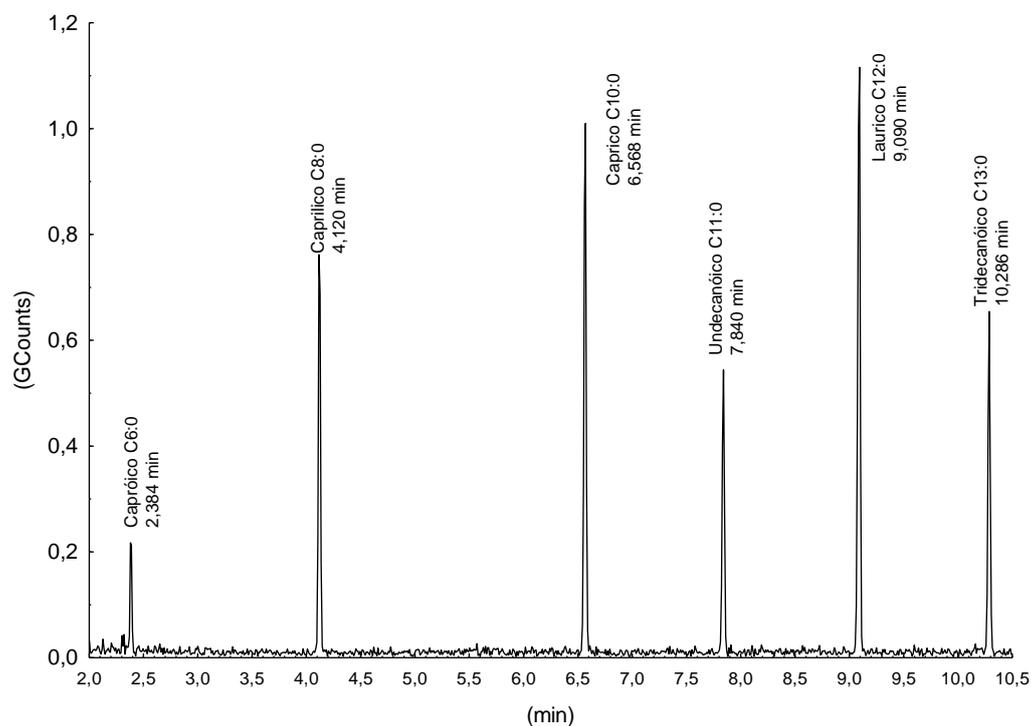
ZHU, M., ZHOU, P. P., YU, L. J.; Extraction of lipids from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids. **Bioresource Technology**, p.93–95, 2002.

ANEXOS

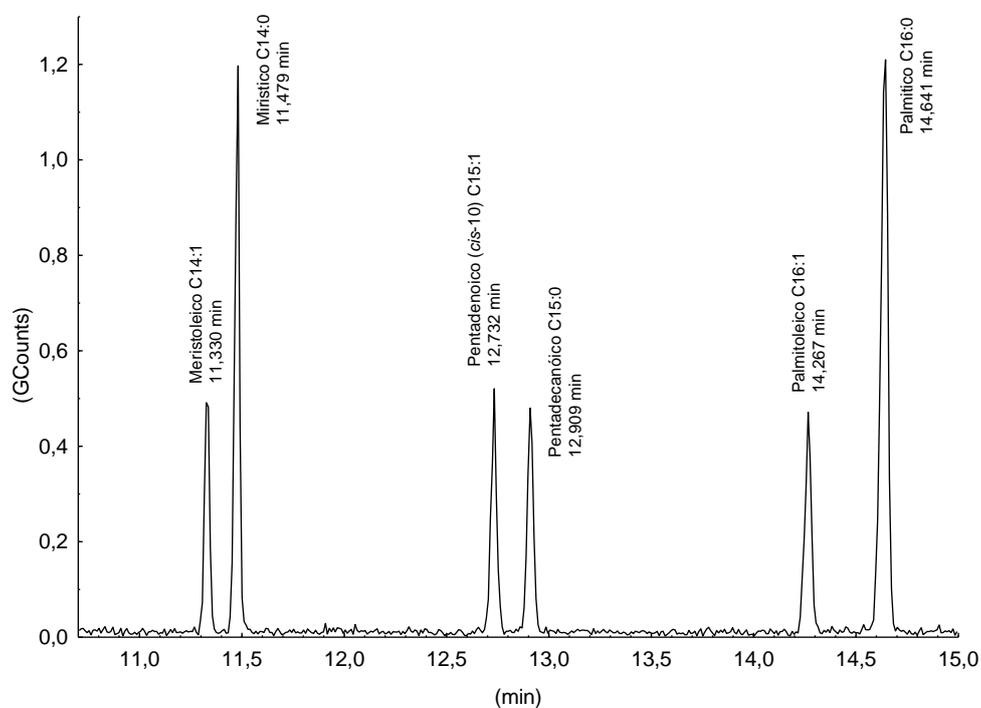
Anexo I: A rampa com a curva de aquecimento da coluna.



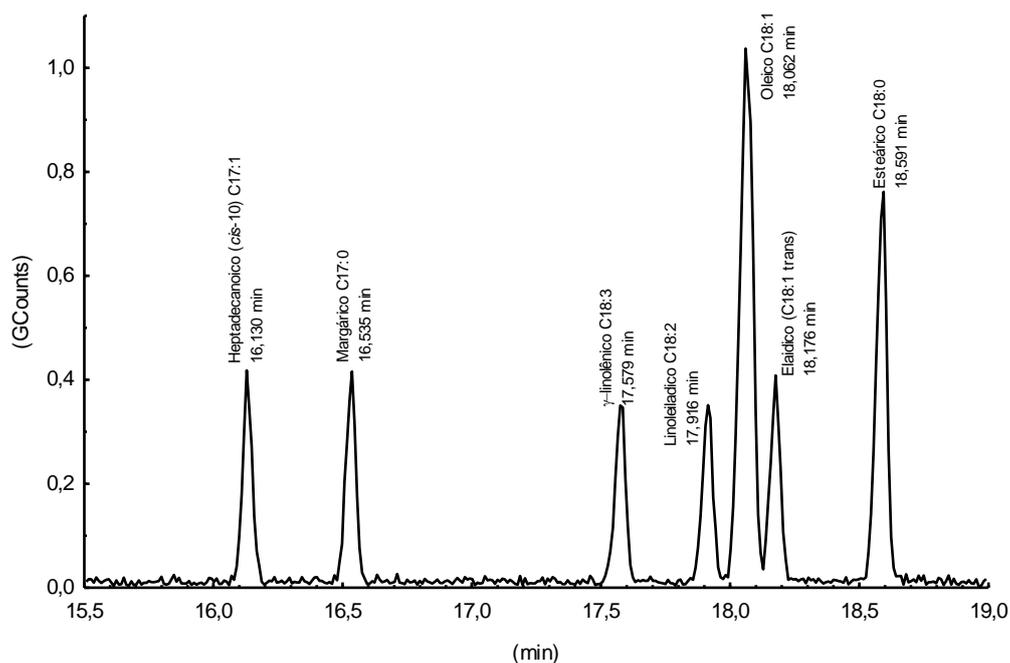
Anexo II: Espectogramas representativos dos ésteres metílicos obtido por CG/MS.



