

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCIS JOSIANE LIANA BAUMGARDT

EXTRAÇÃO DE ÓLEO DE MICROALGAS COM FLUIDOS PRESSURIZADOS
E AVALIAÇÃO DE SUA CONVERSÃO EM MONOÉSTERES GRAXOS

CURITIBA

2013

Francis Josiane Liana Baumgardt

**EXTRAÇÃO DE ÓLEO DE MICROALGAS COM FLUIDOS PRESSURIZADOS E
AVALIAÇÃO DE SUA CONVERSÃO EM MONOÉSTERES GRAXOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre em Química, Sub-Área de Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza

CURITIBA
2013

Baumgardt, Francis Josiane Liana

Extração de óleo de microalgas com fluidos pressurizados e
avaliação de sua conversão em monoésteres graxos / Francis Josiane
Liana Baumgardt. - Curitiba, 2013.

96 f. : il., tabs, grafs.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor
de Ciências Exatas, Curso de Pós-Graduação em Química.

Orientador: Luiz Pereira Ramos

Co-orientador: Marcos Lúcio Corazza

1. Microalgas – extração. 2. Biocombustíveis. 3. Ésteres graxos. I.
Ramos, Luiz Pereira. II. Corazza, Marcos Lúcio. III. Título. IV.
Universidade Federal do Paraná.

CDD 547.638

TERMO DE APROVAÇÃO

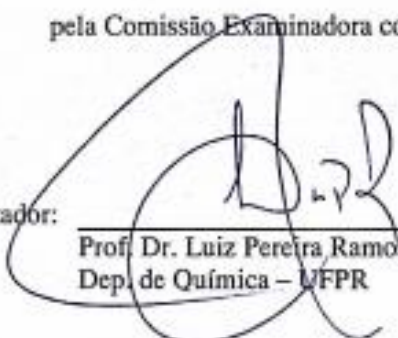
EXTRAÇÃO DE ÓLEO DE MICROALGAS COM FLUIDOS PRESSURIZADOS E
AVALIAÇÃO DE SUA CONVERSÃO EM MONOÊSTERES GRAXOS

por


FRANCIS JOSIANE LIANA BAUMGARDT

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,
pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador:



Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos
Dep. de Química – UFPR



Prof. Dr. Nelson Roberto Antoniosi Filho
Dep. de Química – UFG



Prof.ª Dr.ª Ana Luísa Lacava Lordello
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 27 de maio de 2013



Dedico este trabalho a minha mãe, Vera
Lucia Misfeldt Baumgardt (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar vida, forças, saúde, paz e ânimo a cada novo dia.

Ao Fabiano Rosa da Silva, por todo o amor, carinho, apoio, cumplicidade e compreensão em todos os momentos.

À minha família pelo apoio e amor incondicional em todos os momentos da minha vida.

Ao Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos pelos ensinamentos, incentivos, paciência e orientação para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza, pela co-orientação, apoio e inúmeras sugestões e contribuições durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Paulo C. Abreu do Departamento de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), por ter cedido amostras de microalga marinha para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Nelson Antoniosi Filho e à mestranda Dayane C. Costa do Laboratório de Métodos de Extração e Separação (LAMES) do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (UFG), pelas várias análises realizadas e demais contribuições neste trabalho.

Aos mestrandos Marcus Vinicius Brandalize, Michael Prado, Debora M. Kohepka, Laís P. Dill e Vinicius Kothe pelo inestimável auxílio nas mais variadas etapas deste projeto, e pelo companheirismo e amizade.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Fitobiomassa: Larissa, Arion, Claudio, Tatyana, Carlos, Gustavo, Priscila, Luana, Bruno, Edilson, Marcos, Ana Paula, pela amizade e momentos de descontração.

Aos amigos do Laboratório de Polímeros Sintéticos, Thiago Alexandre, Grece, Carlos, Reinaldo e Mara.

Aos amigos André, Débora, Dóris, Carmen, Roberta, Carla, Juliane, dentre outros tantos que são quase irmãos, obrigada pela amizade, apoio e confiança.

Ao Secretário do Programa de Pós-Graduação em Química da UFPR, Marcelino Câmara, em nome do qual agradeço a todos os funcionários do Departamento de Química.

Aos demais professores e colegas do Departamento de Química da UFPR.

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos órgãos financiadores CNPq, FINEP e CAPES e à Universidade Federal do Paraná.

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

(Albert Einstein)

RESUMO

As microalgas têm se apresentado como uma alternativa promissora para a produção de biocombustíveis, pois além da possibilidade de apresentarem maiores teores de extrato lipídico, possuem um ciclo de vida curto, necessitando de menores extensões de terra para o seu cultivo e utilizam como insumo para a fotossíntese o CO₂ oriundo de diversas atividades, antrópicas ou não. No entanto, para uso como matéria-prima para a produção de biodiesel, é necessário otimizar a etapa de extração de lipídios. Este trabalho teve como objetivo determinar o teor de lipídios e o perfil graxo da microalga marinha *Nannochloropsis oculata*, em comparação com a microalga dulcícola *Pseudochlorella pyrenoidosa*, e também avaliar a eficiência de dois sistemas distintos para as extrações de suas respectivas frações lipídicas, a extração em Soxhlet e o desenvolvimento de um sistema baseado no uso de solventes pressurizados. Ao se realizar a transesterificação diretamente nas microalgas *in natura*, a espécie *P. pyrenoidosa* apresentou 10,47 g de éster por 100 g de biomassa seca, sendo que os componentes majoritários, na forma de ésteres metílicos, foram os derivados dos ácidos linolênico (C18:3), linoléico (C18:2), palmítico (C16:0) e palmitoléico (C16:1), enquanto que a microalga *N. oculata* dessalinizada apresentou 13,9 g de éster por 100 g de biomassa seca, com predominância dos ésteres dos ácidos palmítico (C16:0), palmitoléico (C16:1), oléico (C18:1) e eicosapentaenóico (C20:5). As extrações em Soxhlet foram realizadas utilizando etanol absoluto, clorofórmio:metanol (2:1, v/v) e *n*-hexano como solventes, em extrações isoladas e independentes. Dentre os solventes avaliados, o etanol foi o mais eficiente no processo de extração, produzindo 3,25 g de éster por 100 g de biomassa nos extratos da microalga dulcícola e 4,53 g/100 g no extrato de amostras salinizadas da microalga marinha, equivalentes a 11,33 g/100 g de biomassa seca da microalga dessalinizada. As extrações com fluido pressurizado foram realizadas com a utilização de propano ou CO₂ como solvente e etanol absoluto como cossolvente. A microalga *P. pyrenoidosa* foi utilizada para a definição das condições ideais de temperatura e pressão para extração. Em seguida, estas condições foram aplicadas para as extrações de *N. oculata* e os melhores rendimentos foram obtidos a 200 bar e 80°C, empregando propano como solvente e com a adição de cossolvente, resultando em 7,53 g de éster por 100 g de biomassa dessalinizada. Ao se substituir o solvente para dióxido de carbono nestas mesmas condições, o rendimento final em ésteres foi de 4,08 g por 100 g de biomassa dessalinizada. No entanto, mesmo nas melhores condições utilizadas neste estudo, a extração com fluido pressurizado não extraiu mais de 54,2 % do material lipídico das microalgas, demonstrando que o processo ainda deverá ser otimizado, particularmente no que diz respeito ao design do reator, para melhorar o processo de transferência de massas. Apesar destas limitações, foi possível verificar uma redução significativa na quantidade de solvente utilizada, quando comparada ao sistema de extração em Soxhlet convencional.

Palavras-chave: microalgas, *Pseudochlorella pyrenoidosa*, *Nannochloropsis oculata*, extração, fluidos pressurizados, ésteres graxos.

ABSTRACT

Microalgae have emerged as a promising alternative for the production of biofuels because, in addition to its high levels of lipid accumulation, they have a short life cycle, requiring smaller tracts of land for their cultivation, and are able to use as input for photosynthesis the CO₂ originated from various activities, anthropogenic or not. However, to be used as feedstock for biodiesel production, it is necessary to optimize the lipid extraction step. This study aimed to determine the lipid content and fatty acid profile of the marine microalgae *Nannochloropsis oculata*, to compare the results with those of the freshwater microalgae *Pseudochlorella pyrenoidosa*, and to evaluate the effectiveness of two different systems for the extraction of their respective lipid fractions: solvent extraction in a Soxhlet apparatus and extraction with pressurized solvents. When performing the direct conversion of the native microalgae into fatty acid methyl esters, the species *P. pyrenoidosa* gave 10.47 g ester per 100 g dry biomass, with the major components being derived from linolenic (C18: 3), linoleic (C18: 2), palmitic (C16:0) and palmitoleic (C16:1) acids. By contrast, the microalgae *N. oculata* after dessalination presented 13.9 g ester per 100 g dry biomass, with predominance of the esters derived from palmitic (C16:0), palmitoleic (C16:1), oleic (C18:1) and eicosapentaenoic (C20:5) acids. The Soxhlet extractions were carried out using absolute ethanol, chloroform:methanol (2:1, v/v) and *n*-hexane as solvents in extractions that were carried out separately and independently. Among the evaluated solvents, ethanol was the most efficient in the extraction procedure, yielding 3.25 g ester per 100 g biomass in the freshwater microalgae extracts and 4.53 g per 100 g in the marine microalgae extract, which was equivalent to 11.33 g per 100 g dry biomass in microalgae after dessalination. Extractions with pressurized fluids were carried out using propane or carbon dioxide (CO₂) as solvents and absolute ethanol as cosolvent. The microalgae *P. pyrenoidosa* was used to define the ideal conditions of temperature and pressure for extraction. Then, these conditions were applied for the extraction of *N. oculata*. The best yield was obtained at 200 bar and 80 °C using subcritical propane as solvent in the presence of ethanol as cosolvent, resulting in a 7.53 g per 100 g of desalted biomass. By replacing the solvent by CO₂ under the same experimental conditions, the final ester yield was 4.08 g per 100 g desalted biomass. However, even under the best conditions used in this study, pressurized fluid extraction did not draw more than 54.2% of the microalgae lipid material, demonstrating that the process has to be optimized, especially with regard to the design of extraction vessel that would improve both heat and mass transfer phenomena. Despite these limitations, a significant reduction in the required amount of solvent was observed, compared to conventional Soxhlet extraction system.

Keywords: Microalgae, *Pseudochlorella pyrenoidosa*, *Nannochloropsis oculata*, extraction, pressurized fluid, fatty esters.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - IMAGENS AMPLIADAS DAS CÉLULAS DA MICROALGA <i>N. oculata</i>	23
FIGURA 2 - IMAGENS AMPLIADAS DAS CÉLULAS DA MICROALGA <i>P. pyrenoidosa</i>	26
FIGURA 3 - SISTEMAS ABERTOS PARA CULTIVO DE MICROALGAS; A) LAGOAS; B) TANQUES CIRCULARES; C) SISTEMA RACEWAYS; D) DETALHE DAS PAS DE AGITAÇÃO EM RACEWAYS.....	30
FIGURA 4- EXEMPLOS DE SISTEMAS FECHADOS QUE PODEM SER UTILIZADOS PARA CULTIVO DE MICROALGAS. A) SISTEMA TUBULAR HELICOIDAL; B) TUBULAR HORIZONTAL; C) TUBULAR VERTICAL INCLINADO; D) PLÁSTICOS FLEXÍVEIS; E) COLUNAS CILINDRICAS E F) PLACAS.....	31
FIGURA 5 - ESTRUTURA DOS TANQUES UTILIZADOS NO CULTIVO DA MICROALGA <i>N. oculata</i> . DA ESQUERDA PARA A DIREITA, TANQUES DO TIPO “RACEWAYS”, TANQUES CIRCULARES E TANQUES DE FLOCULAÇÃO.....	39
FIGURA 6 - ESQUEMA DAS ETAPAS PARA A EXTRAÇÃO DO MATERIAL LIPÍDICO UTILIZANDO SISTEMA SOXHLET E SUA CONVERSÃO A MONOÉSTERES GRAXOS.....	41
FIGURA 7 - IMAGEM DO VASO DE PRESSÃO, CONTROLADOR E BOMBA SERINGA UTILIZADOS PARA AS EXTRAÇÕES COM FLUIDO PRESSURIZADO E, À DIREITA, UMA AMPLIAÇÃO DO VASO EXTRATOR.....	43
FIGURA 8 - ESQUEMA DO CONJUNTO DE EQUIPAMENTOS UTILIZADO NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO.....	43
FIGURA 9 - PERFIL DOS MONOÉSTERES OBTIDOS PARA A MICROALGA <i>P. pyrenoidosa</i>	46
FIGURA 10 - QUANTIFICAÇÃO DA PORCENTAGEM DE ÁREA PARA CADA UM DOS MONOÉSTERES PRESENTE NA MICROALGA <i>P. pyrenoidosa</i>	47
FIGURA 11 - PERFIL DOS MONOÉSTERES OBTIDOS PARA A MICROALGA <i>N. oculata</i>	50
FIGURA 12 - RESULTADO DA MÉDIA E DESVIO PADRÃO EM RELAÇÃO À ÁREA DOS MONOÉSTERES PRESENTES NAS AMOSTRAS DA MICROALGA <i>N. oculata</i> (MONOÉSTERES PRESENTES EM MAIS DE DUAS AMOSTRAS E/OU ACIMA DE 0,2% DE ÁREA).	51
FIGURA 13 - RESULTADO DA MÉDIA E DESVIO PADRÃO EM RELAÇÃO À ÁREA DE CADA UM DOS MONOÉSTERES PRESENTES NO MIX.....	52
FIGURA 14 - AMOSTRAS DO MIX IN NATURA EVIDENCIANDO A PRESENÇA DE SAIS	53
FIGURA 15 - CROMATOGRAMAS DOS MONOÉSTERES DA MICROALGA <i>P. pyrenoidosa</i> , OBTIDOS ATRAVÉS DA EXTRAÇÃO COM SOXHLET UTILIZANDO CLOROFÓRMIO:METANOL COMO SOLVENTE.	57