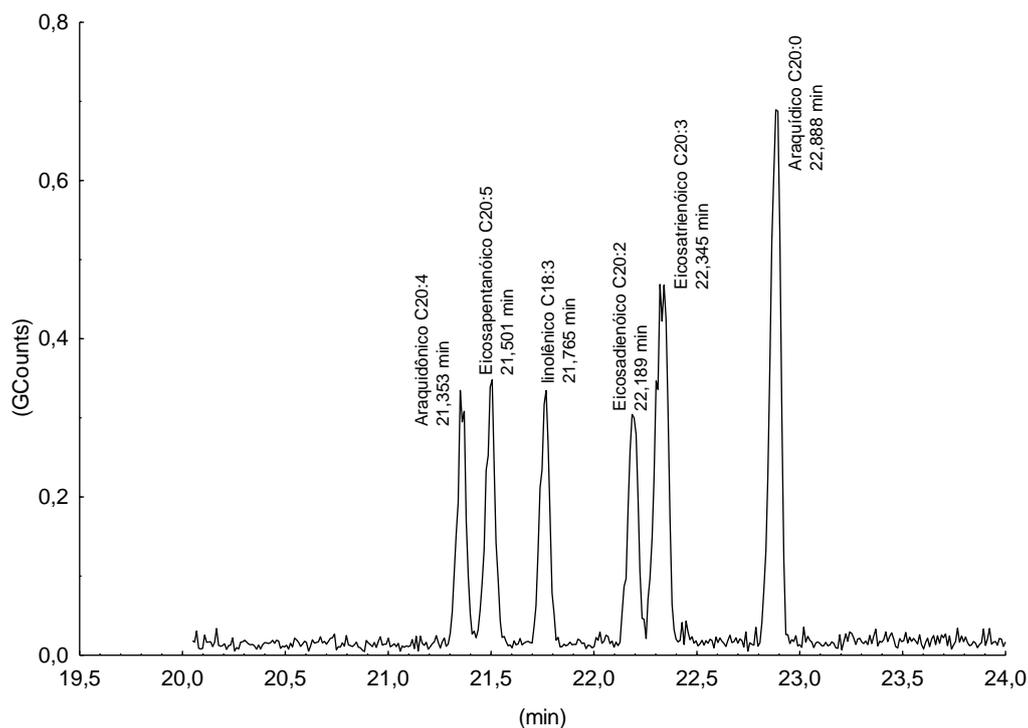
Espectrograma dos ácidos graxos representados na forma de seus ésteres metílicos no tempo retenção de 2-10 minutos.



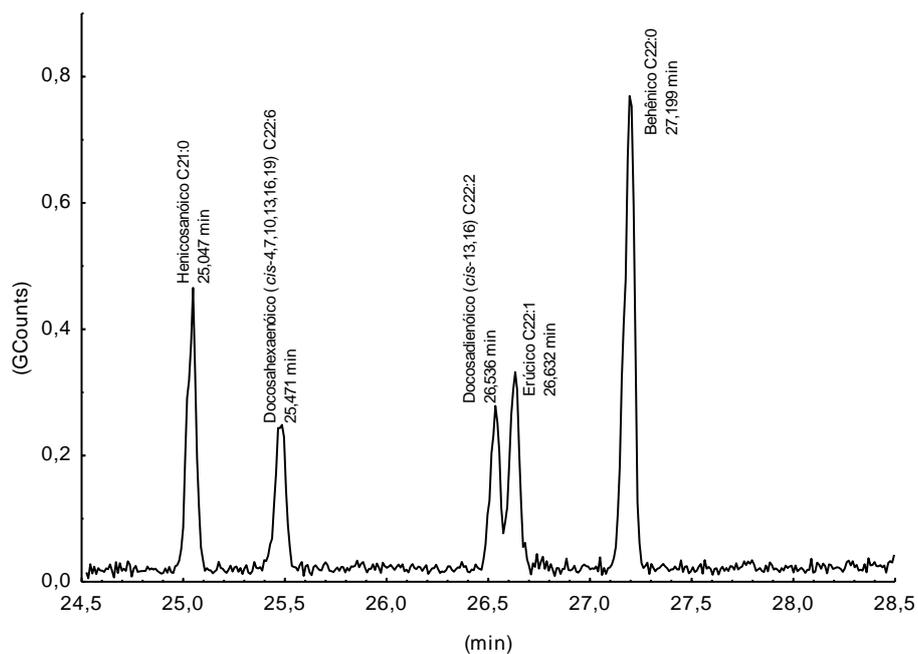
Espectrograma dos ácidos graxos representados na forma de seus ésteres metílicos no tempo retenção de 11-15 minutos.



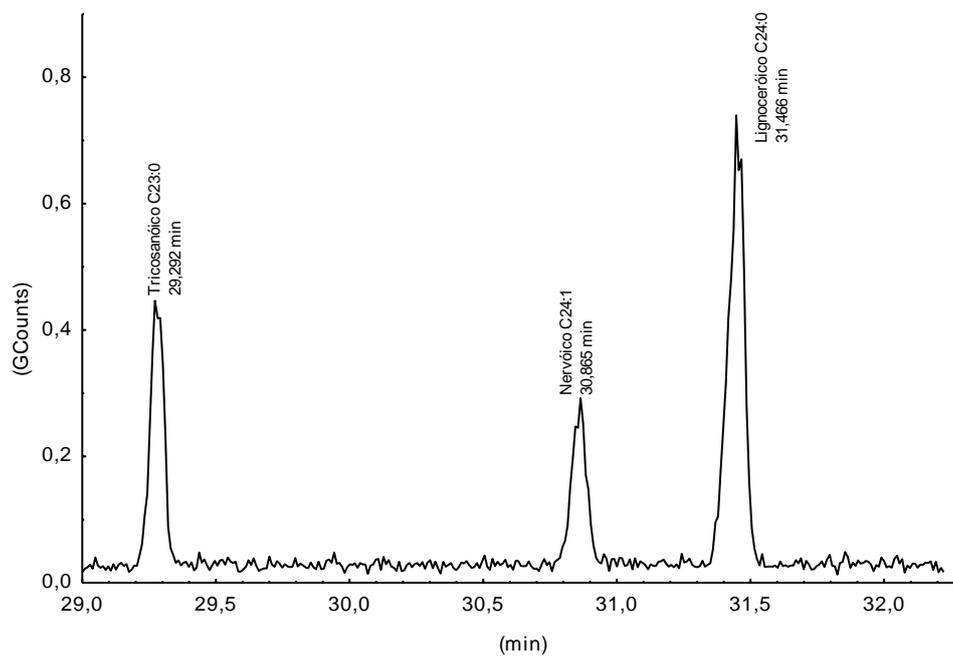
Espectrograma dos ácidos graxos representados na forma de seus ésteres metílicos no tempo retenção de 15,5-19 minutos.



Espectrograma dos ácidos graxos representados na forma de seus ésteres metílicos no tempo retenção de 19,5-24 minutos.



Espectrograma dos ácidos graxos representados na forma de seus ésteres metílicos no tempo retenção de 24,5-28,5 minutos.

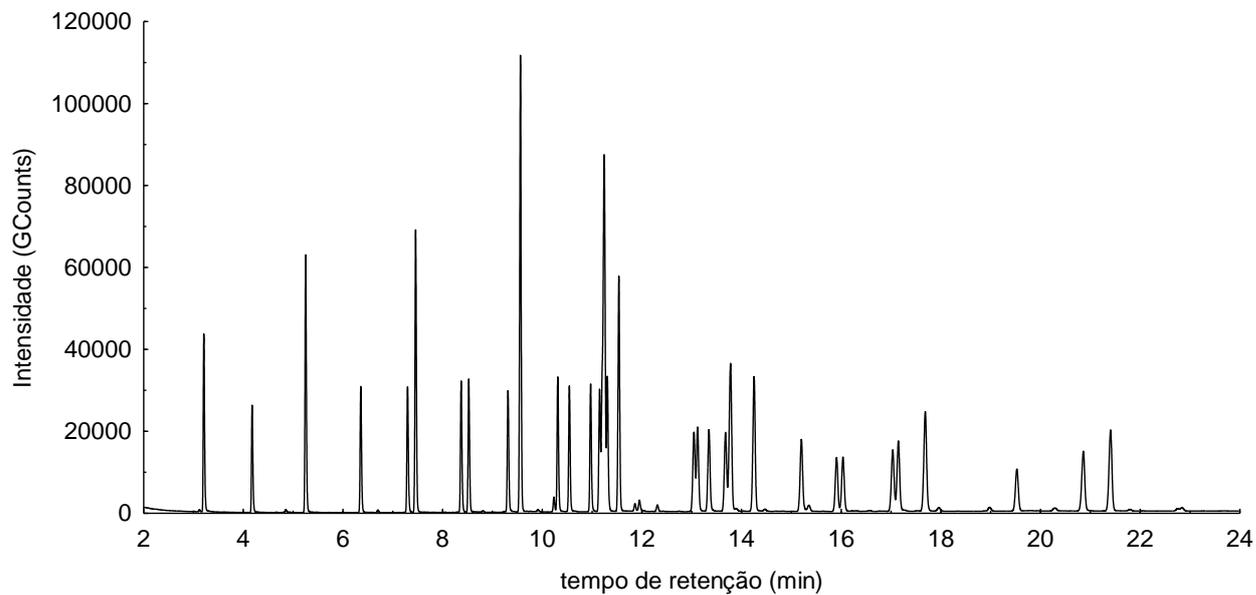


Espectrograma dos ácidos graxos representados na forma de seus ésteres metílicos no tempo retenção de 29-32 minutos.

Anexo III: Tabela dos componentes químicos do Supelco (Fame 37 mix) injetados no CG/MS

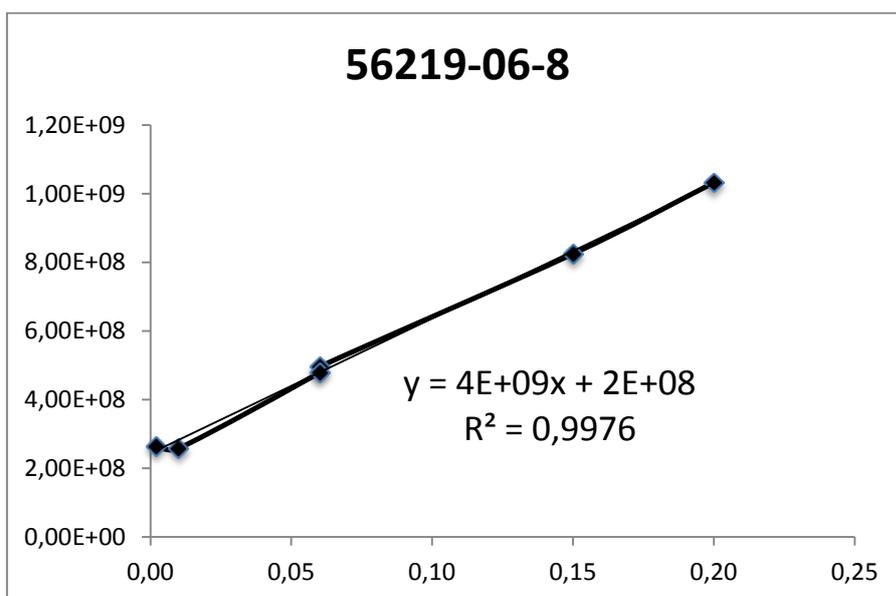
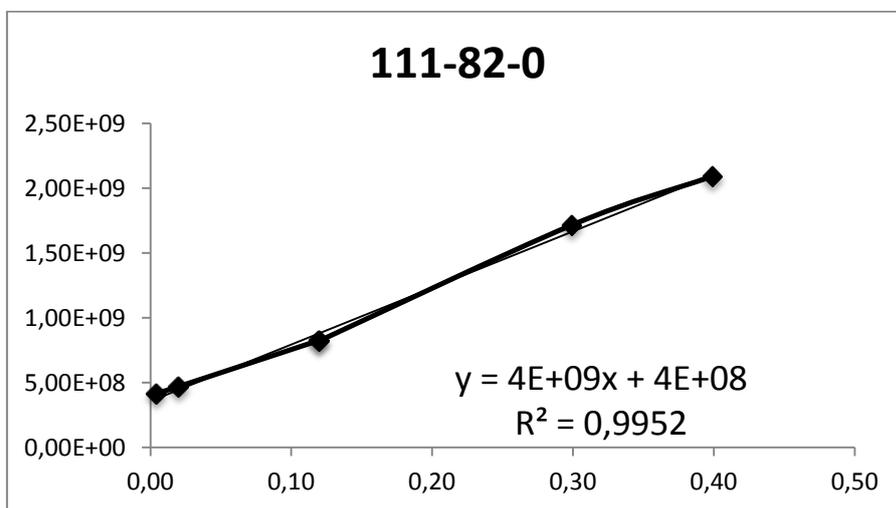
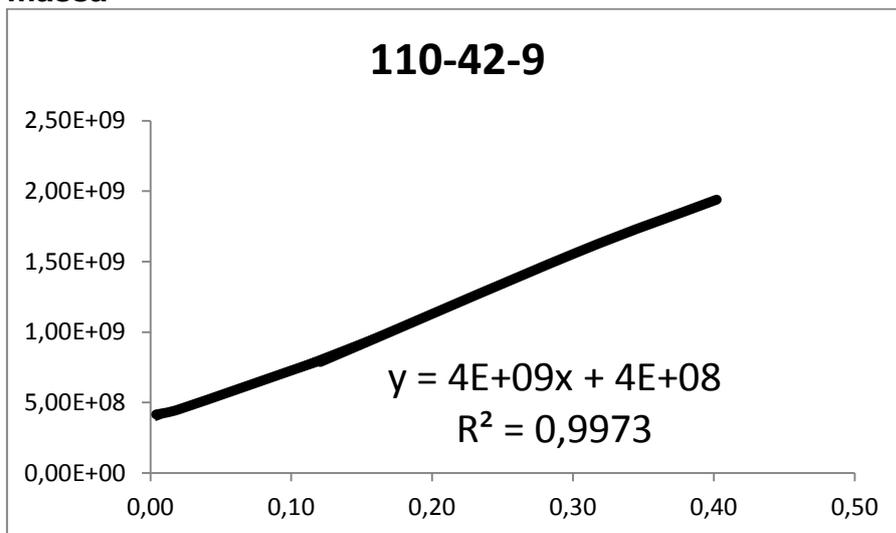
	Nome químico do éster metílico do ácido graxo (nome comum)	CAS (NIST)	Tempo de retenção	Íon quant	Íons Identificação					
1	Ácido hexanóico (caprótico)	106-70-7	2,37	74	87	43	59	99	55	
2	Ácido octanóico (caprilico)	111-11-5	4,120	74	87	43	41	55	57	
3	Ácido decanóico (caprico)	110-42-9	6,568	74	87	55	43	143	155	
4	Ácido undecanóico éster metílico	1731-86-8	7,840	74	87	55	43	143	157	
5	Ácido dodecanóico (laúrico)	111-82-0	9,090	74	87	41	43	55	171	
6	Ácido tridecanóico	1731-88-0	10,286	74	87	43	55	143	197	
7	Ácido 9-tetradecenóico (miristoleico)	56219-06-8	11,330	55	74	69	41	87	96	
8	Ácido tetradecanóico (mirístico)	124-10-7	11,479	74	87	55	43	143	199	
9	Ácido cis-10-pentadecenoico	84743-28-3	12,732	55	41	74	87	97	57	
10	Ácido n-pentadecanóico	7132-64-1	12,909	74	87	43	55	143	213	
11	Ácido 9-hexadecenóico (pamitoleico)	1120-25-8	14,267	55	69	74	41	83	110	
12	Ácido n-hexadecanóico (palmítico)	112-39-0	14,641	74	87	43	55	143	227	
13	Ácido cis-10-heptadecenoico	333621	16,130	55	69	74	40	83	110	
14	Ácido heptadecanóico	1731-92-6	16,537	74	87	41	43	75	241	
15	Ácido γ -linolênico	16326-32-2	17,579	79	67	150	93	81	91	
16	Ácido linolaídico	256697-4	17,916	68	57	145	79	149	205	
17	Ácido 9-octadecenóico (oleico)	112-62-9	18,062	55	69	74	41	95	43	
18	Ácido 9-octadecenóico/trans-9 (elaídico)	1937-62-8	18,176	55	69	74	83	41	123	
19	Ácido octadecanoico (esteárico)	112-61-8	18,591	74	87	43	55	143	255	
20	Ácido 5,8,11,14 –eicosatetraenóico (Araquidônico)	2566-89-4	21,353	80	91	79	67	105	81	
21	Ácido cis-5,8,11,14,17 – eicosapentenóico,	2734-47-6	21,501	79	91	67	41	119	148	
22	Ácido 9,12,15-octadecatrienóico (linolênico)	301-00-8	21,765	79	67	95	108	150	92	
23	Ácido cis-11,14 – eicosadienóico	2463027	22,189	67	69	54	82	95	124	
24	Ácido cis-8,11,14 - eicosatrienóico	21061-10-9	22,345	43	55	69	83	57	98	
25	Ácido eicosanóico (araquídico)	1120-28-1	22,888	74	87	43	55	75	143	
26	Ácido eicosanóico	6064-90-0	25,047	74	87	43	55	143	297	
27	Ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexanóico	2566-90-7	25,471	79	91	41	105	119	131	
28	Ácido cis-13,16-docosadienóico	333603	26,536	67	41	95	109	81	354	
29	Ácido 13-docosenóico (erúxico)	1120-34-9	26,632	55	41	43	69	97	320	
30	Ácido docosanóico (behênico)	929-77-1	27,199	74	87	43	55	41	354	
31	Ácidotricosanóico	2433-97-8	29,275	74	87	43	75	143	368	
32	Ácido 15-tertracosenóico (nervoico)	2733-88-2	30,865	55	348	41	74	83	43	
33	Ácido tetracosanóico (lignocérico)	2442-49-1	31,466	74	87	43	75	57	143	