FIGURA 16 - CROMATOGRAMAS DOS MONOÉSTERES DA MICROALGA <i>P. pyrenoidosa</i> , OBTIDOS ATRAVÉS DA EXTRAÇÃO COM SOXHLET UTILIZANDO HEXANO.....	57
FIGURA 17 - CROMATOGRAMA DO PERFIL DOS MONOÉSTERES DA MICROALGA <i>P. pyrenoidosa</i> A PARTIR DA EXTRAÇÃO REALIZADA EM SOXHLET UTILIZANDO ETANOL COMO SOLVENTES	58
FIGURA 18 - PERFIL DOS MONOÉSTERES ORIUNDOS DOS EXTRATOS LIPÍDICOS EM SOXHLET DA MICROALGA <i>P. pyrenoidosa</i>	58
FIGURA 19 - PERFIL LIPIDICO DA MICROALGA <i>N. oculata</i> , OBTIDO APÓS A EXTRAÇÃO EM SOXHLET COM ETANOL	61
FIGURA 20 - PERFIL LIPIDICO DA MICROALGA <i>N. oculata</i> , OBTIDO APÓS A EXTRAÇÃO EM SOXHLET COM CLOROFÓRMIO:METANOL.....	62
FIGURA 21 - PERFIL LIPIDICO DA MICROALGA <i>N. oculata</i> , OBTIDO APÓS A EXTRAÇÃO EM SOXHLET UTILIZANDO HEXANO COMO SOLVENTE	62
FIGURA 22 - PERFIL DOS MONOÉSTERES ORIUNDOS DOS DIFERENTES EXTRATOS LIPÍDICOS DA MICROALGA <i>N. oculata</i>	63
FIGURA 23 - CINÉTICA DEXTRAÇÃO DO ÓLEO DA MICROALGA <i>P. pyrenoidosa</i> REALIZADAS A 40°C NAS DIFERENTES PRESSÕES	65
FIGURA 24 - CINÉTICA DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO DA MICROALGA <i>P. pyrenoidosa</i> REALIZADAS A 80°C PARA AS DIFERENTES PRESSÕES.....	66
FIGURA 25 - CINÉTICA DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO DA MICROALGA <i>P. pyrenoidosa</i> UTILIZANDO PROPANO COMO SOLVENTE E ETANOL COMO COSSOLVENTE	67
FIGURA 26 - CINÉTICAS DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO DA MICROALGA <i>P. pyrenoidosa</i> UTILIZANDO PROPANO OU CO ₂ COM E SEM A UTILIZAÇÃO DE COSSOLVENTE	68
FIGURA 27 - CURVA DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO DA MICROALGA <i>N. oculata</i> REALIZADA EM DIFERENTES PRESSÕES, UTILIZANDO PROPANO NO ESTADO SUBCRÍTICO SEM A UTILIZAÇÃO DE COSSOLVENTE.	69
FIGURA 28 - CURVA DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO DA MICROALGA <i>N. oculata</i> REALIZADA EM DIFERENTES PRESSÕES, UTILIZANDO PROPANO NO ESTADO SUBCRÍTICO E ETANOL COMO COSSOLVENTE.....	70
FIGURA 29 - CURVAS DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO DA MICROALGA <i>N. oculata</i> REALIZADA EM DIFERENTES PRESSÕES, UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO COMO SOLVENTE.	70
FIGURA 30 - CURVAS DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO DA MICROALGA <i>N. oculata</i> REALIZADA EM DIFERENTES PRESSÕES, UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO COMO SOLVENTE E ETANOL COMO COSSOLVENTE.	71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPARAÇÃO DE ALGUMAS FONTES DE MATÉRIA-PRIMA PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL	18
TABELA 2 - CONTEÚDO LIPÍDICO PRESENTE EM DIFERENTES ESPÉCIES DE MICROALGAS MARINHAS E DULCÍCOLAS.....	20
TABELA 3 - PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS DA MICROALGA <i>N. oculata</i> OBTIDOS EM DIFERENTES ESTUDOS.....	24
TABELA 4 - TEOR E PERFIL LIPÍDICO DA MICROALGA <i>P. pyrenoidosa</i>	27
TABELA 5 - PERÍODO DE COLETA DE CADA UMA DAS AMOSTRAS FORNECIDAS PELA FURG (RIO GRANDE, RS).....	38
TABELA 6 - RESULTADO DO TEOR DE UMIDADE E PORCENTAGEM MÁSSICA DE ÉSTERES GRAXOS EM CADA UMA DAS ONZE AMOSTRAS DE <i>N. oculata</i>	49
TABELA 7 - QUANTIFICAÇÃO DA REDUÇÃO DA MASSA DAS AMOSTRAS APÓS A LAVAGEM E LIOFILIZAÇÃO.....	54
TABELA 8 - RENDIMENTO NORMALIZADO DAS EXTRAÇÕES DA MICROALGA <i>P. pyrenoidosa</i> UTILIZANDO SISTEMA SOXHLET E DIFERENTES SOLVENTES.....	56
TABELA 9 - RENDIMENTO NORMALIZADO DE EXTRAÇÃO UTILIZANDO SISTEMA SOXHLET COM DIFERENTES SOLVENTES PARA A MICROALGA <i>N. oculata</i>	59
TABELA 10 - RENDIMENTO DE EXTRATO DA MICROALGA <i>P. pyrenoidosa</i> OBTIDO EM DIFERENTES TEMPERATURAS E PRESSÕES.....	64
TABELA 11 - RENDIMENTO DE EXTRATO DA MICROALGA <i>P. pyrenoidosa</i> UTILIZANDO DIFERENTES PROPORÇÕES DE COSSOLVENTE.....	66
TABELA 12 - RENDIMENTOS NORMALIZADOS DE EXTRAÇÃO E ESTERIFICAÇÃO PARA OS EXTRATOS E RESÍDUOS NAS DIFERENTES PRESSÕES (150, 200 E 250 BAR) A 80°C, UTILIZANDO <i>N. oculata</i> E PROPANO COMO SOLVENTE.....	75
TABELA 13 - RENDIMENTO NORMALIZADO DE EXTRAÇÃO E ESTERIFICAÇÃO PARA OS EXTRATOS E RESÍDUOS NAS DIFERENTES PRESSÕES A 80°C, UTILIZANDO <i>N. oculata</i> E DIÓXIDO DE CARBONO COMO SOLVENTE.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
- B2 - Diesel com 2% de biodiesel
- B3 - Diesel com 3% de biodiesel
- B4 - Diesel com 4% de biodiesel
- B5 - Diesel com 5% de biodiesel
- CENPES - Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello
- CG - Cromatografia de fase gasosa
- EM - Espectroscopia de massas
- EPA - Ácido graxo eicosapentanóico, do inglês, "*Eicosapentaenoic acid*"
- ESP - Extração com Solvente Pressurizado
- FAME - Ésteres metílicos de ácidos graxos, do inglês, "Fatty Acid Methyl Esters"
- FURG - Universidade Federal do Rio Grande
- H&L - Metodologia analítica inicialmente proposta por Hartman e Lago
- m/z - relação entre a massa/ carga de uma molécula
- NIST - National Institute of Standards and Technology
- PEAD - polietileno de alta densidade
- PNPB - Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel
- PUFA - Ácidos graxos poli-insaturados, do inglês, "*Polyunsaturated Fatty Acid*"
- PVC - Policloreto de vinila

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	MATÉRIAS-PRIMAS.....	17
1.1.1	Microalgas.....	19
1.1.2	Microalga <i>Nannochloropsis oculata</i>	23
1.1.3	Microalga <i>Pseudochlorella pyrenoidosa</i>	26
1.2	SISTEMAS DE CULTIVO.....	29
1.2.1	Sistemas abertos	29
1.2.2	Sistemas fechados.....	30
1.2.3	Sistemas híbridos.....	32
1.3	EXTRAÇÃO DO ÓLEO DAS MICROALGAS	33
1.3.1	Extração convencional	33
1.3.2	Extração com fluido pressurizado	34
2.	OBJETIVOS.....	36
2.1	OBJETIVO GERAL	36
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3.	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	MATERIAL	37
3.2	MÉTODOS.....	37
3.2.1	Cultivo	37
3.2.2	Dessalinização das amostras	40
3.2.3	Determinação do teor de cloreto.....	40
3.2.4	Teor de umidade	40
3.2.5	Extração utilizando sistema Soxhlet	41
3.2.6	Extrações com fluido pressurizado	42
3.2.7	Cinética da extração do óleo das microalgas utilizando fluídos pressurizados	44
3.2.8	Esterificação dos ácidos graxos	44
3.2.9	Determinação da composição em ácidos graxos nas microalgas <i>P. pyrenoidosa</i> e <i>N. oculata</i>	45
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA MICROALGA <i>Pseudochlorella pyrenoidosa</i>	46

4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS DIFERENTES LOTES DA MICROALGA <i>Nannochloropsis oculata</i>	48
4.3	DESSALINIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE <i>N. oculata</i>	53
4.4	EXTRAÇÃO UTILIZANDO EXTRATORES SOXHLET	55
4.4.1	Extrações utilizando a microalga <i>P. pyrenoidosa</i>	55
4.4.2	Extrações utilizando a microalga <i>N. oculata</i>	59
4.5	CINÉTICA DE EXTRAÇÃO UTILIZANDO FLUIDO PRESSURIZADO	64
4.6	AVALIAÇÃO DA CONVERSÃO EM MONOÉSTERES GRAXOS DOS EXTRATOS OBTIDOS POR ESP	72
5.	CONCLUSÃO	77
6.	REFERÊNCIAS	79
	APÊNDICES.....	85
	APÊNDICE 1 - MONOÉSTERES IDENTIFICADOS E SEUS RESPECTIVOS TEMPOS DE RETENÇÃO.....	85
	APÊNDICE 2 - ESPECTROS DE MASSA DOS MONOÉSTERES	86
	APÊNDICE 3 - IDENTIFICAÇÃO DOS MONOÉSTERES E SEUS RESPECTIVOS FRAGMENTOS DE MASSA.....	96

1. INTRODUÇÃO

A utilização de biodiesel no Brasil surgiu de um estudo de viabilidade conduzido por um Grupo Interministerial, coordenado pela Casa Civil da Presidência da República, que resultou na conceituação e normatização do que veio a ser denominado Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) (ANUÁRIO BRASILEIRO DO BIODIESEL, 2008). Oficialmente, o PNPB foi lançado em 2004 e entrou em vigor em 1º de janeiro de 2008, ocasião em que todo o diesel veiculado em território nacional deveria conter obrigatoriamente 2% de biodiesel (B2). Esta mistura compulsória sofreu aumentos gradativos, para B3 em março de 2008, B4 em julho de 2009, B5 em 1º de janeiro de 2010 (ANP, 2013).

O biodiesel pode ser definido como um substituto renovável do diesel de petróleo que pode ser produzido pela alcoólise de óleos e gorduras de origem animal ou vegetal ou pela esterificação de ácidos graxos, na presença de um álcool monohidroxilado de cadeia curta (metanol ou etanol) e, idealmente, de um catalisador (ácido, básico ou enzimático) em um processo que pode ser homogêneo ou heterogêneo (CORDEIRO *et al.*, 2011; RAMOS *et al.*, 2011).

Este biocombustível possui vantagens frente ao diesel de petróleo, pois apresenta queima mais limpa, é mais biodegradável, menos tóxico e livre de compostos sulfurados e aromáticos. Além disto, pode ser adicionado ao diesel em qualquer proporção, permitindo grande flexibilidade quanto ao seu uso em motores do ciclo Diesel (KNOTHE *et al.*, 2006; CORDEIRO, 2008). O uso automotivo do biodiesel também resulta em uma redução substancial das emissões de gases do efeito estufa que ocasionam o aquecimento global, como é o caso do CO₂. Isto porque grande parte do gás carbônico gerado na sua combustão é reabsorvido pelas oleaginosas durante o processo de fotossíntese (D'ARCE, 2005).

No Brasil, para que os ésteres graxos produzidos a partir de diferentes matérias-primas possam ser classificados como biodiesel, suas propriedades devem atender às especificações estabelecidas pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) no regulamento técnico ANP Nº 14/2012 (ANP, 2013).

1.1 MATÉRIAS-PRIMAS

Um dos grandes desafios na produção de biodiesel em grande escala é dispor de matérias-primas capazes de atender à demanda de programas nacionais de energia e que apresentem sustentabilidade comprovada em termos econômicos, sociais e ambientais. Dentre as alternativas para produção de óleos e gorduras, podemos citar as de origem vegetal como soja, milho, canola, algodão, pinhão-manso, girassol, dendê, macaúba, crambe, nabo forrageiro e microalgas, ou ainda os materiais graxos de origem animal, como os resultantes do abate de suínos, bovinos e aves, além dos óleos e gorduras residuais (SUAREZ *et al.*, 2009).

Uma análise do PNPB revela que a soja tem sido a principal matéria-prima utilizada no Brasil, por ser este o único agronegócio com escala produtiva suficientemente grande para atender a demanda do mercado nacional para B5, que é de aproximadamente 2,5 bilhões de L.ano⁻¹ (ANP, 2013). Em 2012, a produção nacional de biodiesel utilizou em média 75,2% de óleo de soja, 17,2% de gordura bovina, 4,5% de óleo de algodão e 3,1% de outros materiais graxos (óleo de palma, óleo de canola, óleo de fritura usado e gorduras de frango e porco, entre outros) (ANP, 2013). Portanto, matérias-primas alternativas precisam ser identificadas, principalmente aquelas que não sejam *commodities* e preferencialmente não estejam vinculadas ao mercado alimentício. Além disso, o custo da matéria-prima é a variável de maior impacto econômico da indústria de biodiesel, representando de 70 a 85% do seu custo de produção (MENDES e COSTA, 2010; RAMOS *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2012).

Comparativamente com outras culturas, o cultivo de microalgas se apresenta bastante promissor, pois além de apresentar maior produtividade em óleo, necessita de menores extensões de terra para a sua produção. A TABELA 1 apresenta microalgas com diferentes teores de óleo (5, 30 e 70%) e nela é possível observar que, mesmo para espécies que apresentem baixa produtividade lipídica (5%), o cultivo continua sendo interessante, pois para atender a uma mesma demanda em óleo, esta cadeia de produção exigiria áreas muito inferiores às necessárias para o cultivo das matérias-primas utilizadas atualmente.

Além da alta produtividade, inúmeras outras vantagens podem ser apontadas em relação ao cultivo de microalgas, como a ocorrência de um ciclo de vida de poucos dias, permitindo colheitas contínuas e diminuindo a logística de armazenagem,

necessária para o caso de culturas anuais, e sua habilidade em consumir como insumo para a fotossíntese o CO₂ oriundo de diversas atividades, antrópicas ou não, cujas emissões contribuem para o aumento do aquecimento global. Outra importante vantagem é que o cultivo de microalgas pode ser realizado em condições não adequadas para a produção de culturas convencionais, minimizando as modificações causadas aos ecossistemas e a competição com a produção de alimentos (SUAREZ *et al.*, 2009; GREENWELL *et al.*, 2010).

TABELA 1 - COMPARAÇÃO DE ALGUMAS FONTES DE MATÉRIA-PRIMA PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL

FONTE DE TRIACILGLICEROIS	PRODUTIVIDADE DE ÓLEO (L.ha ⁻¹)	ÁREA NECESSÁRIA (Mha) ^a
Soja	446	594,0
Algodão	349	773,0
Milho	172	1540,0
Canola	1190	223,0
Coco	2689	99,0
Palma	5950	45,0
Microalga ^b	136900	2,0
Microalga ^c	58700	4,5
Microalga ^d	9780	28

^aÁrea necessária para atender 50% do combustível utilizado para o transporte nos Estados Unidos; ^bmicroalga com 70% em óleo ^cmicroalga com 30% em óleo e ^dmicroalga com 5% em óleo (em relação a massa de biomassa).

FONTE: Adaptado de CHISTI, 2007.

Os dados apresentados na TABELA 1 representam valores médios aceitos na literatura, mas não têm a pretensão de serem absolutos, pois a produtividade de culturas agrícolas depende de inúmeros fatores, como clima, nutrientes no solo, irrigação, tecnologia de produção, entre outros (SUAREZ *et al.*, 2009). A partir destes dados, percebe-se que a soja possui uma produtividade mais baixa e necessita que grandes extensões de terra para a sua produção. Segundo CHISTI (2007), o cultivo de matérias-

primas tradicionais (milhos, soja, algodão e canola) não poderiam atender a 50% da demanda por combustíveis destinados ao transporte nos Estados Unidos, pois o cultivo destas oleaginosas necessitaria de milhões de hectares de área agricultável, enquanto que as microalgas se apresentam como uma alternativa para esta necessidade, uma vez que, dependendo de seu teor em material lipídico, necessitariam de áreas muito menores para atender à mesma demanda (vide TABELA 1). Assim, fica claro que com o aumento na demanda por óleos para a produção de biocombustíveis a partir da soja ou por quaisquer outros cereais, resultaria em uma competição entre as áreas ocupadas por cultivos para fins energéticos e/ou alimentícios.

1.1.1 Microalgas

As microalgas são organismos de dimensões microscópicas que possuem clorofila e outros pigmentos capazes de realizar a fotossíntese e que podem apresentar estrutura celular procariótica ou eucariótica. Além disto, apresentam rápido crescimento e podem se desenvolver em condições adversas. Apesar das diferenças estruturais e morfológicas entre os representantes de cada divisão, esses seres são fisiologicamente similares e apresentam metabolismo análogo ao das plantas. Porém, o número exato de espécies de microalgas que podem ser encontradas no meio marinho, em água doce e no solo ainda é desconhecido. Esta diversidade se reflete na composição bioquímica destes organismos, o que faz com que sejam fontes de uma quantidade ilimitada de produtos, tais como lipídeos, carotenoides, pigmentos, polissacarídeos e proteínas (DERNER *et al.*, 2006; LOURENÇO, 2006; MATA *et al.*, 2010).

Em geral, as microalgas podem ser utilizadas para diversos fins, tais como suplemento alimentar para humanos ou para animais aquáticos (pois são ricas em proteínas e ácidos graxos poli-insaturados), adubo orgânico, tratamento de águas residuais, produção de pigmentos de alto valor agregado (como o β -caroteno e a astaxantina) e matéria-prima para biocombustíveis (LOURENÇO, 2006; OHSE *et al.*, 2009).

Diversas espécies de microalgas podem apresentar elevados teores de óleo, o que possibilita a sua utilização como matéria-prima na produção de biodiesel. A TABELA

2 apresenta o teor lipídico para algumas espécies marinhas e dulcícolas que estão sendo estudadas para este fim.

TABELA 2 - CONTEÚDO LIPÍDICO PRESENTE EM DIFERENTES ESPÉCIES DE MICROALGAS MARINHAS E DULCÍCOLAS

MICROALGA DULCÍCOLA	CONTEÚDO LIPÍDICO (% MASSA SECA)	MICROALGA MARINHA	CONTEÚDO LIPÍDICO (% MASSA SECA)
<i>Botryococcus braunii</i>	25,0- 75,0	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	14,6 - 17,6
<i>Chlorella sp.</i>	28,0- 32,0	<i>Dunaliella salina</i>	6,0 - 25,0
<i>Chlorella vulgaris</i>	5,0- 58,0	<i>Dunaliella tertoelecta</i>	16,0 - 71,0
<i>Kirchneriella irregulares</i>	19,8	<i>Isochrysis galbana</i>	7,1 - 33,0
<i>Kirchneriella lunares</i>	20,2	<i>Nannochloris sp.</i>	20,0 - 35,0
<i>Monoraphidium komarkovae</i>	23,4	<i>Nannochloropsis sp.</i>	31,0 - 68,0
<i>Neochloris oleoabundans</i>	29,0- 65,0	<i>Pavlova salina</i>	30,9
<i>Scenedesmus sp.</i>	19,6- 21,1	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	10,8 - 57,0
<i>Scenedesmus oblíquo</i>	11,0- 55,0	<i>Skeletonema costatum</i>	13,5 - 51,3
<i>Tetranephris brasiliensis</i>	23,1	<i>Teraselmis suecica</i>	8,5 - 23,0

FONTE: O AUTOR, ADAPTADO DE CHISTI (2007); MENEZES *et al.* (2013) E MATA *et al.* (2010).