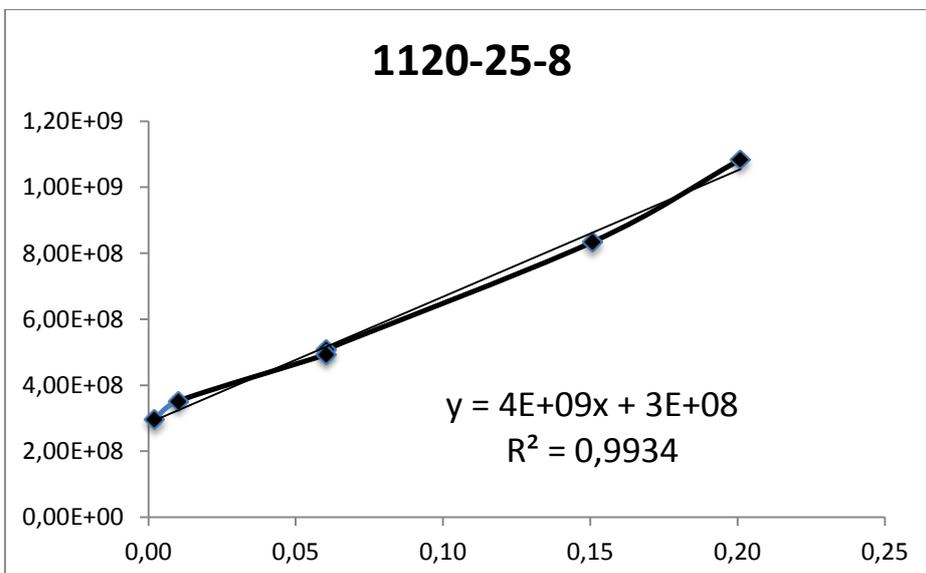
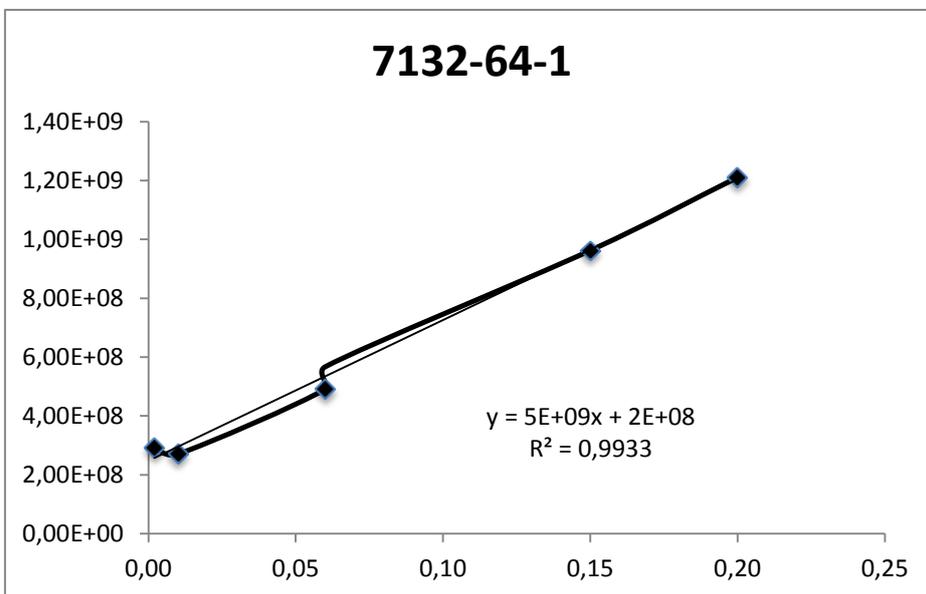
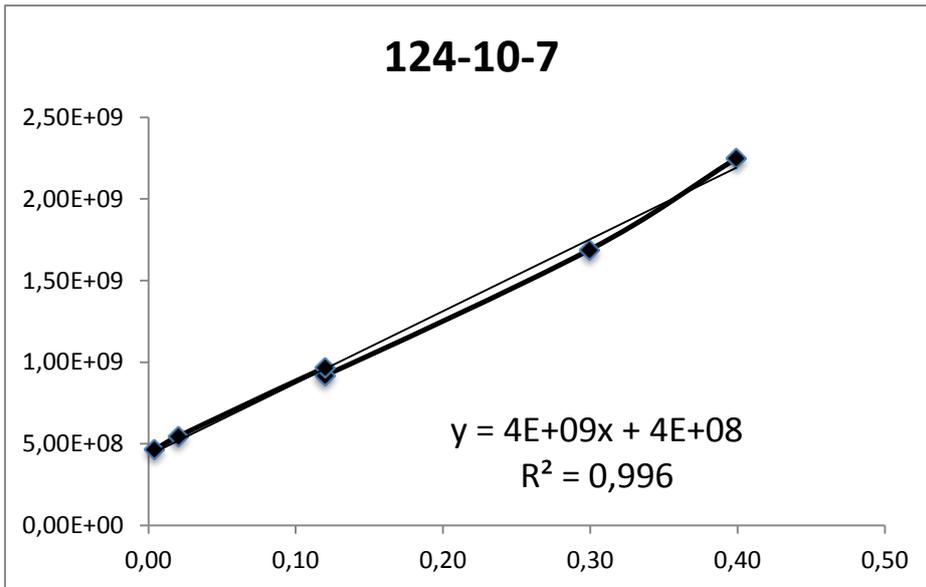
Anexo IV: Cromatograma padrão Supelco (FAME 37 mix), ésteres metílicos de ácidos graxos no tempo de 2-24 minutos injetados no CG.

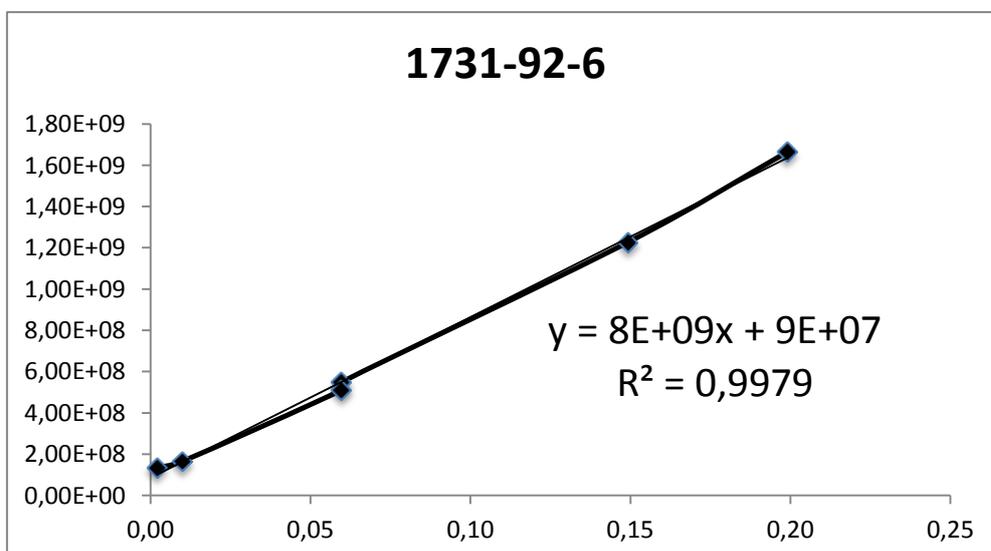
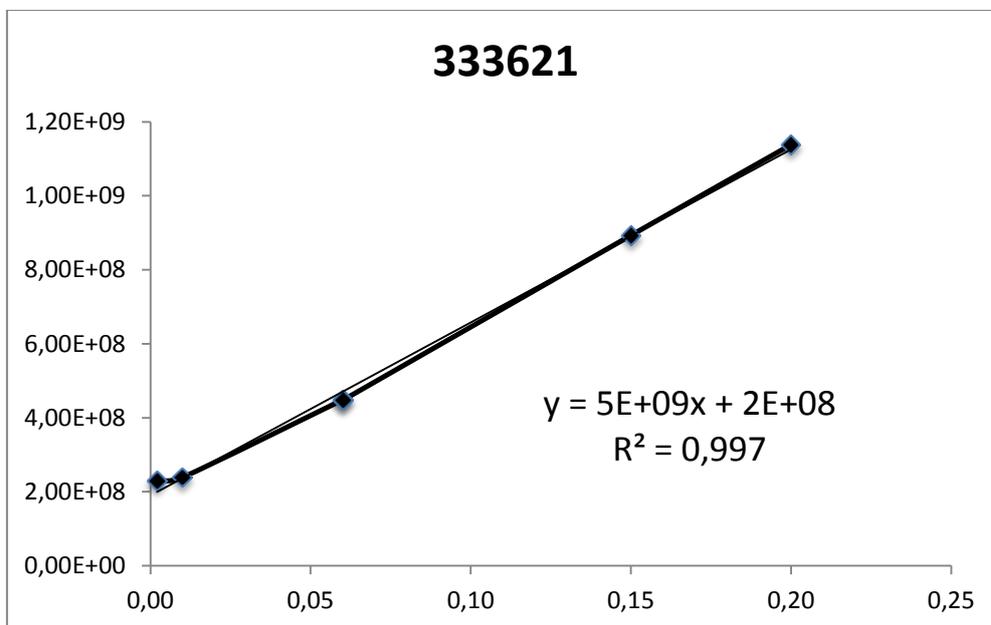
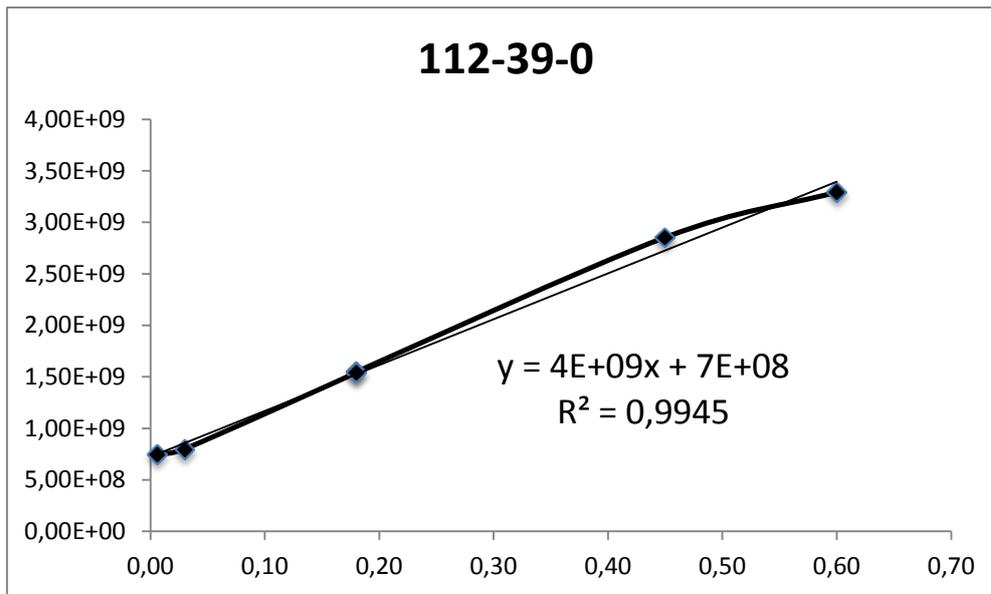


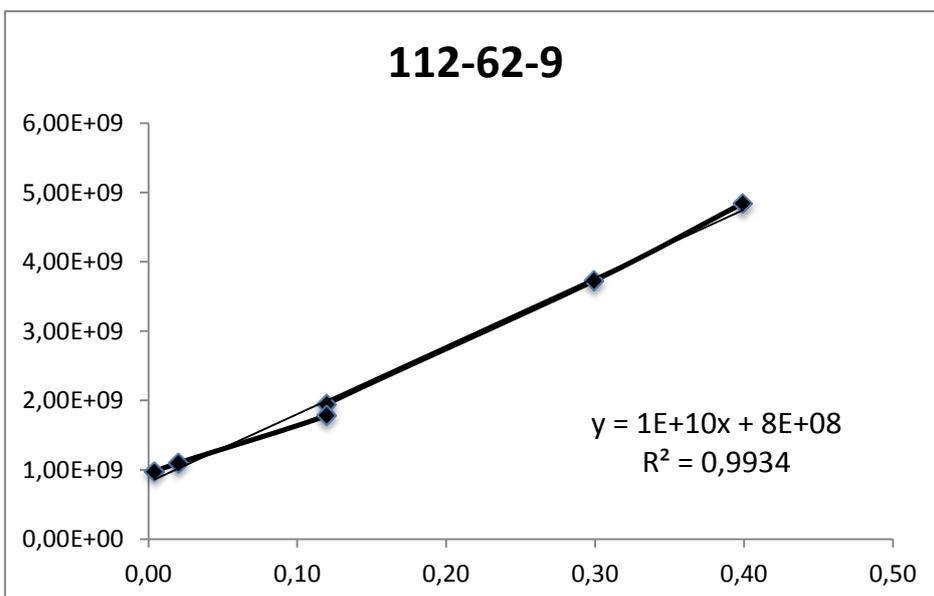
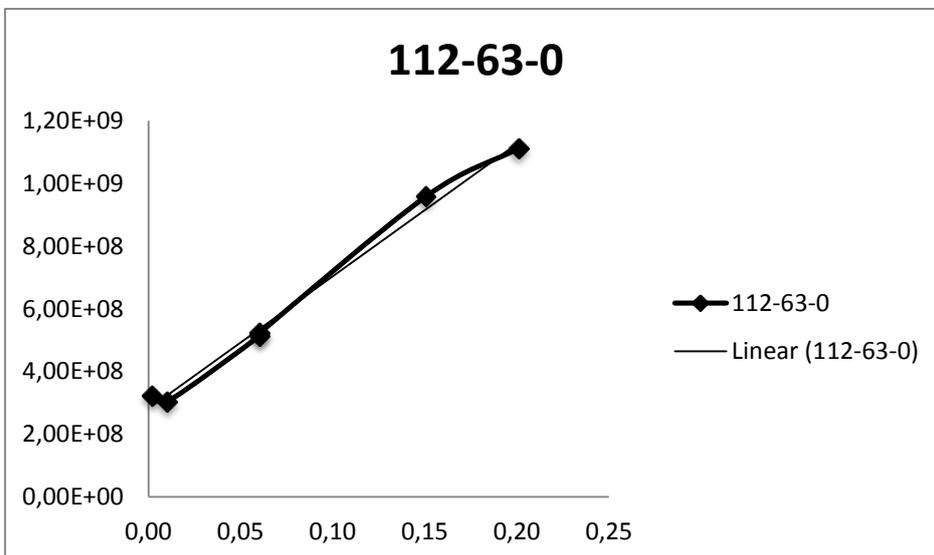
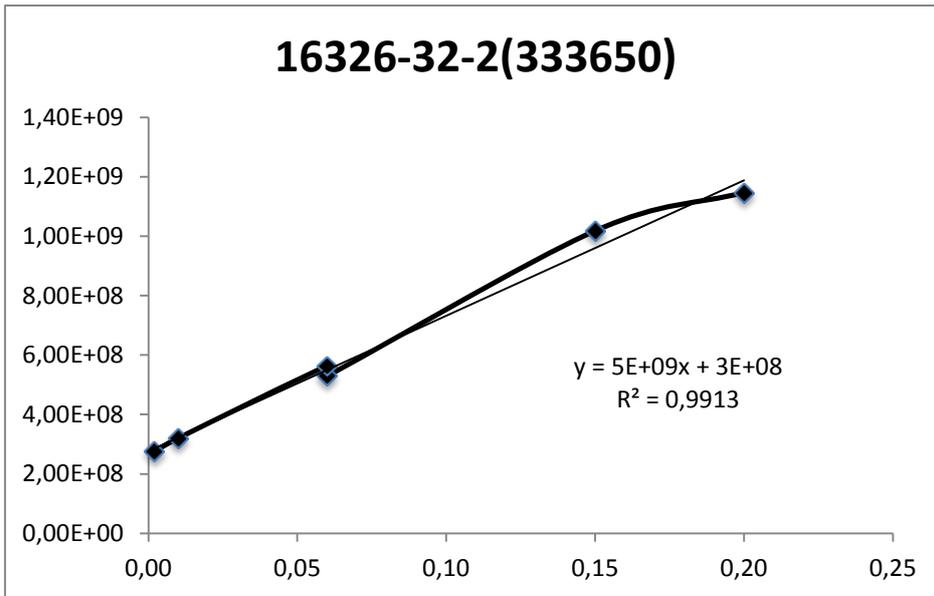
Anexo V: Relação dos componentes químicos do FAME 37 mix injetados no CG.