Além de variações no teor, existem diferenças na composição destes óleos, que podem apresentar ácidos graxos saturados, mono ou poli-insaturadas em cadeias com 12 a 22 carbonos. A composição dos ácidos graxos terá grande efeito sobre as características do biodiesel produzido (GRAHAM e WILCOX, 2000; MATA *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2012).

Os lipídios fazem parte da membrana celular e podem ser polares ou apolares. Os polares são formados principalmente por fosfolipídeos e glicolipídeos, enquanto que os lipídios neutros são compostos tipicamente por triacilgliceróis, sendo estes responsáveis por realizar a reserva de energia, enquanto que os apolares desempenham papel importante na estruturação da parede celular (BASOVA, 2005; LOURENÇO, 2006).

O acúmulo e a composição de lipídios podem ser influenciados pelas condições nutricionais e ambientais utilizadas durante o cultivo. Os parâmetros principais são a quantidade de nitrogênio, a intensidade luminosa, o fotoperíodo, a temperatura, a concentração de dióxido de carbono e a salinidade do meio de cultivo (BRENNAN e OWENDE, 2010; MATA *et al.*, 2010). A deficiência de nitrogênio provoca uma interrupção no crescimento destes micro-organismos, mas o carbono continua sendo assimilado pelas células existentes, ocasionando um acúmulo no seu teor lipídico (BRENNAN e OWENDE, 2010).

A intensidade luminosa desempenha papel importante para o desenvolvimento das microalgas fotoautotróficas, pois o aumento da irradiação pode proporcionar maior quantidade de energia disponível para a realização da fotossíntese e, como consequência, aumento nas taxas de crescimento, na produção de biomassa e também na quantidade de óleo produzida. Porém, existe um ponto ótimo em relação à iluminação e, acima deste nível, pode ocorrer fotoinibição com o comprometimento do processo de fotossíntese e, em alguns, com o aumento do índice de morte celular (RICHMOND, 2004; SU *et al.*, 2011).

A temperatura do meio de cultivo pode afetar a composição, as taxas metabólicas e o crescimento destes micro-organismos. De um modo geral, a diminuição da temperatura (abaixo do ponto ótimo) favorece o acúmulo de ácidos graxos insaturados, enquanto que o aumento da temperatura leva a um acúmulo de ácidos graxos saturados. Porém, cada espécie necessita de uma temperatura distinta e os efeitos causados por alterações na temperatura também serão diferenciados (RENAUD *et al.* 1999; LOURENÇO, 2006; HU *et al.*, 2008).

A temperatura utilizada durante o cultivo pode ser controlada em cultivos em pequena escala realizados em salas climatizadas, mas, para os realizados ao ar livre, existem as variações entre os ciclos diurnos e noturnos, além das diferenças sazonais, dificultando assim a reprodutividade nos resultados de crescimento para uma mesma

espécie, mesmo que sob condições de cultivo aparentemente equivalentes (ZITTELLI *et al.*, 1999, LOURENÇO, 2006).

A maioria das microalgas apresentam melhores taxas de crescimento em pH neutro, porém, o uso de meios alcalinos ou ácidos podem favorecer o crescimento de algumas espécies. A adição de dióxido de carbono no meio contribui para o controle do pH, pois quando ele está em excesso, o meio de cultivo apresenta pH mais baixo e, conforme as microalgas o utilizam para a fotossíntese, ocorre um aumento gradativo do pH deste meio.

Tang *et al.* (2011b), observaram que o aumento da concentração de CO₂, na faixa de 0,03 a 50%, gerou aumento no teor de lipídeos da microalga *Chlorella pyrenoidosa*. Além disto, também foram observadas diferenças em relação à distribuição de ácidos graxos saturados e insaturados nesta fração lipídica. Segundo estes autores, o aumento da concentração de CO₂ pode levar a redução relativa na concentração de O₂ e, desta forma, afetar o processo de dessaturação das cadeias e, conseqüentemente, provocar modificações no teor de ácidos graxos poli-insaturados.

A concentração salina depende do meio que é utilizado para o cultivo. Para microalgas marinhas, utiliza-se a composição de sais próximos aos encontrados na água do mar, além de outros macronutrientes como nitrogênio, fosforo, ferro e silício. Cada um destes nutrientes tem uma função específica no desenvolvimento e crescimento das células. Segundo ZITTELLI *et al.* (1999), a utilização de diferentes teores de salinidade (20,0 e 33,0 g.L⁻¹) não afetaram a quantidade de ácido graxo produzido, mas houve uma modificação significativa no seu perfil. Porém, SU *et al.* (2011) avaliaram a produção de biomassa e o teor lipídico da microalga *Nannochloropsis oculata* em cultivos realizados com diferentes níveis de salinidade (0 a 70 g.L⁻¹). Foi observado que maiores concentrações salinas (70 g.L⁻¹) geraram uma redução na produção de biomassa, paralelamente a um aumento nos teores de lipídeos obtidos em relação a outras condições experimentais. Takagi *et al.* (2006) também observaram este mesmo comportamento em cultivos de *Dunaliella tertiolecta*, onde altas concentrações de sais causaram uma redução na produção de biomassa e um aumento da produção lipídica. Estes resultados indicam que estas microalgas são mais tolerantes à salinidade.

1.1.2 Microalga *Nannochloropsis oculata*

A microalga marinha *Nannochloropsis oculata* pertence à classe *Eustigmatophyceae*, a qual está dividida em oito gêneros e quinze espécies, todas unicelulares. Esta microalga não flagelada apresenta formato esférico ou levemente ovoide, com diâmetro médio de 2-4 μm e parede celular rígida (FIGURA 1). A estrutura química do seu produto de reserva ainda é desconhecida, porém, sabe-se que não se trata do amido (LOURENÇO, 2006; MURAKAMI e HASHIMOTO, 2009).

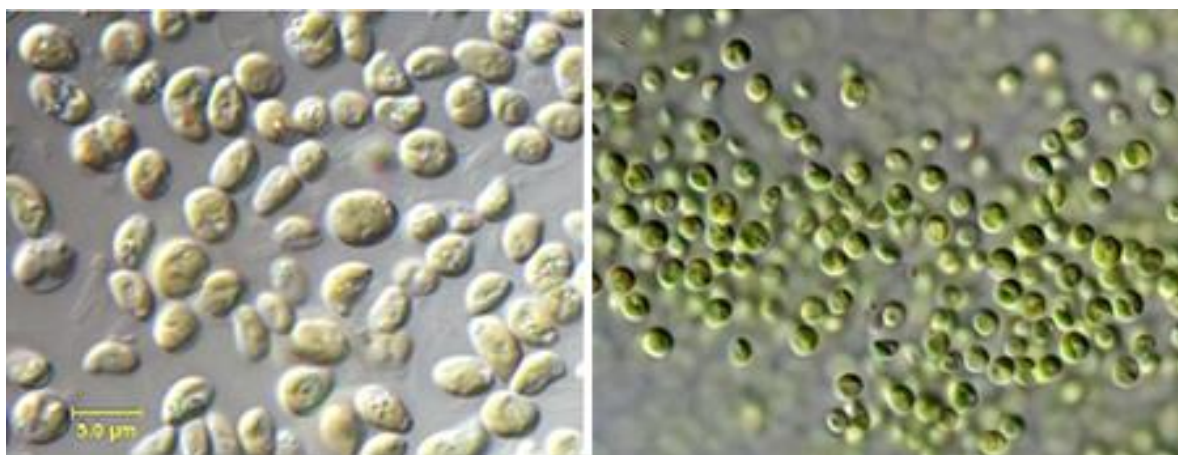


FIGURA 1 - IMAGENS AMPLIADAS DAS CÉLULAS DA MICROALGA *N. oculata*

FONTE: RCC, 2012.

Cultivos de *N. oculata* apresentam menor potencial de contaminação por bactérias e fungos devido à natureza salina de seus meios. Em virtude da facilidade de cultivo, tamanho pequeno, velocidade de crescimento e alto teor de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs, do inglês, *polyunsaturated fatty acids*), essas microalgas são bastante utilizadas na aquicultura como fonte de alimentos para peixes, rotíferos e também para criar o efeito verde em tanques de larvas. Além disto, esta alga pode apresentar alto teor lipídico, o que possibilita o seu uso como fonte para a produção de biodiesel e a obtenção de coprodutos de maior valor agregado, pois os PUFAs podem ser utilizados também para a prevenção e tratamento de uma ampla gama de doenças (ZITTELLI *et al.*, 1999; DURMAZ, 2007; LOURENÇO, 2006). Porém, as condições utilizadas durante o cultivo refletem na quantidade e na qualidade dos ácidos graxos.

Algumas diferenças podem ser observadas na TABELA 3, em que é apresentado o perfil lipídico obtido em diferentes estudos disponíveis na literatura.

TABELA 3 - PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS DA MICROALGA *N. oculata* OBTIDOS EM DIFERENTES ESTUDOS

ÁCIDOS GRAXOS	ESTUDOS					
	1 ^a	2 ^a	3 ^b	4 ^b	5 ^c	6 ^c
C14:0	5,5	5,0	11,0±1,3	5,2±0,1	8,1	----
C16:0	24,3	31,9	32,1±1,0	25,4± 0,4	25,4	26,9
C16:1	23,8	25,7	28,7±2,0	31,3±2,2	----	----
C18:0	----	----	----	----	6,6	7,2
C18:1n9	2,5	9,5	7,0±2,0	9,1±1,7	13,3	36,8
C18:1n11	----	----	1,7±0,3	2,1±0,3	----	----
C18:2	4,7	2,4	----	----	18,5	16,0
C18:3	----	----	----	----	12,6	3,2
C20:4	5,0	5,5	----	----	----	----
C20:5	33,0	18,3	15,1±1,2	26,8±3,3	13,3	7,4
Saturados (%)	29,8	36,9	43,1	30,6	40,1	34,1
Monoinsaturados (%)	26,3	35,2	37,4	42,5	13,3	36,8
Poli-insaturados (%)	42,7	26,2	15,1	26,8	44,4	26,6
Total (%)	98,8	98,3	95,6	99,9	97,8	97,5
Teor lipídico (%)	13,0	21,0	4,0±0,3	4,0±0,4	44,5	NI

FONTE: a) ZITTELLI *et al.*, 1999; b) BORGES *et al.*, 2011; c) SU *et al.*, 2011. NI, não informado.

ZITTELLI *et al.* (1999) inicialmente realizaram o cultivo da *N. oculata* em laboratório sob controle da temperatura e da irradiação (estudo 1) para, em seguida, transportar estas microalgas para um sistema fechado ao ar livre (estudo 2). Com esta alteração, foi obtido um aumento de 7 p.p no teor de óleo da microalga e várias modificações no perfil, conforme demonstram os dados da TABELA 3. Estes autores atribuíram as diferenças obtidas às elevadas taxas de irradiação solar durante o dia,

juntamente com as baixas temperaturas observadas durante a noite e no período da manhã. Porém, não foi possível determinar a influência de cada um destes fatores isoladamente.

SU *et al.* (2011), avaliaram o efeito do período de cultivo (em dias) da microalga *N. oculata* e o perfil dos ácidos graxos. Ao avaliar este perfil no início da fase de crescimento (estudo 5) e após 4 dias de cultivo (estudo 6), os resultados obtidos demonstraram que a quantidade de nutrientes suplementares está diretamente ligada à maior ou menor produção do ácido eicosapentanóico (EPA).

Além das condições utilizadas durante o cultivo, os procedimentos empregados para a agregação e recuperação da biomassa também são importantes. Borges *et al.* (2011), avaliaram o efeito da utilização de flocculantes neste processo. Após um período de cultivo de 15 dias, este foi dividido em partes, sendo que em um deles foi adicionado um flocculante polimérico aniônico (estudo 3) e no outro um polímero catiônico (estudo 4). Materiais poliméricos facilitam o processo de floculação devido a sua elevada massa molecular e as interações em função de sua carga, que pode ser negativa ou positiva. Apesar da repulsão eletrostática entre a carga negativa da parede celular das microalgas e os polímeros aniônicos, a presença de íons metálicos bivalentes (principalmente Ca^{2+}) podem agir como pontes, proporcionando maior interação entre os polímeros e a parede celular. Já os polímeros catiônicos neutralizam as cargas negativas da parede celular, reduzindo a repulsão entre as cargas e proporcionando a agregação destas (BOLTO e GREGORY, 2007).

BORGES *et al.* (2011), obtiveram o mesmo teor de lipídios para os dois ensaios (ensaio 3 e 4, vide TABELA 3) indicando que os flocculantes não interferem no processo de extração da fração oleosa, porém, o perfil dos ésteres graxos foi modificado. As principais diferenças observadas foram a redução e o aumento dos ácidos graxos C14:0 e C20:5, respectivamente. Os motivos que levaram as estas alterações ainda não foram esclarecidos. Além de todos estes parâmetros analisados, durante ou após o cultivo, as diferenças genéticas também devem ser consideradas, pois elas podem contribuir para a composição dos ácidos graxos (QUINN *et al.*, 2012).

Assim como em outras microalgas marinhas, a *N. oculata* também apresenta elevada quantidade de PUFA's. Portanto, os ésteres produzidos a partir desta microalga seriam suscetíveis à oxidação durante a armazenagem, limitando assim a sua utilização prática (VOOREN *et al.*, 2012; BRENNAN e OWENDE, 2010).

1.1.3 Microalga *Pseudochlorella pyrenoidosa*

Pseudochlorella pyrenoidosa é uma microalga dulcícola pertencente ao gênero *Pseudochlorella*, em que todas as espécies são unicelulares. Esta espécie apresenta formato esférico com diâmetro de 2-10 μm (FIGURA 2) e, como todas as espécies deste gênero, apresenta grande quantidade de clorofila.

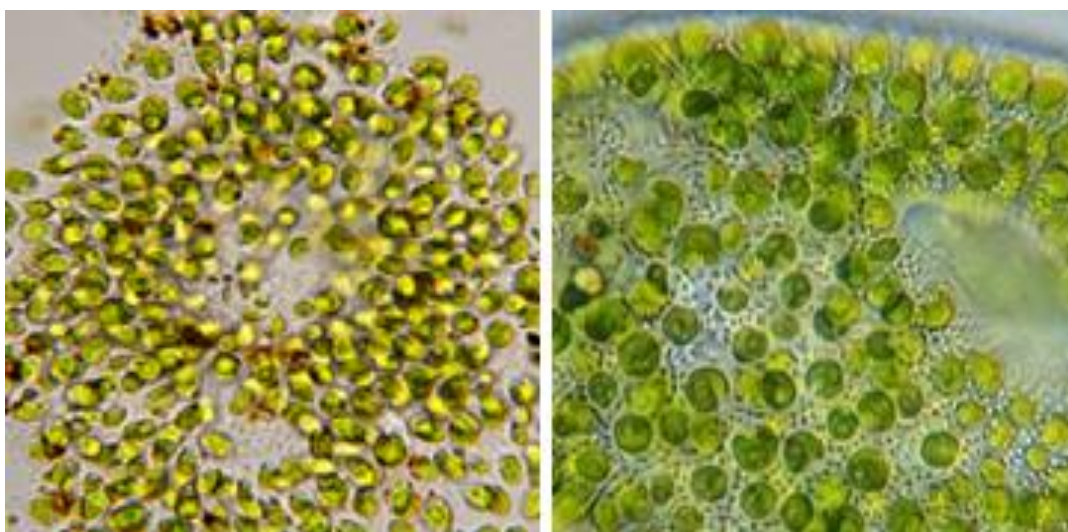


FIGURA 2 - IMAGENS AMPLIADAS DAS CÉLULAS DA MICROALGA *P. pyrenoidosa*.

O cultivo em grande escala de *Pseudochlorella* sp. foi iniciado no Japão no começo da década de 60 para a utilização como complemento alimentar. Este uso foi amplamente justificado pela sua composição química, que apresenta aproximadamente 45% de proteínas, 20% de gorduras, 20% de carboidratos, 10% de minerais e vitaminas, e 5% de fibras (BRENNAN e OWENDE, 2010).

Esta microalga pode apresentar de 2 a 22% de ácidos graxos em sua composição e o rendimento em sua produção está diretamente ligado às condições utilizadas durante o cultivo. Apesar dos diferentes teores de ácidos graxos, a sua análise qualitativa deve ser parecida, pois são características do gênero (PETKOV e GARCIA, 2007). Os resultados de alguns trabalhos disponíveis na literatura encontram-se apresentados na TABELA 4.

TABELA 4 - TEOR E PERFIL LIPÍDICO DA MICROALGA *P. pyrenoidosa*

ÁCIDOS GRAXOS	ESTUDOS					
	1 ^a	2 ^a	3 ^b	4 ^b	5 ^b	6 ^c
C14:0	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,2	1,5	1,1	0,4	0,7
C15:0	-----	-----	-----	-----	-----	0,4
C16:0	22,0 ± 4,0	25,0 ± 2,0	19,7	18,7	16,9	27,9
C16:1n7	2,0 ± 0,5	2,1 ± 0,5	-----	-----	-----	-----
C16:1n9	1,0 ± 0,5	0,4 ± 0,2	0,8	2,3	1,7	0,7
C16:2	7,0 ± 2,0	9,0 ± 2,0	6,9	6,9	5,6	1,1
C16:3	14,0 ± 4,0	9,0 ± 3,0	8,5	9,0	6,1	21,3
C17:0	-----	-----	-----	-----	-----	3,2
C18:0	0,8 ± 0,4	1,1 ± 0,4	1,2	1,1	1,6	0,8
C18:1n9	5,0 ± 2,0	8,0 ± 2,5	3,6	3,6	4,8	2,2
C18:1n11	1,5 ± 0,7	1,4 ± 0,2	-----	-----	-----	-----
C18:2	18,0 ± 1,5	27,0 ± 2,0	18,3	18,5	17,1	5,9
C18:3	27,0 ± 3,0	17,0 ± 2,0	39,3	39,1	34,7	35,8
C18:4	-----	-----	-----	-----	3,5	-----
Saturados (%)	23,3	26,5	22,4	20,9	18,9	33,0
Monoinsaturados (%)	9,5	11,9	4,4	5,9	6,5	2,9
Poli-insaturados (%)	66,0	62,0	73,0	73,5	67,0	64,1
Total	98,8	100,4	99,8	100,3	92,4	100,0
Teor lipídico (%)	NI	NI	20,2±1,0	7,3±0,2	1,7±0,2	26,8

FONTE: a) PETKOV e GARCIA, 2007; b) D'OCA *et al.*, 2011; c) TANG *et al.*, 2011b. NI, não informado.

PETKOV e GARCIA (2007) analisaram o perfil graxo desta microalga após a realização dos cultivos em meio fotoautotrófico, sem e com privação de nitrogênio

(estudos 1 e 2, respectivamente). Estes autores obtiveram os mesmos ésteres graxos em proporções diferentes, como pode ser observado na TABELA 4. Como o objetivo deste estudo foi somente a análise do perfil dos ésteres, a proporção de ácidos graxos na biomassa não foi informada, porém, espera-se que o meio com privação de nitrogênio tenha levado a um aumento na produção de lipídios (CHIU *et al.*, 2009).

Os solventes utilizados para a extração da fração lipídica de microalgas também podem ocasionar alterações no teor e na composição dos ácidos graxos extraídos. D'OCA *et al.* (2011) investigaram a eficiência de solventes com polaridade distintas. Entre os solventes utilizados neste estudo, estão a mistura clorofórmio:metanol (2:1, v/v), o etanol e o n-hexano. Os resultados obtidos com a utilização destes solventes estão apresentados na TABELA 4, onde foram identificados como os estudos 3, 4 e 5, respectivamente.

Nos estudos 3, 4 e 5 apresentados na TABELA 4, realizados por D'OCA *et al.* (2011), também não foram observadas grandes diferenças no perfil dos ácidos graxos, porém, o aumento da polaridade do solvente possibilitou um maior rendimento de extrato. Provavelmente, a microalga *P. pyrenoidosa* apresenta pequena quantidade de lipídios neutros e isto explicaria o menor rendimento obtido ao se utilizar o hexano como solvente. Em contrapartida, a mistura clorofórmio:metanol possibilitou maior quantidade de extrato porque esta mistura é capaz de extrair lipídios tanto polares quanto neutros.

Tang *et al.* (2011b) avaliaram o efeito do aumento da concentração de dióxido de carbono (de 0,03 a 50%) em relação ao crescimento e a produção de lipídios na *P. pyrenoidosa*. As maiores taxas de crescimento celular foram obtidas utilizando 10% de dióxido de carbono. No entanto, a maior quantidade de lipídios foi obtida ao se utilizar 50% de CO₂ (resultado apresentado na última coluna da TABELA 4). Por outro lado, o aumento nos níveis de CO₂ resultou em maior produção de ácidos graxos poli-insaturados, levando a uma alteração substancial no perfil obtido de ácidos graxos. Segundo estes autores, o aumento na concentração de CO₂ pode ter alterado a concentração de O₂ e, desta forma, o processo de dessaturação das cadeias, tendo como consequência uma elevação da quantidade de PUFAs produzidos.

Diferentemente dos outros estudos, Tang *et al.* (2011b) identificaram a presença de dois ácidos graxos com cadeia ímpar (C15:0 e C17:0) na composição lipídica da microalga *P. pyrenoidosa*. Porém, estes ácidos não fazem parte da composição característica desta microalga e, segundo Petkov e Garcia (2007), tal evidência indicaria

a ocorrência de contaminação do cultivo por bactérias. Os resultados obtidos por Tang *et al.* (2011b) também indicaram que a microalga apresenta grande potencial para a fixação do CO₂ proveniente de atividades industriais.

Diante de todos estes fatores, é cada vez maior a demanda por desenvolvimento na seleção, cultivo e caracterização destas microalgas, bem como a extração de seu material lipídico para obtenção de materiais graxos com alto rendimento.

1.2 SISTEMAS DE CULTIVO

1.2.1 Sistemas abertos

Os sistemas abertos foram os primeiros utilizados para a produção de microalgas em larga escala e continuam sendo os mais utilizados. Estes podem ser lagoas extensivas, tanques circulares ou circuitos fechados com a presença de pás, em conjunto conhecido como “raceways”, que realizam a ressuspensão da biomassa e a distribuição de micronutrientes no meio. Vários materiais podem ser utilizados para a construção destes sistemas, tais como areia, tijolo, cimento, fibra de vidro e geomembranas de polietileno de alta densidade (PEAD) ou policloreto de vinila (PVC). Para que não ocorra a contaminação da cultura ou suspensão de sedimentos, estes sistemas podem ser revestidos com PVC, mas este procedimento aumenta o investimento de capital. Alguns exemplos de sistemas abertos estão apresentados na FIGURA 3 (CHISTI, 2007; BRENNAN e OWENDE, 2010).

A confecção destes sistemas abertos é simples e ao ser utilizado para produção de biomassa em grande escala, se apresenta como o método mais acessível, pois é mais barato, envolve pouco gasto energético e é de fácil manutenção. Porém, a produtividade e a concentração da biomassa são inferiores às obtidas em outros sistemas, o que causa dificuldades na recuperação deste material. Outras desvantagens são a possibilidade de ataque por outras espécies de microalgas ou predadores e dificuldades no controle da temperatura (sobre variações diárias), do CO₂, do pH, da salinidade (influenciados pela evaporação do meio) e da eficiência da agitação do meio de cultivo (BRENNAN e OWENDE, 2010; LOURENÇO, 2006).



FIGURA 3 - SISTEMAS ABERTOS PARA CULTIVO DE MICROALGAS; A) LAGOAS; B) TANQUES CIRCULARES; C) SISTEMA RACEWAYS; D) DETALHE DAS PAS DE AGITAÇÃO EM RACEWAYS.

1.2.2 Sistemas fechados

A construção dos sistemas fechados foi iniciada na década de 50 para melhorar a eficiência na captação da luz e atualmente existem várias possibilidades de “design”, podendo ser construídos em colunas, estruturas tubulares ou em placas. Estes sistemas podem ser confeccionados utilizando vidro ou plástico em estruturas flexíveis ou rígidas, que podem estar dispostas em ambientes fechados (recebendo iluminação artificial) ou ao ar livre. Alguns exemplos de estruturas utilizadas atualmente estão apresentados na FIGURA 4 (CHISTI, 2007, BRENNAN e OWENDE, 2010).

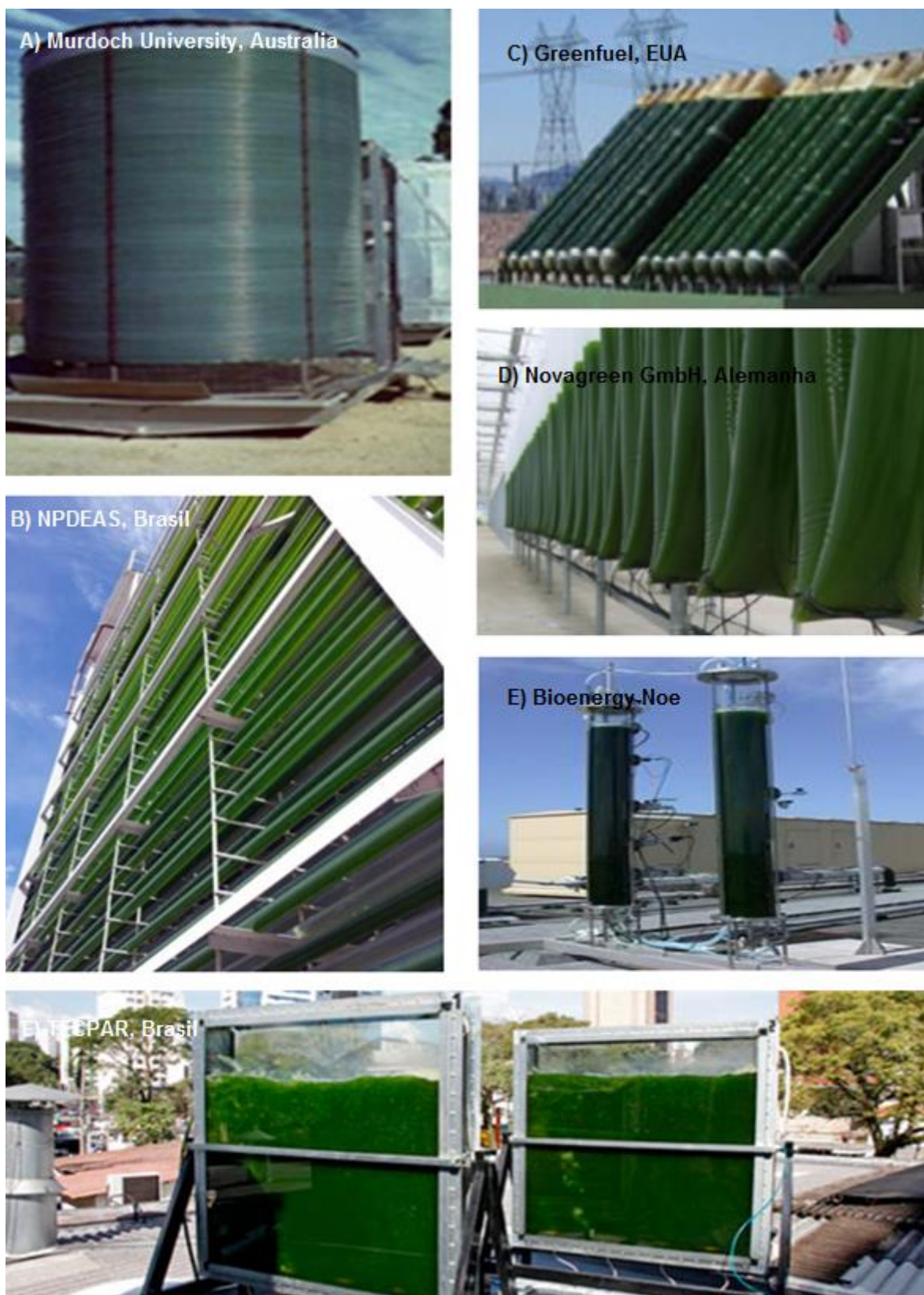


FIGURA 4- EXEMPLOS DE SISTEMAS FECHADOS QUE PODEM SER UTILIZADOS PARA CULTIVO DE MICROALGAS. A) SISTEMA TUBULAR HELICOIDAL; B) TUBULAR HORIZONTAL; C) TUBULAR VERTICAL INCLINADO; D) PLÁSTICOS FLEXÍVEIS; E) COLUNAS CILÍNDRICAS E F) PLACAS.

Nestes sistemas, pode ocorrer o acúmulo de biomassa (ou biofilme) nas paredes da estrutura, causando “autossombreamento”, ou ainda a elevação da temperatura, principalmente para os cultivos expostos a elevadas taxas de irradiação. Para impedir ou minimizar estes efeitos são utilizadas bombas elétricas que realizam a movimentação constante do meio de cultivo. O excesso de O₂ produzido no meio pode ocasionar redução na produtividade; portanto, este deve ser retirado através de uma coluna de desgaseificação (LOURENÇO, 2006; CHISTI, 2007).

As principais vantagens dos sistemas fechados são: (i) menor contaminação com outras espécies ou predadores; (ii) uso de iluminação solar ou artificial, possibilitando um maior controle da temperatura; (iii) diminuição no efeito de sombreamento; (iv) menor taxa de evaporação e de perda de CO₂. No entanto, estes sistemas ainda apresentam alto custo de construção e operação (ZITTELLI *et al.*, 1999; BRENNAN e OWENDE, 2010).

1.2.3 Sistemas híbridos

Os sistemas híbridos foram projetados com o objetivo de integrar sistemas abertos e fechados, buscando aperfeiçoar as vantagens e reduzir as desvantagens entre eles. O cultivo na fase inicial ocorre em um sistema fechado empregando ambiente rico em nutrientes e condições controláveis de pH e temperatura, proporcionando uma maior concentração da biomassa, sendo que o segundo passo é a transferência destes micro-organismos para os “raceways” (BRENNAN e OWENDE, 2010). Segundo alguns estudos, o procedimento de transferência de um sistema para outro causa estresse nas microalgas, pois no segundo sistema há redução dos nutrientes e maior incidência solar, proporcionando assim a obtenção de maior rendimento lipídico. Outros benefícios deste sistema incluem a menor contaminação dos cultivos por outros micro-organismos indesejáveis, além da possibilidade de obtenção da biomassa mais concentrada, em menor tempo e de forma contínua (HUNTLEY e REDALJE, 2006; RODOLFI *et al.* 2009).

1.3 EXTRAÇÃO DO ÓLEO DAS MICROALGAS

1.3.1 Extração convencional

Dentre as várias possibilidades existentes para a extração da fração lipídica das microalgas, as mais convencionais são as baseadas no uso de um ou mais solventes, geralmente em sistemas de extração exaustiva como o Soxhlet. O método desenvolvido por Folch e colaboradores (1957) é amplamente utilizado para este fim e está baseado na utilização da mistura clorofórmio:metanol (2:1, v/v), seguida da adição de uma solução salina de KCl para uma melhor separação das fases obtidas (aquosa e lipídica). Uma adaptação deste método foi realizada por Bligh e Dyer (1959) pela adição de água na mistura, em uma relação volumétrica entre clorofórmio:metanol:água de 2:1:0,8 (v/v). Tanto o método original como o modificado tem se mostrado muito eficientes, pois possibilitam a retirada de lipídios polares e não polares; porém, a extração também retira outros constituintes da biomassa, como pigmentos e outros hidrocarbonetos.

O sistema Soxhlet também tem sido eficiente para a extração de material lipídico, pois possibilita que a amostra seja percolada pelo solvente de forma constante e exaustiva, maximizando o processo de extração. Vários solventes têm sido utilizados neste sistema e dentre eles estão a mistura clorofórmio:metanol em diferentes proporções (1:1, 2:1 e 1:2, v/v), outras misturas como clorofórmio:isopropanol:água (2:1:1), hexano:etanol (1:2,5 e 1:0,9 v/v), etanol:água (1:1, v/v), hexano:isopropanol (1:1,5 e 3:2, v/v), dicloroetano:metanol (1:1, v/v) ou solventes puros como etanol, metanol e hexano (HODGSON *et al.*, 1991; GRIMA *et al.*, 1994; D'OCA *et al.*, 2011; VOOREN *et al.*, 2012).

Idealmente, o solvente deve possuir baixo custo e baixa toxicidade, além de boa seletividade. Além disto, os processos utilizados devem ser rápidos e econômicos, minimizando assim a quantidade de solvente necessária à extração. Como alternativa a estes métodos convencionais de extração, alguns autores têm testado métodos como a utilização de ultrassom (CONVERTI *et al.*, 2009; KOBERG *et al.*, 2011; D'OCA *et al.*, 2011), micro-ondas (LEE *et al.*, 2010; KOBERG *et al.*, 2011) ou solventes em estado supercrítico (HALIM *et al.*, 2011; SOH e ZIMMERMAN, 2011; TANG, *et al.*, 2011a; SANTANA *et al.*, 2012) para a obtenção de extratos com maior pureza em menor tempo de extração, paralelamente a uma redução na quantidade de solvente empregado.

1.3.2 Extração com fluido pressurizado

A extração de algumas classes de substâncias a partir de substratos sólidos é um problema que pode ser melhorado pela extração com solventes pressurizados (ESP, Extração com Solvente Pressurizado). O processo consiste em duas etapas: a obtenção do extrato e a separação do solvente. Primeiramente o solvente é introduzido no extrator e escoam por meio de um leito fixo formado pela biomassa, em seguida inicia o processo de solubilização dos compostos da matriz. Na segunda etapa, inicia-se a retirada da mistura soluto/solvente do extrator e, durante a sua coleta, ocorre a separação do solvente e dos solutos, uma vez que os solventes estarão na fase gasosa em temperatura ambiente (BRUNNER, 1994; PINTO *et al.*, 2006).