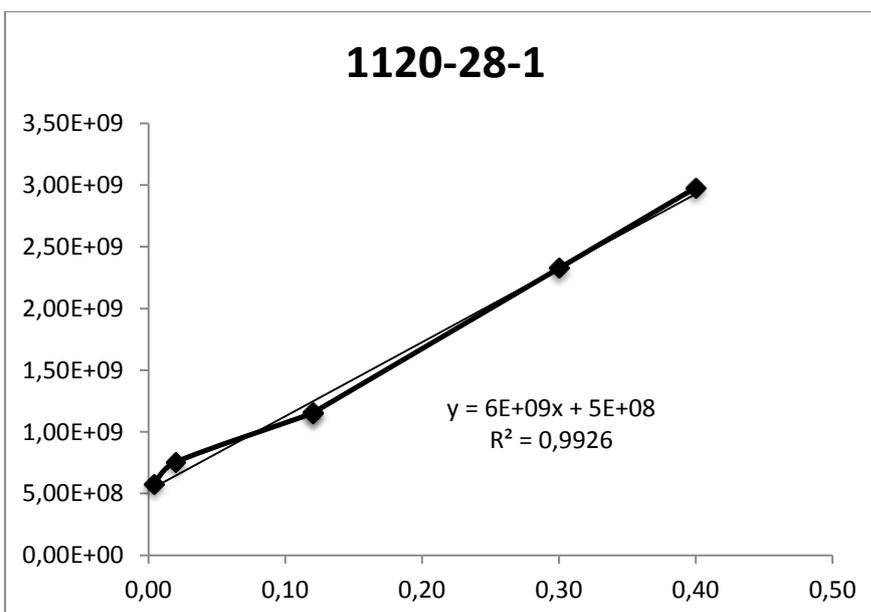
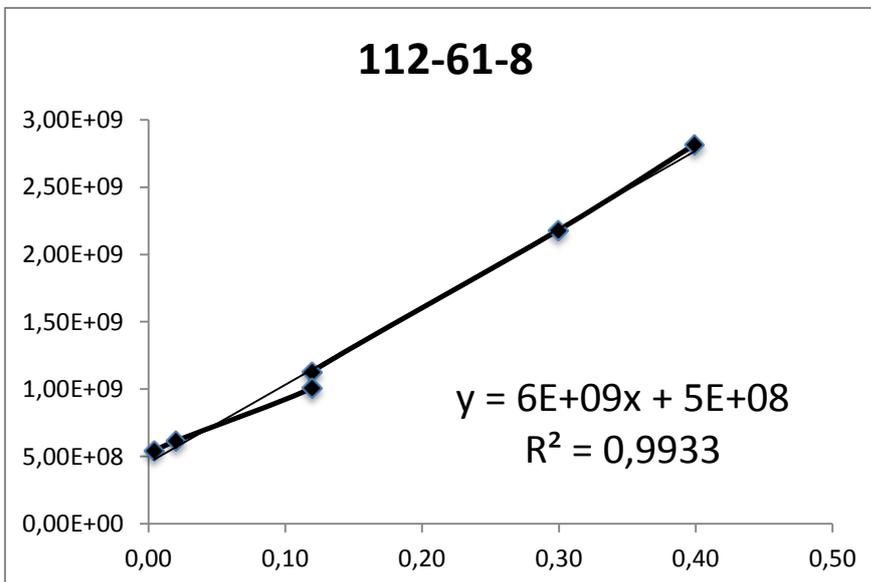
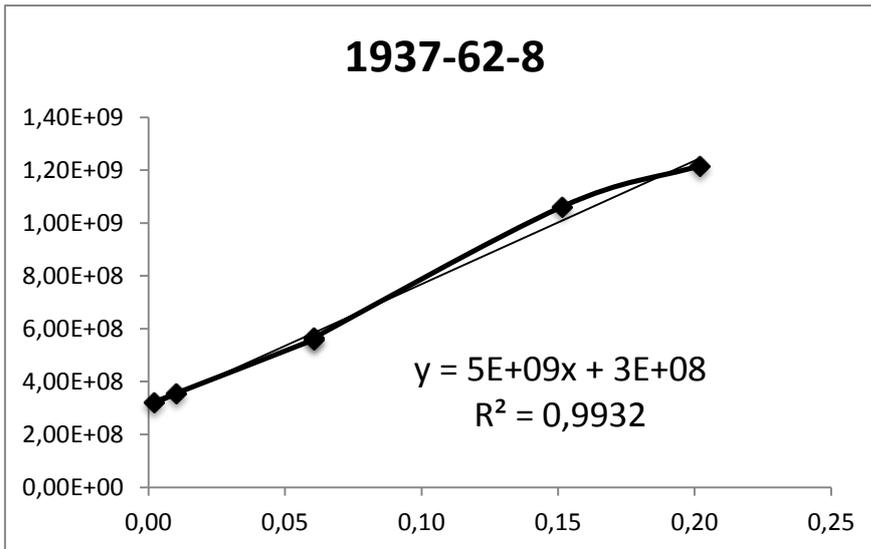
	Nome químico do éster metílico do ácido graxo (nome comum)	CAS (NIST)	Tempo de retenção
1	Ácido hexanóico (capróico)	106-70-7	1,855
2	Ácido octanóico (caprilico)	111-11-5	3,209
3	Ácido decanóico (caprico)	110-42-9	4,177
4	Ácido undecanóico éster metílico	1731-86-8	4,853
5	Ácido dodecanóico (laúrico)	111-82-0	5,252
6	Ácido tridecanóico	1731-88-0	6,358
7	Ácido 9-tetradecenóico (miristoleico)	56219-06-8	7,297
8	Ácido tetradecanóico (mirístico)	124-10-7	7,459
9	Ácido cis-10-pentadecenoico	84743-28-3	8,373
10	Ácido n-pentadecanóico	7132-64-1	8,526
11	Ácido 9-hexadecenoico (pamitoleico)	1120-25-8	9,313
12	Ácido n-hexadecanóico (palmítico)	112-39-0	9,562
13	Ácido cis-10-heptadecenoico	333621	10,311
14	Ácido heptadecanóico	1731-92-6	10,544
15	Ácido γ -linolênico	16326-32-2	10,971
16	Ácido linolaídico	256697-4	11,151
17	Ácido 9-octadecenoico (oleico)	112-62-9	11,243
18	Ácido 9-octadecenoico/trans-9 (elaídico)	1937-62-8	11,307
19	Ácido octadecanoico (esteárico)	112-61-8	11,537
20	Ácido 5,8,11,14 –eicosatetraenoico (Araquidônico)	2566-89-4	13,044
21	Ácido cis-5,8,11,14,17 – eicosapentenóico,	2734-47-6	13,117
22	Ácido 9,12,15-octadecatrienoico (linolênico)	301-00-8	13,346
23	Ácido cis-11,14 – eicosadienoico	2463027	13,678
24	Ácido cis-8,11,14 - eicosatrienoico	21061-10-9	13,779
25	Ácido eicosanóico (araquídico)	1120-28-1	14,251
26	Ácido eicosanóico	6064-90-0	15,907
27	Ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexanóico	2566-90-7	16,035
28	Ácido cis-13,16-docosadienoico	333603	17,034
29	Ácido 13-docosenóico (erúcico)	1120-34-9	17,147
30	Ácido docosanóico (behênico)	929-77-1	17,687
31	Ácidotricosanóico	2433-97-8	19,525
32	Ácido 15-tetracosenoico (nervoico)	2733-88-2	20,859
33	Ácido tetracosanóico (lignocérico)	2442-49-1	21,405