Durante a extração dos componentes solúveis de um produto natural, ocorrem os seguintes fenômenos: (a) a matriz sólida absorve o solvente e outros fluidos, os quais são adicionados para atuar sobre o processo de extração e, como consequência, a estrutura celular se dilata, sendo que a resistência ao transporte de massas diminui; (b) os componentes solúveis são dissolvidos pelo solvente; e (c) os componentes dissolvidos são transportados para a superfície do sólido, etapa em que a difusão é o mecanismo de transporte mais importante. Estes componentes, agora dissolvidos, formam a fase fluida e escoam para a saída do extrator (PINTO *et al.*, 2006; LANÇAS, 2002).

A utilização de fluidos pressurizados como solventes de extração pode ser vantajosa para a manipulação de amostras química e termicamente sensíveis, já que estes fluidos podem estar no estado supercrítico ou subcrítico. O estado supercrítico é resultado do aumento simultâneo da temperatura e da pressão de uma determinada substância, tornando a densidade próxima à dos líquidos, o que fortalece as suas propriedades de solvência. Por outro lado, a viscosidade, a difusividade e a tensão superficial apresentam valores próximos aos do estado gasoso, o que torna suas propriedades de transporte igualmente favoráveis. Como resultado, as extrações realizadas com solventes neste estado podem apresentar as seguintes características: (a) maior rendimento de extração, quando comparado aos processos convencionais; (b) não há retenção de solvente nos sólidos, pois quando o fluido é expandido, qualquer vestígio de solvente é evaporado; e (c) o soluto é obtido com alto grau de pureza, pois o solvente é evaporado, e dependendo do uso não necessita nenhum tratamento posterior

(CHEUNG, 1999; FREITAS *et al.*, 2008; NIMET, 2009; PINTO *et al.*, 2006).

Já o estado subcrítico ocorre quando somente um dos parâmetros (pressão ou temperatura) está acima do ponto crítico. Assim, o uso de fluidos subcríticos pode ser vantajoso, porque necessita de temperaturas e/ou pressões mais baixas, diminuindo o tempo, o consumo de solvente e o custo das extrações (LANÇAS, 2002; MEIRELES, 1999).

Vários fluidos podem ser utilizados como solventes em ESP, porém, o dióxido de carbono é o mais utilizado por ser pouco tóxico, não inflamável, de baixo custo e facilmente separável do soluto, além de apresentar ponto crítico em baixas temperaturas (31°C) e pressão moderada (72,9 bar).

O propano também tem sido utilizado em ESP, pois é relativamente barato, não deixa resíduos tóxicos, apresenta pressão crítica em 41,8 bar e temperatura crítica em 96,5°C. Apesar de não possuir todas as qualidades do CO₂, alguns estudos demonstraram que o propano apresenta poder de solvatação maior que o CO₂ e melhores resultados de rendimento da massa extraída em relação ao tempo de extração (ILLÉS *et al.*, 2000; FREITAS *et al.*, 2008; CORSO, 2008; PEDERSSETTI, 2008; NIMET, 2009).

Para aumentar a solubilidade e ou a seletividade do analito, podem-se adicionar modificadores a estas extrações, também chamados de cossolventes. A adição pode ser realizada na forma de um fluxo contínuo ou diretamente sobre a amostra. No entanto, é necessário ter cuidado com a quantidade de cossolvente adicionado, pois em concentrações elevadas a presença destes pode levar a condições subcríticas. Com o objetivo de melhorar a extração da fração lipídica, vários solventes orgânicos vêm sendo testados, dentre eles estão o éter de petróleo, a acetona, o etanol e o metanol (PINTO *et al.*, 2006; TANG *et al.*, 2011a).

Pelas razões expostas acima, a ESP vem sendo utilizada nas indústrias de alimentos, petroquímica e farmacêutica, e em iniciativas de monitoramento ambiental, além de várias outras aplicações como as investigadas neste estudo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve por objetivo estudar a extração com fluido pressurizado do óleo da microalga marinha *Nannochloropsis oculata* e da dulcícola *Pseudochlorella pyrenoidosa*, com a investigação da possibilidade de conversão do material lipídico obtido em monoésteres graxos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Este objetivo foi atingido por meio dos seguintes procedimentos:

- a) Determinação do teor de material lipídico presente em microalgas oriundas de diferentes cultivos;
- b) Conversão dos lipídeos presentes na biomassa em ésteres graxos e sua caracterização por métodos cromatográficos e espectrométricos;
- c) Desenvolvimento de um processo de extração do óleo de microalgas em sistema com fluidos pressurizados;
- d) Estudo da cinética de extração do óleo de microalgas em sistema com fluidos pressurizados, usando dióxido de carbono e propano, com e sem a adição de etanol como cossolvente;
- e) Avaliação do rendimento do processo de extração no sistema com fluidos pressurizados e comparação com os resultados do sistema convencional de extração (Soxhlet);
- f) Análise dos extratos obtidos nos dois processos de extração (pressurizada e Soxhlet) quanto ao rendimento e ao perfil dos monoésteres obtidos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

As espécies de microalgas utilizadas neste trabalho foram a microalga dulcícola *Pseudochlorella pyrenoidosa*, comercializada pela empresa Quimer[®], e a espécie marinha *Nannochloropsis oculata*, fornecida pelo Prof. Paulo Abreu do Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). O flocculante (policrilamida catiônica de alta massa molecular da marca FLOPAM[®]) utilizado foi fornecido pelo CENPES – PETROBRAS.

Para as extrações com extrator Soxhlet, foram utilizados álcool etílico P.A (99,5%), hexano P.A, clorofórmio e álcool metílico P.A, todos da Vetec[®]. Nas extrações com fluidos pressurizados, foram utilizados os seguintes solventes: propano e dióxido de carbono, ambos da White Martins[®] e álcool etílico P.A (99,5%, Vetec[®]).

Para as reações de esterificação dos materiais graxos, foram utilizados hidróxido de sódio e álcool metílico, ambos da Vetec[®], ácido sulfúrico (Merck[®]), cloreto de amônio (Vetec[®]) e *n*-heptano (J.T. Baker[®]), todos de especificação “para análise” (P.A.). Nas análises realizadas por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectroscopia de massas (CG-EM), foram utilizados padrões de monoésteres metílicos FAME Mix C₄-C₂₄ da Supelco[®] e *n*-heptano (J.T. Baker[®]) para diluição das amostras. As determinações de cloreto nas amostras de microalgas também utilizaram os seguintes reagentes: cloreto de sódio, nitrato de prata e cromato de potássio (Vetec[®]).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Cultivo

Foram recebidas 11 amostras da microalga *N. oculata* provenientes de cultivos realizados em diferentes sistemas de produção. Cada um dos lotes recebidos foi identificado por ordem alfabética (A a K) conforme o período de coleta (durante o ano de 2012). As informações sobre a data de cultivo, o tipo de sistemas de produção (“raceway”

ou circular) e o local (em estufa ou ao ar livre) onde foram realizados os cultivos estão apresentados na TABELA 5.

TABELA 5 - PERÍODO DE COLETA DE CADA UMA DAS AMOSTRAS FORNECIDAS PELA FURG (RIO GRANDE, RS).

AMOSTRA	PERÍODO DE COLETA	TIPO DE TANQUE	ESTUFA/ AR LIVRE
A	Anterior a julho	Circular	Ar livre
B	Anterior a julho	Circular	Ar livre
C	1ª quinzena de julho	Circular	Ar livre
D	1ª quinzena de julho	Circular	Ar livre
E	2ª quinzena de julho	Circular	Ar livre
F	2ª quinzena de julho	Circular	Ar livre
G	1ª quinzena de agosto	Raceway	Ar livre
H	2ª quinzena de agosto	Circular	Estufa
I	1ª quinzena de setembro	Circular	Estufa
J	1ª quinzena de setembro	Circular	Estufa
K	2ª quinzena de setembro	Circular	Estufa

A incidência solar média fora e dentro da estufa foi de 19.000 e 16.000 lux, respectivamente. As temperaturas médias de mínima e de máxima, registradas durante os períodos de cultivo, foram de 7 e 17°C, respectivamente.

Na infraestrutura do Instituto de Oceanografia da FURG, tanto os tanques “raceways” quanto os circulares possuem estrutura de ferro galvanizado coberta com geomembrana de dupla face. Cada um dos tanques “raceway” possui seis pás de PVC com 25 x 40 cm (FIGURA 5) e os tanques circulares apresentam dimensões de 2,9 m x 45 cm, com sistema de homogeneização realizado por um soprador central e sistema

de distribuição de ar confeccionado com tubos de PVC conectados a mangueiras perfuradas de uma polegada (FIGURA 5).



FIGURA 5 - ESTRUTURA DOS TANQUES UTILIZADOS NO CULTIVO DA MICROALGA *N. oculata*. DA ESQUERDA PARA A DIREITA, TANQUES DO TIPO “RACEWAYS”, TANQUES CIRCULARES E TANQUES DE FLOCULAÇÃO.

Todos os cultivos foram iniciados a partir de 800 L de inóculo de *N. oculata* (2327×10^4 células/mL) e 800 L de água salgada filtrada ($5 \mu\text{m}$), contendo 8 L de fertilizante (240 g de sulfato de amônio, 12 g de ureia e 40 g de superfosfato de cálcio), 280 mL de vitamina (constituída de cloridrato de tiamina, cloridrato de piridoxina e cianocobalamina) e 64 mL solução de cloreto de ferro (2,56 g de cloreto férrico). Posteriormente, foram efetuadas repicagens, conforme a observação da ocorrência de ciliados (aproximadamente a cada 12 dias).

Após este período, as microalgas foram transferidas para tanques cilíndricos com fundo cônico (FIGURA 5), em seguida, adicionou-se flocculante na concentração de 5 ppm para a realização do processo de agregação das microalgas. Em seguida, o material foi concentrado por centrifugação durante 45 min a 8000 rpm e posteriormente levado à estufa a 60°C para secagem. A biomassa seca foi então triturada com uso de liquidificador e armazenada em geladeira dentro de sacos plásticos fechados para a posterior caracterização, evitando assim a degradação por micro-organismos.

Após a caracterização das onze amostras, estas foram reunidas para a composição de um lote único, denominado MIX. A partir deste MIX realizaram-se os demais ensaios deste trabalho.

3.2.2 Dessalinização das amostras

Para a retirada do sal presente nas amostras da microalga marinha *N. oculata*, coletaram-se três frações com aproximadamente 10 g da amostra MIX e cada uma destas foi transferida para um tubo de centrifuga, onde foram adicionados 150 mL de água ultrapura. A suspensão foi agitada e depois centrifugada por 10 min a 3500 rpm. Em seguida, a água foi retirada e o processo de lavagem foi repetido por mais quatro vezes. A água retirada nas lavagens foi reservada para a determinação do teor de cloreto.

Após o processo de lavagem, retirou-se o excesso de água e as amostras foram congeladas com o auxílio de nitrogênio, para serem liofilizadas em seguida. Com o material obtido após a liofilização, calculou-se a massa de sal presente em cada amostra com base na diferença de massa antes e depois do processo de lavagem.

3.2.3 Determinação do teor de cloreto

A determinação da quantidade de cloreto nas amostras foi realizada utilizando o método argentométrico de Mohr (VOGEL, 1992). A água retirada nas lavagens da biomassa foi titulada com uma solução de nitrato de prata a 0,1 mol.L⁻¹, previamente padronizada com uma solução de cloreto de sódio com concentração conhecida. Uma solução de cromato de potássio a 2% foi utilizada como indicador nas titulações.

Após a determinação da concentração de cloreto em cada amostra, calculou-se a massa de cloreto de sódio correspondente e o seu teor nas amostras foi determinado em relação a massa inicial de biomassa, conforme a Equação 1.

$$\%NaCl = \frac{M_{NaCl\ obtido}(g) \cdot 100}{M_{inicial\ da\ amostra}(g)} \quad \text{Eq. 1}$$

3.2.4 Teor de umidade

Cerca de 200 mg de cada amostra foram transferidos para pesa-filtro previamente tarado, que foi acondicionado em estufa a 105°C por 2 h. Após este período,

pesou-se novamente o conjunto (pesa-filtro e amostra) e pela diferença de massa determinou-se o teor de umidade.

3.2.5 Extração utilizando sistema Soxhlet

Os ensaios foram realizados utilizando como solventes etanol, clorofórmio:metanol (2:1, v/v) e hexano, em extrações isoladas e independentes. Cerca de 20 g de microalga foram alocadas em um cartucho de papel de filtro e submetidas ao contato com o solvente durante 12 h. Ao final, o extrato foi levado ao evaporador rotativo para retirada do solvente e determinação da massa de extrato obtida. Em seguida, os extratos e os resíduos (material que permaneceu no cartucho de papel de filtro após a extração) foram submetidos à metodologia de Hartman e Lago adaptada para microescala (ANTONIOSI FILHO e LANÇAS, 1995) para obtenção dos monoésteres graxos. As etapas envolvidas neste processo estão apresentadas na FIGURA 6.

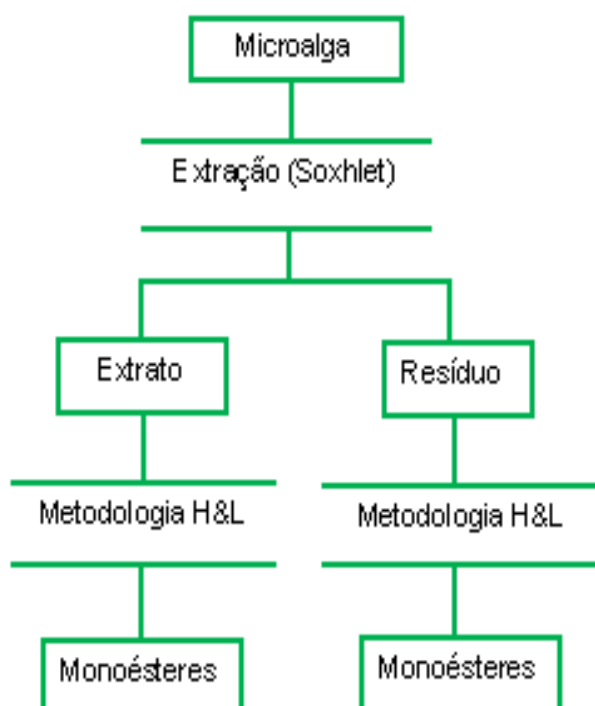


FIGURA 6 - ESQUEMA DAS ETAPAS PARA A EXTRAÇÃO DO MATERIAL LIPÍDICO UTILIZANDO SISTEMA SOXHLET E SUA CONVERSÃO A MONOÉSTERES GRAXOS.

3.2.6 Extrações com fluido pressurizado

Para realizar a extração do óleo das microalgas, a amostra foi pesada, alocada em um saco de tecido (algodão) e colocada no interior do vaso extrator. Nas extrações utilizando cossolvente (etanol), após a amostra ser acondicionada, a biomassa foi encharcada com o cossolvente na proporção mássica pré-estabelecida em relação à massa de biomassa.

Em seguida, a amostra foi confinada por 90 min a 80°C em pressão pré-estabelecida (150, 200 ou 250 bar) afim de que ocorresse a interação entre soluto e solvente. Após este período, deu-se início à extração coletando-se alíquotas a cada 10 min com uma vazão constante de solvente (2 mL.min⁻¹), a massa de cada alíquota e o gasto de solvente foram determinados para a construção da curva de extração. Ao final da extração, os extratos foram levados à estufa a 50°C para a secagem e posterior cálculo do rendimento mássico com base na somatória das massas de todas as alíquotas.

Parte do aparato desenvolvido para obtenção do extrato de microalgas está apresentado na FIGURA 7. Este sistema é constituído por um vaso de pressão de aço inox encamisado (AISI 304), com volume interno de 72 mL, dois banhos ultratermostáticos (QUIMIS® Q214S2 e SPENDER SCIENTIFIC®) e uma bomba seringa de alta pressão (TELEDYNE ISCO® 500D), juntamente com o seu controlador (TELEDYNE ISCO® D-SERIES PUMP CONTROLLER). O esquema dos componentes utilizados no processo de extração com fluidos pressurizados está apresentado na FIGURA 8.

A operação se dá basicamente pela liquefação do solvente em um condensador (CD-01), cujo fluido de resfriamento é água gelada (vinda do BANHO 1) e sua compressão é realizada por meio de uma bomba seringa (BS-01), sendo que a bomba e o condensador fazem parte de um único equipamento. Após pressurizado, o solvente é transferido para extrator encamisado (EXT-01), cujo aquecimento é feito pela circulação de água aquecida (fornecida pelo BANHO 2). A vazão do solvente é controlada por uma válvula do tipo agulha (V-3), que tem a finalidade de promover a expansão do gás, permitindo a separação entre o solvente e o extrato obtido.



FIGURA 7 - IMAGEM DO VASO DE PRESSÃO, CONTROLADOR E BOMBA SERINGA UTILIZADOS PARA AS EXTRAÇÕES COM FLUIDO PRESSURIZADO E, À DIREITA, UMA AMPLIAÇÃO DO VASO EXTRATOR.

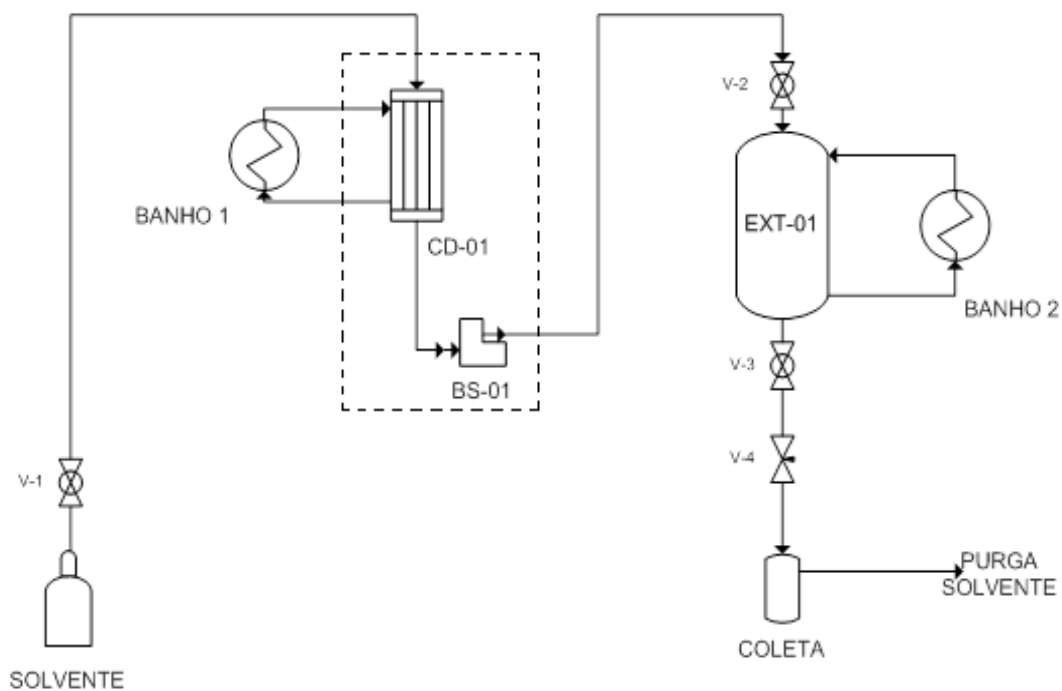


FIGURA 8 - ESQUEMA DO CONJUNTO DE EQUIPAMENTOS UTILIZADO NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO.

3.2.7 Cinética da extração do óleo das microalgas utilizando fluídos pressurizados

O teor mássico de extrato obtido em cada experimento foi determinado gravimetricamente e expresso em relação à massa inicial de biomassa utilizada no procedimento, conforme a Equação 2.

$$\text{Rendimento da Extração (\%)} = \frac{\text{Massa do extrato obtido (g)}}{\text{Massa inicial da amostra (g)}} \cdot 100 \quad \text{Eq. 2}$$

3.2.8 Esterificação dos ácidos graxos

A síntese dos monoésteres metílicos foi realizada pelo método desenvolvido por Hartman e Lago (1973) e adaptado para microescala por Antoniosi Filho e Lanças (1995). Inicialmente, 200 mg de amostra (microalga *in natura*, extrato oleoso ou resíduo das extrações) foram transferidos para um tubo de ensaio com tampa rosqueável, junto a 3 mL de solução de NaOH 0,5 mol/L em metanol. Em seguida, os tubos foram fechados e levados ao aquecimento a 90°C por 10 min. Após o resfriamento em temperatura ambiente, adicionou-se 9 mL da solução esterificante, preparada a partir da mistura de 2 g de cloreto de amônio, 60 mL de metanol e 3 mL de H₂SO₄ concentrado, e os tubos de ensaio permaneceram sob aquecimento a 90°C por 10 min. Transcorrido este período, deixou-se resfriar até a temperatura ambiente e em seguida adicionou-se 5 mL de n-heptano e 2-10 mL de água deionizada. A mistura foi agitada e a fração heptânica, rica em monoésteres, foi recuperada após separação de fases.

A determinação do teor mássico de ésteres obtidos, ou do rendimento de esterificação obtido no processo, foi realizada levando em conta a massa de ésteres obtidos e a massa da amostra submetida ao ensaio (microalga *in natura*, extrato ou resíduo da extração), conforme Equação 3.

$$\text{Teor de Ésteres (\%)} = \frac{\text{Massa de ésteres obtida (g)}}{\text{Massa inicial da amostra (g)}} \cdot 100 \quad \text{Eq. 3}$$

3.2.9 Determinação da composição em ácidos graxos nas microalgas *P. pyrenoidosa* e *N. oculata*

Os produtos de esterificação do método adaptado de Hartman e Lago (1973) foram analisados em cromatógrafo Varian® 450-GC acoplado a um detector de massas Varian® 320-MS (CG-EM), com ionização por impacto de elétrons a 70 eV e uma coluna capilar VF-5MS (30 m x 0,25 mm, com espessura de filme de 0,25 µm). Hélio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão constante de 0,8 mL.min⁻¹. O volume de injeção foi de 2,0 µL em razão de divisão de amostra (“split”) de 1:50. As temperaturas do injetor, do “manifold”, da linha de transferência e da fonte de íons foram ajustadas para 315, 40, 280 e 300°C, respectivamente. A pressão na cabeça da coluna foi de 2 mmTorr e esta foi programada para operar inicialmente a 100°C por 1 min, seguida de aquecimento a 10°C.min⁻¹ até atingir 200°C, permanecendo nesta temperatura por 2 min para depois ser novamente aquecida a 3,5°C.min⁻¹ até atingir 260°C, onde permaneceu até o final da análise (37 min). Os espectros foram coletados a cada 0,5 segundo, na faixa de 32 a 380 m/z.

Para a identificação dos ésteres graxos, foi realizada a comparação com os tempos de retenção dos padrões de monoésteres metílicos da mistura FAME C₄-C₂₄ da Supelco®, juntamente à análise dos seus respectivos espectros de massas, que foram comparados com os dados disponíveis na biblioteca NIST (National Institute of Standards and Technology) do equipamento. A quantificação dos monoésteres foi realizada por normalização de área.

Em alguns casos as análises foram feitas num cromatógrafo de fase gasosa (CG-FID) utilizando a coluna Carbowax 20M com 30 m, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme. A programação de temperatura foi de iniciada em 60°C por 2 minutos, com alteração para 10°C.min⁻¹ até atingir 200°C, e em seguida alterado para 5 °C.min⁻¹ até 240°C a qual foi mantida por 7 minutos. As atribuições dos tempos de retenção foram realizadas em comparação com padrões de referência.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MICROALGA *Pseudochlorella pyrenoidosa*

Para se determinar a quantidade de lipídios da microalga *P. pyrenoidosa*, realizou-se a metodologia modificada de Hartman e Lago na biomassa *in natura*, obtendo-se 104,7 mg de éster.g⁻¹ de biomassa, resultado que se demonstrou compatível com o esperado para esta microalga seca. Segundo estudos realizados por D'Oca *et al.* (2011) e Tang *et al.* (2011b), o teor lipídico desta microalga pode variar de 0,4 a 27% e tais diferenças podem ocorrer principalmente por variações nas condições de cultivo e no processo de extração do óleo. Esta microalga foi obtida comercialmente, portanto, não foi possível analisar a influência dos parâmetros de cultivo e o reflexo destes na quantidade de monoésteres obtida.

Após a determinação mássica da quantidade de monoésteres, uma alíquota da fração heptânica foi injetada no CG-EM para se determinar o perfil dos monoésteres da microalga em questão. Após a obtenção do cromatograma (FIGURA9), os componentes foram identificados por meio da análise de seus tempos de retenção e de seus espectros de massas e o perfil obtido apresentou-se de acordo com o esperado para esta microalga (PETKOV e GARCIA, 2007, D'OCA *et al.*, 2011; TANG *et al.*, 2011b).

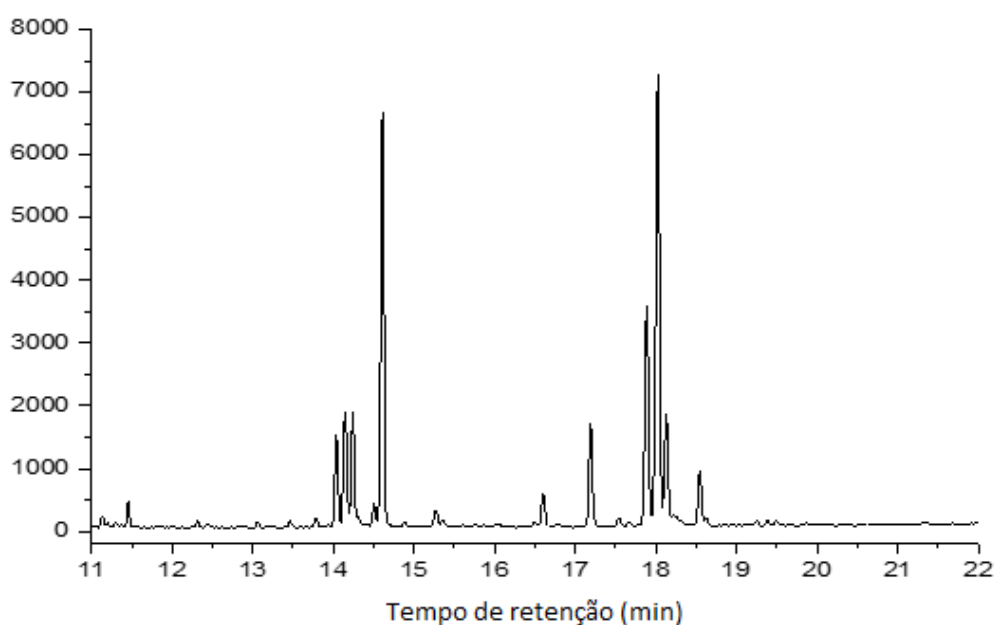


FIGURA 9 - PERFIL DOS MONOÉSTERES OBTIDOS PARA A MICROALGA *P. pyrenoidosa*

Na FIGURA 10 é possível verificar a porcentagem relativa de cada éster, sendo que os majoritários foram o linolenato (C18:3), seguido do palmitato (C16:0) e do linoleato (C18:2) de metila, nas proporções de 28,8, 25,2 e 14,5%, respectivamente. A presença de ésteres com cadeias ímpares não é característica para microalgas, porém, o heptadecanoato de metila (C17:0) estava presente nesta amostra, indicando que a cultura pode ter sido parcialmente contaminada por bactérias.

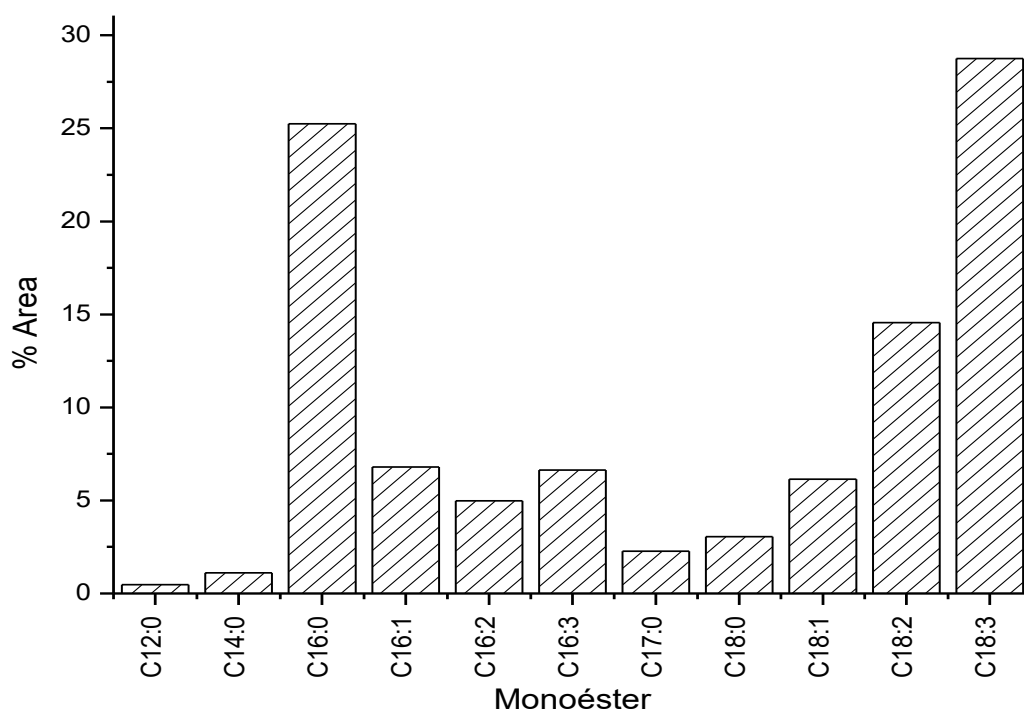


FIGURA 10 - QUANTIFICAÇÃO DA PORCENTAGEM DE ÁREA PARA CADA UM DOS MONOÉSTERES PRESENTE NA MICROALGA *P. pyrenoidosa*

Segundo Petkov e Garcia (2007), cada espécie de microalga apresenta um perfil de ácidos graxos característico. Portanto, os diferentes processos utilizados para o cultivo ou para a extração dos lipídios alteram somente a concentração de cada ácido graxo, mas não o seu perfil.

A amostra apresentou 54,9% de monoésteres poli-insaturados, 32,2% de saturados e 12,9% de monoinsaturados. Ao se comparar estes dados com os estudos realizados por Petkov e Garcia (2007), D'Oca *et al.* (2011) e Tang *et al.* (2011b), vide TABELA 4, verifica-se que houve uma redução na quantidade de PUFAs e um aumento na quantidade de ésteres saturados e monoinsaturados. As condições utilizadas durante

o cultivo que podem ocasionar estas diferenças são o aumento da temperatura, limitações no fornecimento de dióxido de carbono ou ainda o emprego de maiores períodos de iluminação (relação entre ciclos diurnos e noturnos) e ainda aumento da intensidade luminosa (ZITTELLI *et al.*, 1999; TANG *et al.*, 2011b; SUKENIK, 1991).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS DIFERENTES LOTES DA MICROALGA *Nannochloropsis oculata*

Inicialmente, amostras de onze cultivos da *N. oculata* foram secas e armazenadas em embalagens fechadas, sendo verificado, mesmo que somente de forma visual, se existia nas mesmas alguma degradação aparente por fungos ou outros micro-organismos. As diferenças observadas foram em relação à cor (algumas eram um pouco mais escuras que outras) e, em alguns lotes, havia a presença de pequenos pedaços de papel alumínio. Em seguida, foi realizada a determinação do teor de umidade residual, procedimento que foi realizado em triplicata e o seu resultado está apresentado na TABELA 6. Conforme pode ser observado, o teor de umidade nas amostras variou de 3,1 a 12,7%, tendo apresentado diferenças até mesmo para lotes produzidos na mesma data de cultivo como, por exemplo, entre as amostras C (7,8%) e D (11,9%).

Posteriormente a esta análise, realizou-se a quantificação do material graxo por meio da esterificação pelo método modificado de Hartman e Lago (ANTONIOSI FILHO e LANÇAS, 1995). A quantidade de ésteres graxos na biomassa seca variou de 21,0 a 88,6 mg.g⁻¹ em relação à massa seca, como pode ser observado na TABELA 6.

Os resultados obtidos demonstraram que diferenças no teor de umidade não justificaram as diferenças observadas no teor de ésteres de cada amostra. Portanto, estas diferenças em relação ao teor de ésteres podem ser resultado de alterações tais como luminosidade, pH e salinidade no processo de cultivo desta microalga.

Vale ressaltar que, durante o cultivo da amostra G, foi observada a ocorrência de contaminação por cianobactérias na superfície do tanque “raceway”, o que pode ter ocasionado redução na produção de material graxo. Além disso, outros fatores ambientais podem ter ocasionado a menor produção de material graxo em amostras como a F (2,1 %), mas é necessário lembrar que não foi realizado nenhum procedimento

para a retirada do sal destes micro-organismos e que isto pode ter ocasionado um erro na determinação do teor do material graxo.

TABELA 6 - RESULTADO DO TEOR DE UMIDADE E PORCENTAGEM MÁSSICA DE ÉSTERES GRAXOS EM CADA UMA DAS ONZE AMOSTRAS DE *N. oculata*.