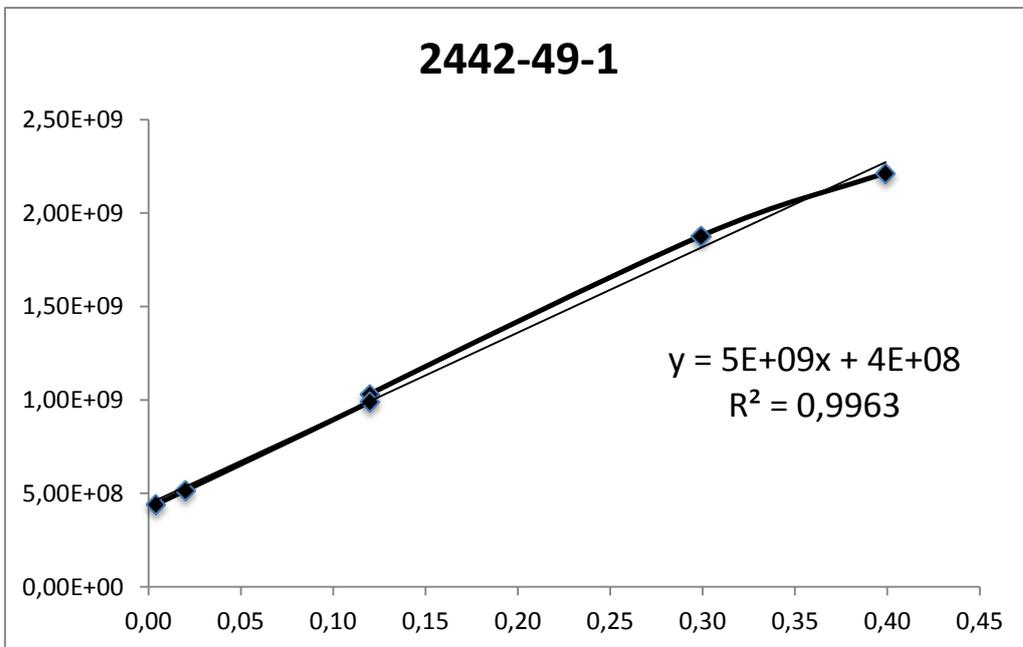
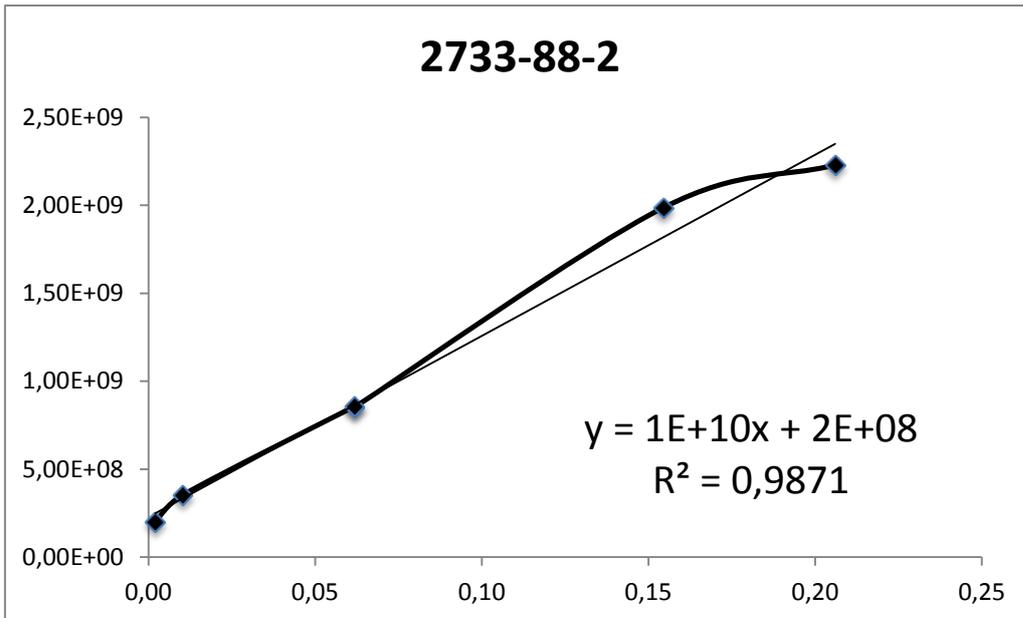
Anexo VI: Curvas de calibrações dos ácidos graxos por espectrometria de massa