AMOSTRA	TEOR DE UMIDADE (% m/m)	TEOR DE ÉSTERES (mg/g)	
		BASE ÚMIDA	BASE SECA
A	4,8±0,3	84,3±7,4	88,6
B	12,7±0,2	43,6±2,5	49,9
C	7,8±0,1	46,4±4,7	50,3
D	11,9±0,6	55,8±1,8	63,4
E	7,3±0,1	59,5±0,8	64,2
F	5,2±0,3	19,9±2,7	21,0
G	8,4±0,1	34,4±2,0	37,6
H	3,1±0,1	30,6±1,8	31,5
I	5,1±0,2	62,4±3,1	65,7
J	7,8±1,3	43,2±7,6	46,8
K	4,9±0,1	50,9±5,2	53,6

A análise cromatográfica dos ésteres obtidos foi sempre realizada em corridas cromatográficas de 37 min (FIGURA 11). Porém, após 23 min, todos os monoésteres já haviam sido eluídos. Portanto, para uma melhor visualização, o cromatograma foi apresentado com menor tempo de análise.

O cromatograma da amostra A revela a presença de aproximadamente 16 monoésteres em cada amostra, que foram identificados por comparação de tempos de retenção e por análise dos espectros de massa frente à biblioteca NIST do equipamento. Este perfil qualitativo foi equivalente em monoésteres derivados de amostras oriundas dos 11 cultivos de *N. oculata*, porém, houve diferenças na proporção relativa de cada monoéster presente nas amostras, sendo que a média e o desvio padrão para cada

analito foram calculados e estão apresentados na FIGURA 12. As amostras apresentaram composição formada majoritariamente pelos seguintes monoésteres metílicos: miristato (C14:0), palmitato (C16:0), palmitoleato (C16:1), oleato (C18:1) e o *cis*-5,8,11,14,17-eicosapentaenoato de (EPA, C20:5) metila, sendo a porcentagem média apresentada por cada um dele foi de 6,0, 25,5, 19,6, 7,3 e 12,5%, respectivamente, perfazendo 70,9% do total. A predominância destes monoésteres também foi identificada nos estudos de Zittelli *et al.* (1999), Campos *et al.* (2010), Vauchinski *et al.* (2010) e Borges *et al.* (2011), demonstrando uma distribuição ou perfil característicos para esta microalga.

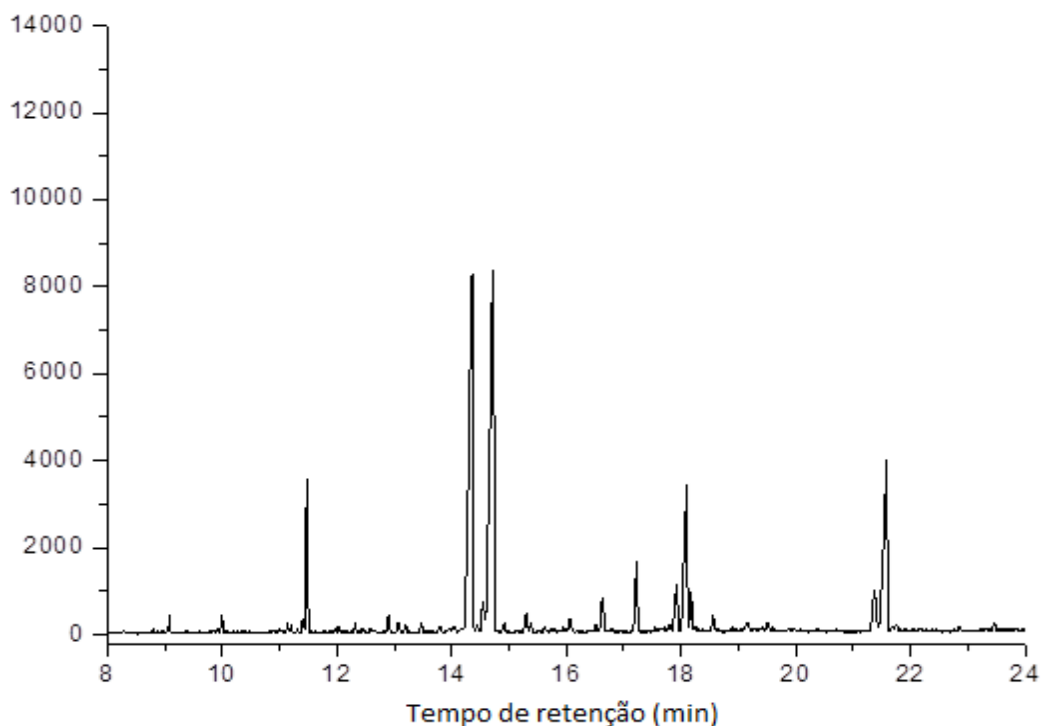


FIGURA 11 - PERFIL DOS MONOÉSTERES OBTIDOS PARA A MICROALGA *N. oculata*

Também foi observada a presença, em quase todos os lotes, de cerca de 1,0% de pentadecenoato de metila (C15:0), indicando a provável ocorrência de contaminação nestas amostras. Os cultivos realizados ao ar livre estão mais sujeitos à contaminação por bactérias e, em alguns casos, isto pode ser verificado pela presença de monoésteres com um número ímpar de átomos de carbono na cadeia (PETKOV e GARCIA, 2007).

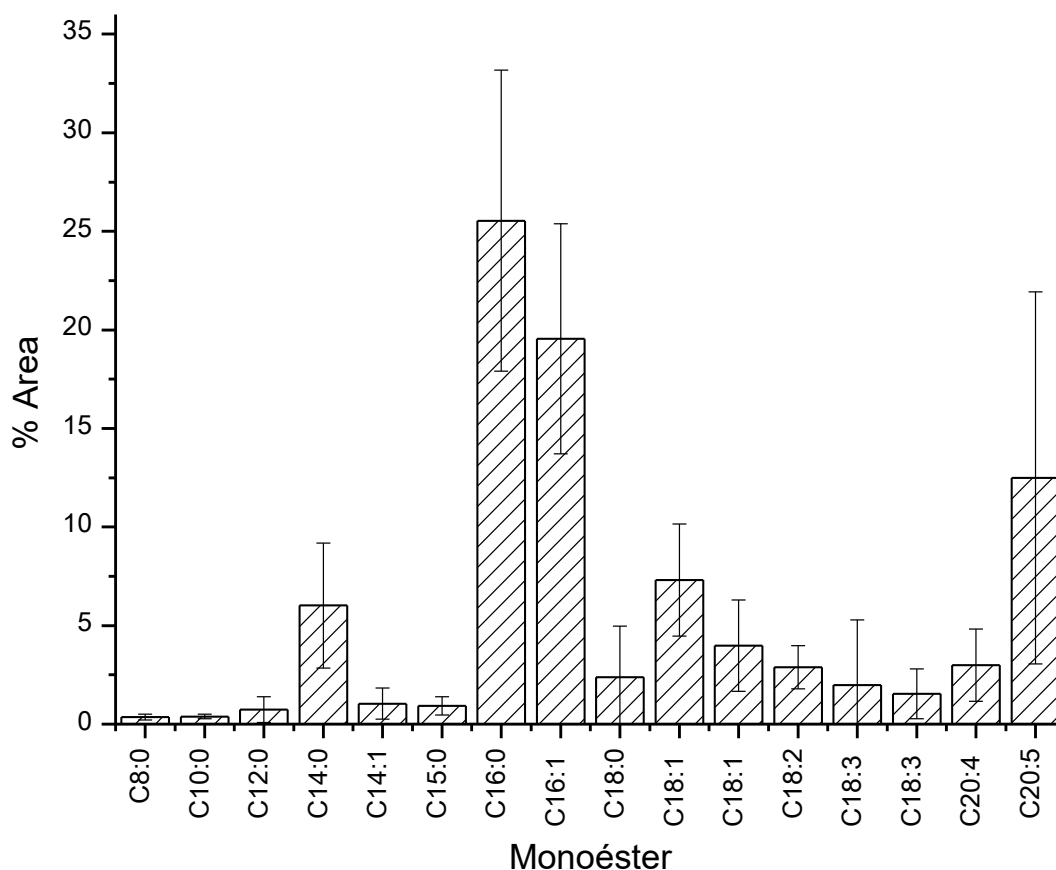


FIGURA 12 - RESULTADO DA MÉDIA E DESVIO PADRÃO EM RELAÇÃO À ÁREA DOS MONOÉSTERES PRESENTES NAS AMOSTRAS DA MICROALGA *N. oculata* (MONOÉSTERES PRESENTES EM MAIS DE DUAS AMOSTRAS E/OU ACIMA DE 0,2% DE ÁREA).

Todos os cultivos foram submetidos ao mesmo procedimento de análise, porém, a utilização de sistemas de produção abertos e fechados fez com que cada amostra apresentasse proporções distintas para cada monoéster. Isto porque, devido à infraestrutura local, não foi possível controlar as condições ambientais, tais como incidência solar, temperatura, níveis de evaporação (e como consequência alterações no pH e na salinidade do meio).

Em seguida, foram realizadas seis amostragens da amostra denominada MIX e a quantificação do material graxo foi realizada utilizando a mesma metodologia modificada de Hartman e Lago (ANTONIOSI FILHO e LANÇAS, 1995). Como resultado, obteve-se $51,0 \pm 3,0$ mg de éster/g de biomassa seca, sendo que o perfil cromatográfico dos monoésteres encontra-se apresentado na FIGURA 13.

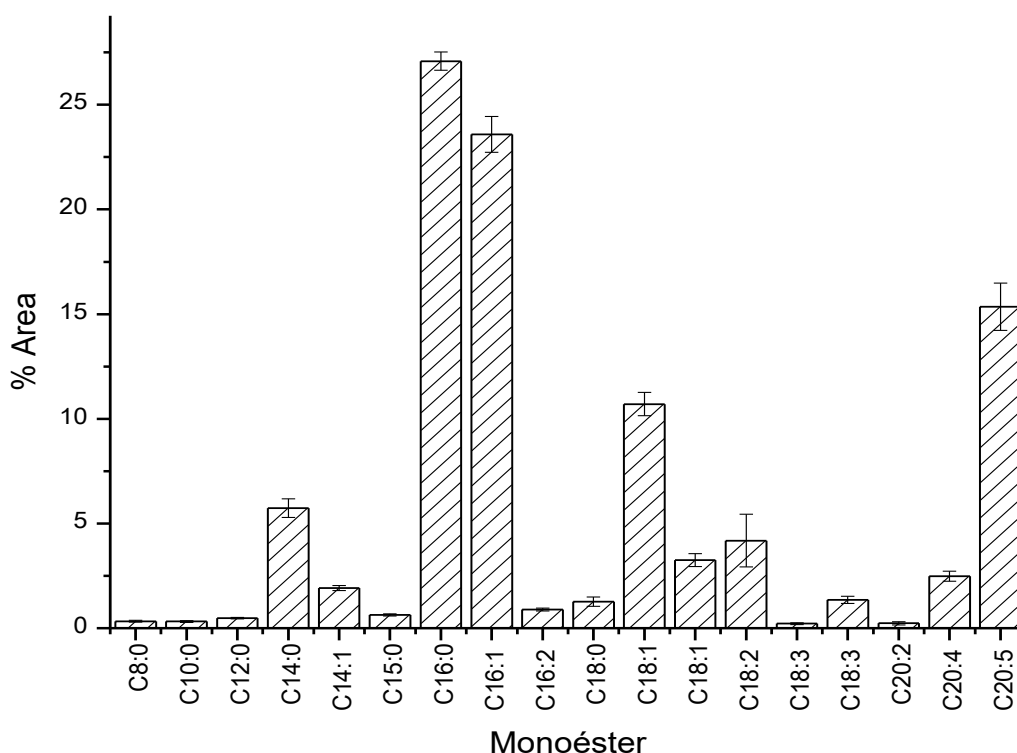


FIGURA 13 - RESULTADO DA MÉDIA E DESVIO PADRÃO EM RELAÇÃO À ÁREA DE CADA UM DOS MONOÉSTERES PRESENTES NO MIX

Comparativamente aos dados anteriores, esta nova análise demonstrou a presença de dois monoésteres que não tinham sido observados anteriormente (vide FIGURA 12), sendo estes os monoésteres metílicos dos ácidos *7,10*-hexadecadienóico (C16:2) e *11,14*-eicosadienóico (C20:2), com área percentual de 0,88 e 0,23%, respectivamente. Como cada um dos lotes possuía uma massa diferenciada, variando de 70 a 538 g, ao misturá-los, foi evidenciada a presença de alguns monoésteres que só haviam sido identificados em uma ou duas das amostras que compuseram a mistura. A composição da amostra MIX também levou a uma redução do desvio padrão da análise para as seis replicatas realizadas e todos os analitos nela identificados. Neste sentido, os monoésteres majoritários foram os mesmos observados nas análises dos lotes individuais, porém, com pequenas diferenças na proporção de cada um deles.

A presença de ácidos graxos poli-insaturados é bastante comum em diversas espécies de microalgas marinhas e, neste MIX, eles totalizaram 24,8% do total de ácidos graxos presentes na amostra. Quantidades próximas foram obtidas por Campos *et al.* (2010) e Borges *et al.* (2011) em seus estudos com a microalga *N. oculata*, em que monoésteres com duas ou mais ligações duplas corresponderam a 26,7 e 26,8% da

amostra, respectivamente. Porém, a proporção de PUFA desta microalga pode ser bem mais elevada, chegando até a 44% da composição da fração lipídica, pois o seu acúmulo está sujeito a variações nos fatores ambientais e nutricionais envolvidos durante a etapa de cultivo e recuperação da biomassa produzida (ZITTELLI *et al.*, 1999; SU *et al.*, 2011).

4.3 DESSALINIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE *N. oculata*

Neste estudo, as microalgas foram cultivadas em água salgada e as biomassas obtidas foram floculadas para depois serem secas sem terem sido submetidas a nenhuma lavagem para a retirada do cloreto de sódio ou de outros sais presentes no meio. Portanto, a presença de sal resultaria em uma subestimação do teor de lipídios da microalga, já que parte de sua massa corresponderia aos materiais inorgânicos hidrossolúveis. De fato, a avaliação das biomassas de microalgas por microscopia ótica revelou a presença de uma quantidade significativa de sais, observados majoritariamente na forma de cristais (FIGURA 14).

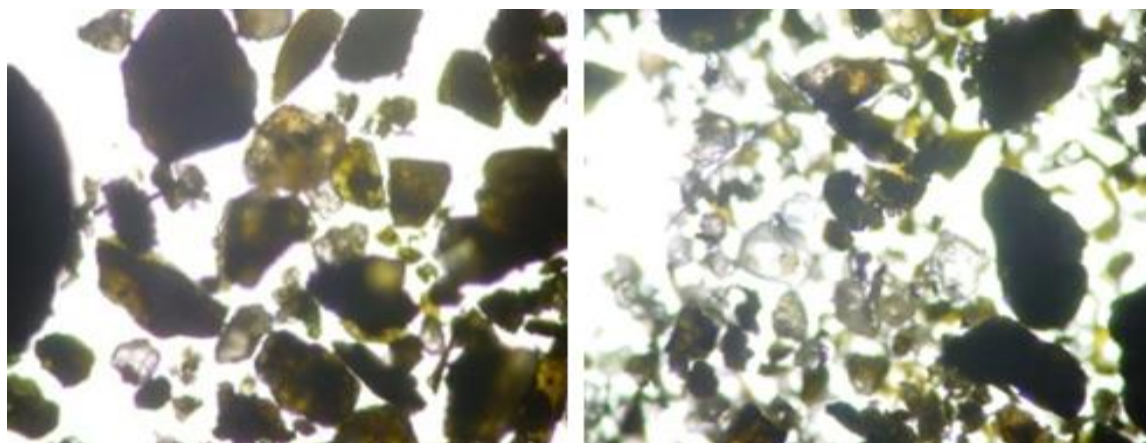


FIGURA 14 - AMOSTRAS DO MIX IN NATURA EVIDENCIANDO A PRESENÇA DE SAIS

Para a dessalinização deste material, procedeu-se à lavagem exaustiva da microalga com água deionizada e o teor de cloreto foi quantificado nos extratos aquosos pelo método de Mohr (VOGEL, 1992) para estimar a quantidade de cloreto de sódio (NaCl) presente nesta fração inorgânica.

Após lavagem exaustiva, as amostras lavadas foram congeladas com o auxílio de nitrogênio líquido e em seguida liofilizadas para que o seu teor de sólidos totais fosse

determinado. A redução da massa foi então calculada por diferença, resultando em um valor médio de 59,40%. Estes resultados demonstram que quase 60% da biomassa desta microalga correspondem a cloreto de sódio e outros sais, causando com isto um erro expressivo na quantificação no teor de monoésteres presente na biomassa produzida. Por outro lado, o teor médio de NaCl presente na biomassa, calculado com base nas determinações do íon cloreto em solução, foi de 45,25 % em relação à massa seca de microalgas, o que indica a presença de mais 14,15% de outros componentes hidrossolúveis, conforme os dados da TABELA 7.

TABELA 7 - QUANTIFICAÇÃO DA REDUÇÃO DA MASSA DAS AMOSTRAS APÓS A LAVAGEM E LIOFILIZAÇÃO.