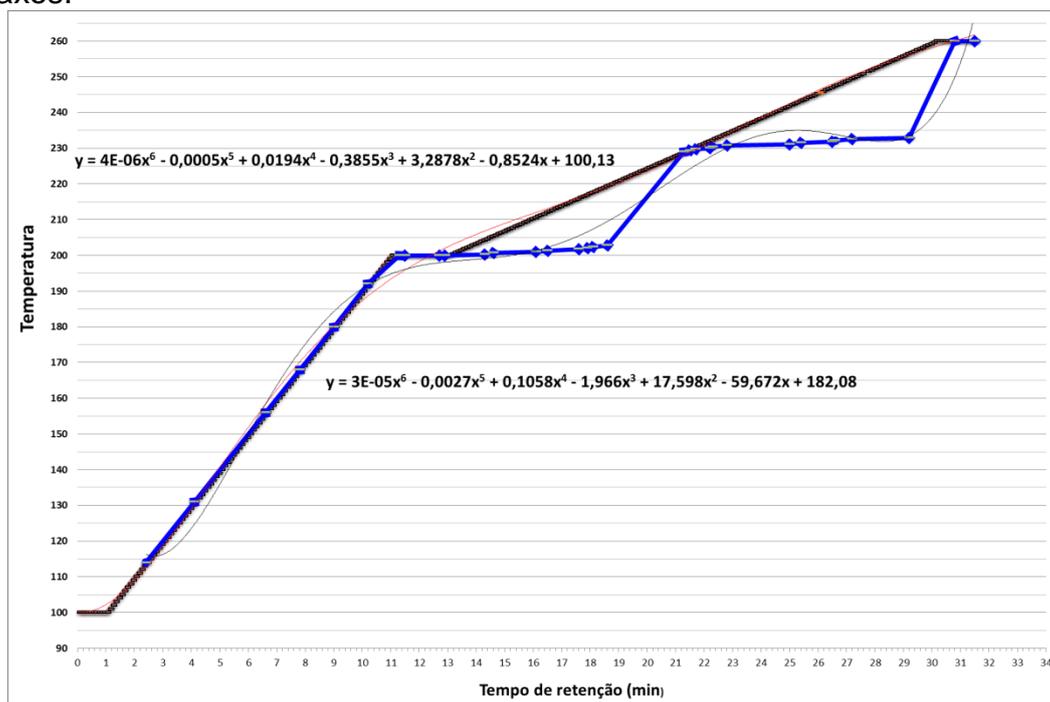


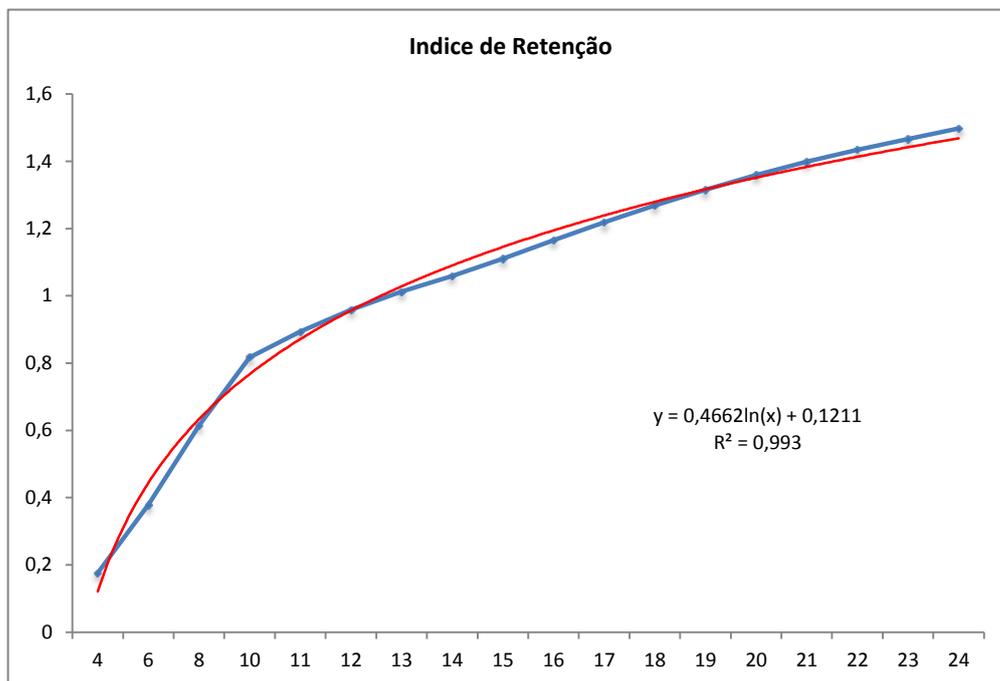




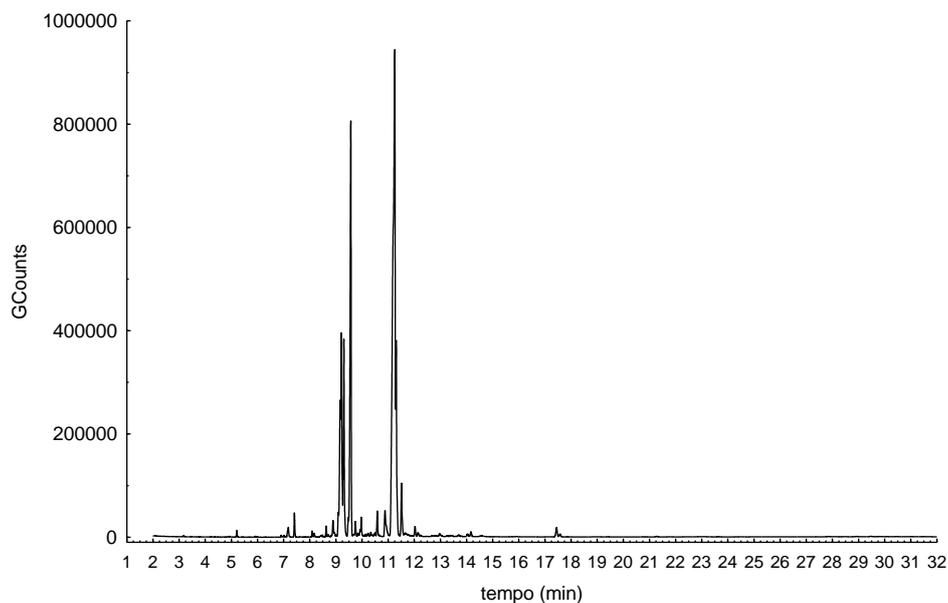


Anexo VII: Relação entre a rampa de aquecimento e as estruturas dos ácidos graxos.

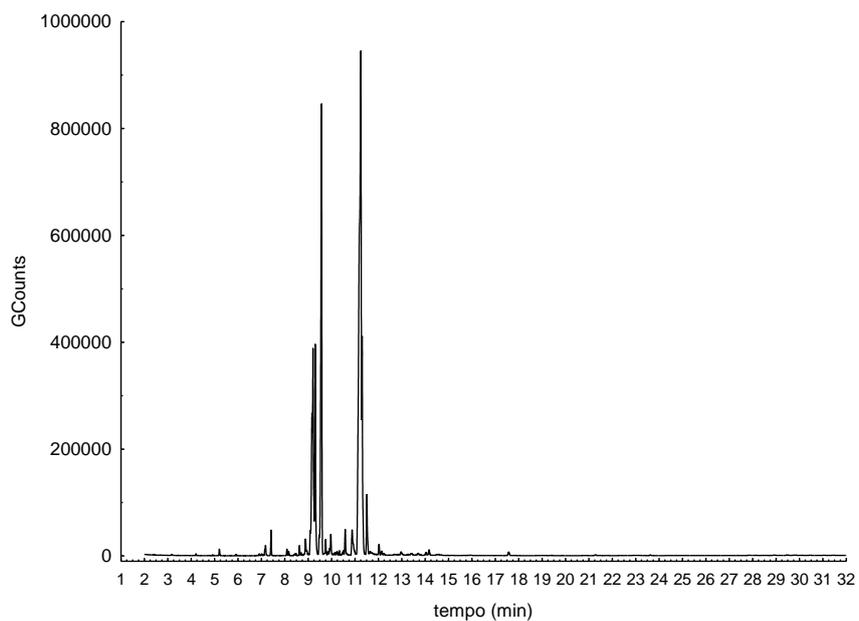


Anexo VIII: Índice de retenção em relação aos ácidos graxos encontrados.

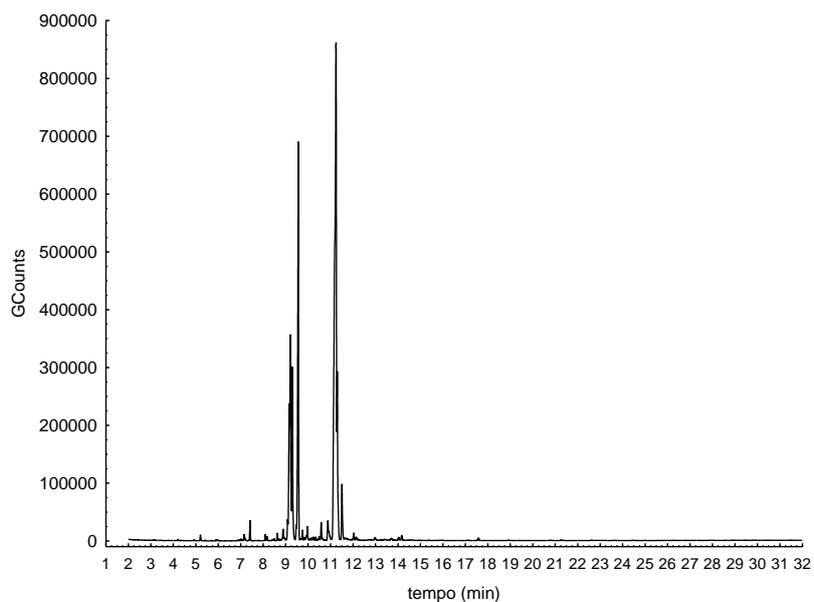
Anexo IX: Cromatograma dos ésteres metílicos das análises feita por CG do material extraído pelo método do banho de ultrassom e leito fixo.



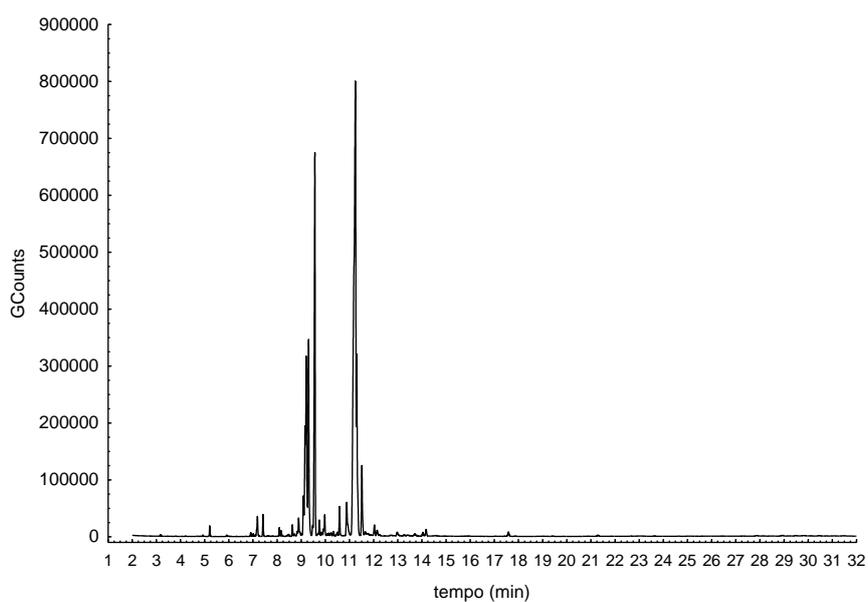
Cromatograma dos ácidos graxos representados na forma de seus ésteres metílicos obtidos da reação de esterificação pelo método de Hartman e Lago do material extraído pelo método US com 100 mL de etanol da microalga *Chlorella pyrenoidosa*.



Cromatograma dos ácidos graxos representados na forma de seus ésteres metílicos obtidos da reação de esterificação pelo método de Hartman e Lago do material extraído pelo método US com 200 mL de etanol + água (4% v:v), da microalga *Chlorella pyrenoidosa*.



Cromatograma dos ácidos graxos representados na forma de seus ésteres metílicos obtidos da reação de esterificação pelo método de Hartman e Lago do material extraído com extrator de leite fixo utilizando solvente etanol, da microalga *Chlorella pyrenoidosa*.



Cromatograma dos ácidos graxos representados na forma de seus ésteres metílicos obtidos da reação de esterificação pelo método de Hartman e Lago do material extraído com extrator de leite fixo utilizando solvente etanol, da microalga *Chlorella pyrenoidosa*.