AMOSTRA	M _i (g)	M _f (g)	% NaCl	% SOLÚVEIS	% REDUÇÃO MÉDIA
MIX	10,2957	4,2607	48,41	10,21	
MIX	10,2759	4,1486	45,96	13,66	59,40
MIX	10,2859	4,1189	41,38	18,58	

M_i = massa de biomassa inicial; M_f = massa de biomassa recuperada após dessalinização

Para se verificar a influência destes sais na quantificação dos monoésteres desta biomassa, realizou-se a metodologia de esterificação nas amostras dessalinizadas e liofilizadas e o resultado em massa de monoésteres metílicos foi de $139,0 \pm 7,0$ mg de éster/g biomassa seca. A análise do teor de monoésteres no MIX, realizadas anteriormente sem nenhum processo de lavagem, indicava a presença de aproximadamente $51,0 \pm 3,0$ mg de éster/g de biomassa seca, ou seja, 36,7 % do teor encontrado para as amostras após o processo de lavagem. Assim, o rendimento de monoésteres graxos na amostra não dessalinizada foi proporcional aos valores esperados (aproximadamente 40%) com base no seu teor de materiais inorgânicos. Portanto, optou-se por não lavar esta biomassa para reduzir a possibilidade de contaminações e também evitar a complexidade usualmente envolvida no processo de sua secagem para posterior submissão aos diferentes processos de extração.

4.4 EXTRAÇÃO UTILIZANDO EXTRATORES SOXHLET

As extrações com sistema Soxhlet foram realizadas em triplicata utilizando hexano, clorofórmio:metanol (2:1, v/v) e etanol em ensaios independentes para se verificar qual destes sistemas seria mais apropriado para a retirada da fração lipídica destas microalgas (*P. pyrenoidosa* e *N. oculata*). Estes solventes foram escolhidos para se avaliar a influência da diferença de polaridade na quantidade e qualidade do extrato obtido. O hexano é um solvente normalmente utilizado para a extração de óleo e, por sua baixa polaridade, extrai principalmente lipídios neutros (BRUM *et al.*, 2009; D'OCA *et al.*, 2011). A mistura clorofórmio:metanol é amplamente utilizada na literatura e tem demonstrado bons resultados na extração lipídica de microalgas, pois é capaz de retirar lipídios neutros e polares, permitindo a obtenção de rendimentos mais elevados. Por fim, utilizou-se o etanol devido a sua elevada polaridade, o que contribui para a retirada de lipídios polares (GRIMA *et al.*, 1994; D'OCA *et al.*, 2011; SOARES, 2010). Outros fatores que contribuíram para a escolha do etanol foram a sua menor toxicidade, a possibilidade de realização de uma conversão *in situ* e o fato de ser um solvente proveniente de fonte renovável. Após o período de extração, todos os extratos e seus respectivos resíduos (biomassa residual que permanece no cartucho de extração) foram submetidos à metodologia modificada de Hartman e Lago (ANTONIOSI FILHO e LANÇAS, 1995) para se quantificar o teor de monoésteres obtido em cada extrato e a quantidade que permaneceu retida nos resíduos.

4.4.1 Extrações utilizando a microalga *P. pyrenoidosa*

As extrações foram iniciadas para a microalga *P. pyrenoidosa* e os resultados obtidos para cada etapa estão apresentados na TABELA 8. A extração utilizando a mistura de clorofórmio:metanol (2:1, v/v) possibilitou a retirada de uma maior quantidade de extrato (8,7 g/100 g), porém, outras substâncias foram extraídas juntamente da fração lipídica. Isto fica claro ao observarmos que apenas 36,1% do extrato foram passíveis de esterificação. O etanol possibilitou a retirada de 7,6 g/100 g de biomassa de extrato, sendo que 42,8% deste total foram convertidos a monoésteres. Já o hexano extraiu uma pequena quantidade de extrato (3,2 g/100 g), porém, a baixa polaridade deste solvente

possibilitou uma maior seletividade no material extraído, pois 49,1% pode ser levado a ésteres. Este baixo rendimento para a extração com hexano está de acordo com os estudos de Basova (2005), que demonstrou que os lipídios neutros estão em menor proporção em diversas espécies de microalgas.

TABELA 8 - RENDIMENTO NORMALIZADO DAS EXTRAÇÕES DA MICROALGA *P. pyrenoidosa* UTILIZANDO SISTEMA SOXHLET E DIFERENTES SOLVENTES.

RENDIMENTOS OBTIDOS		CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO		
		Etanol 12h, 78°C	Clorofórmio:Metanol 12h, 45°C	Hexano 12h, 55°C
Rendimento da Extração (g/100g)	Extrato	7,6±0,7	8,7±1,1	3,2±0,1
	Resíduo	91,8±0,6	89,7±0,1	93,7±0,1
Rendimento Mássico de H&L (%)	Extrato	42,8±7,6	36,1±2,8	49,1±1,3
	Resíduo	6,5±0,3	6,9±0,7	7,6±0,3
Rendimento de H&L (g/100 g)	Extrato	3,25	3,14	1,57
	Resíduo	5,97	6,19	7,12
	TOTAL	9,22	9,33	8,69

Os percentuais relatados na TABELA 8 revelam que o etanol e a mistura clorofórmio:metanol apresentaram os mesmos rendimentos finais em monoésteres, atingindo valores entre 3,25 e 3,14 g/100 g de biomassa. Assim, devido às suas respectivas propriedades, custo, toxicidade e disponibilidade no mercado, o etanol foi selecionado como o solvente mais indicado para a extração da fração lipídica desta microalga. No entanto, apesar da extração exaustiva com solvente e da utilização de solventes com diferentes polaridades, não foi possível retirar a totalidade da fração lipídica da biomassa e isto foi confirmado pela grande quantidade de material lipídico que permaneceu retida nos resíduos.

Nos cromatogramas apresentados nas FIGURAS 15, 16 e 17, é possível observar

que a utilização de solventes com polaridades diferentes não teve grande influência sobre o perfil de ácidos graxos caracterizados na forma de monoésteres metílicos.

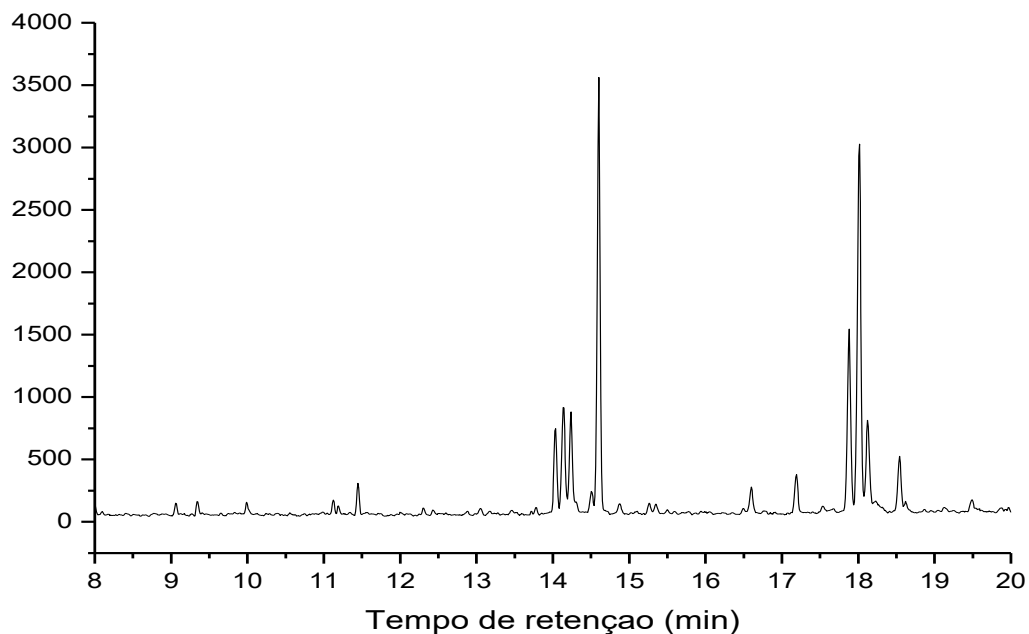


FIGURA 15 - CROMATOGRAMAS DOS MONOÉSTERES DA MICROALGA *P. pyrenoidosa*, OBTIDOS ATRAVÉS DA EXTRAÇÃO COM SOXHLET UTILIZANDO CLOROFÓRMIO:METANOL COMO SOLVENTE.

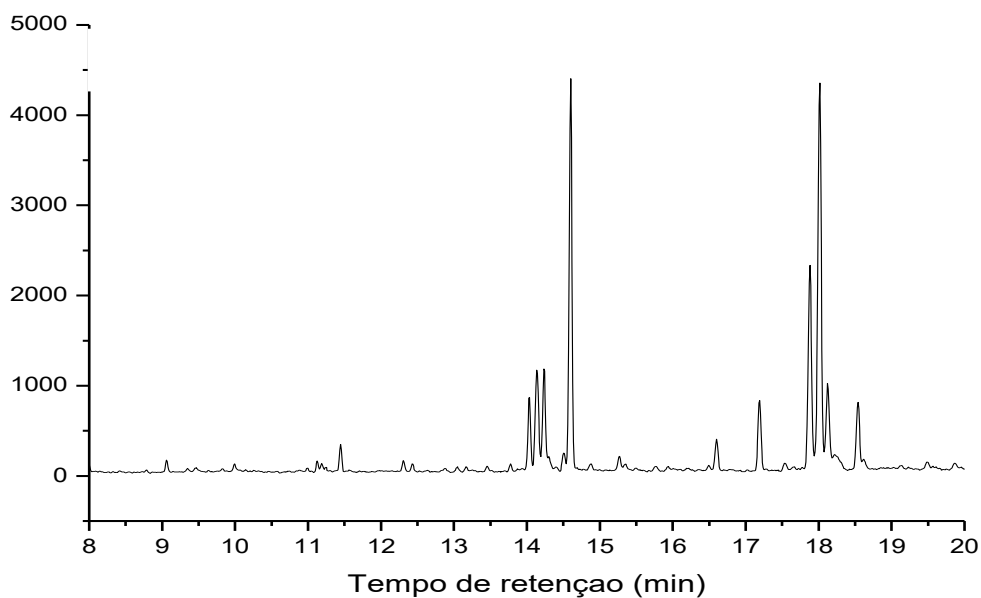


FIGURA 16 - CROMATOGRAMAS DOS MONOÉSTERES DA MICROALGA *P. pyrenoidosa*, OBTIDOS ATRAVÉS DA EXTRAÇÃO COM SOXHLET UTILIZANDO HEXANO.

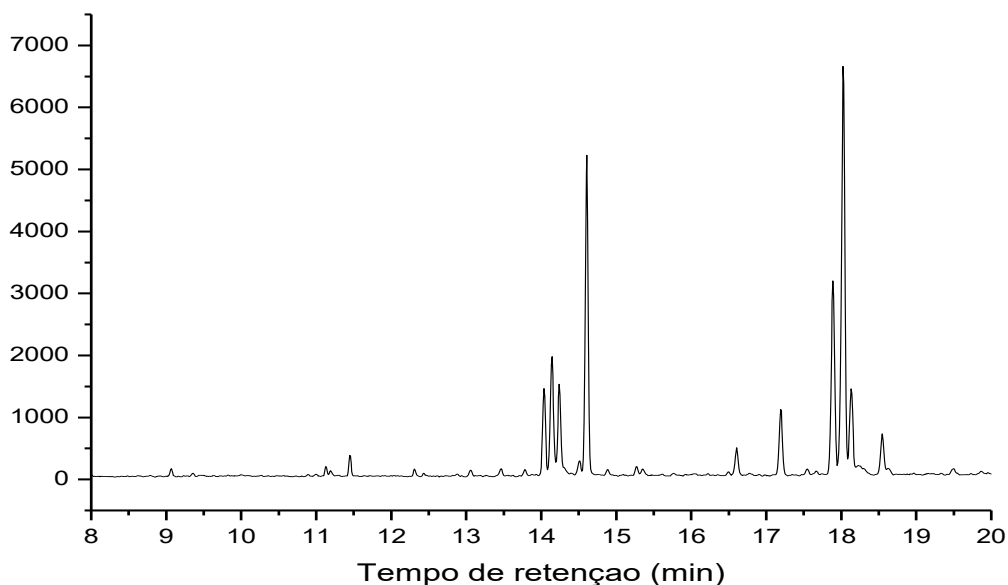


FIGURA 17 - CROMATOGRAMA DO PERFIL DOS MONOÉSTERES DA MICROALGA *P. pyrenoidosa* A PARTIR DA EXTRAÇÃO REALIZADA EM SOXHLET UTILIZANDO ETANOL COMO SOLVENTES

Apesar dos perfis parecidos, o percentual de cada tipo de ácido graxo na mistura apresentou alguma alteração. A distribuição dentre os monoésteres obtidos, juntamente com a sua quantificação (média e desvio padrão), estão apresentados na FIGURA 18.

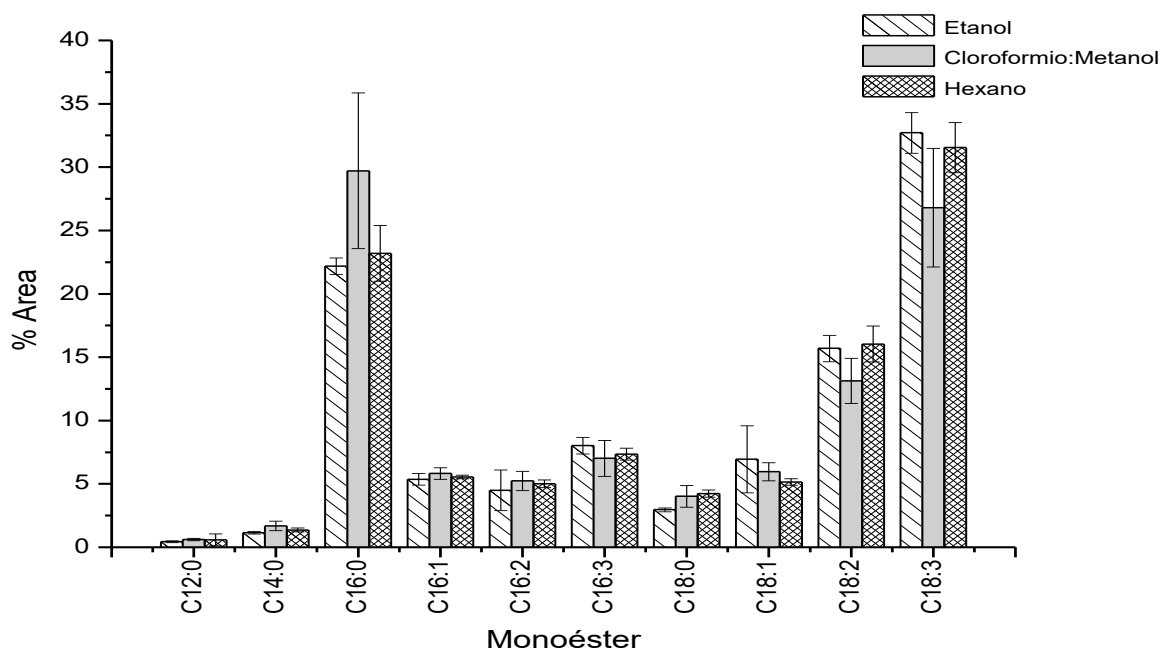


FIGURA 18 - PERFIL DOS MONOÉSTERES ORIUNDOS DOS EXTRATOS LIPÍDICOS EM SOXHLET DA MICROALGA *P. pyrenoidosa*

Estes resultados indicam que, para a microalga *P. pyrenoidosa*, a polaridade do solvente tem um papel importante na eficiência da extração, mas não interfere na

seletividade do processo para ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados. Esta mesma observação foi feita por D'Oca *et al.* (2011) ao realizarem a extração da fração lipídica desta microalga com solventes de polaridades distintas.

4.4.2 Extrações utilizando a microalga *N. oculata*

Posteriormente ao processo de extração da fração lipídica da microalga *N. oculata*, calculou-se o rendimento dos extratos obtidos para os diferentes solventes e suas respectivas conversões a monoésteres (TABELA 9).

TABELA 9 - RENDIMENTO NORMALIZADO DE EXTRAÇÃO UTILIZANDO SISTEMA SOXHLET COM DIFERENTES SOLVENTES PARA A MICROALGA *N. oculata*.

RENDIMENTOS OBTIDOS		CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO		
		Etanol 12h, 78°C	Clorofórmio:Metanol 12h, 45°C	Hexano 12h, 55°C
Rendimento da Extração (g/100 g)	Extrato	19,2 ± 1,2	18,1 ± 0,5	4,8 ± 0,5
	Resíduo	80,9 ± 0,7	81,7 ± 0,5	95,8 ± 0,9
Rendimento Mássico de H&L (%)	Extrato	23,6 ± 0,5	15,4 ± 1,7	54,6 ± 2,2
	Resíduo	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	2,6 ± 0,2
Rendimento de H&L (g/100 g)	Extrato	4,53 (11,33)*	2,79 (6,98)*	2,62 (6,55)*
	Resíduo	0,89 (2,23)*	0,90 (2,25)*	2,49 (6,23)*
	TOTAL	5,42 (13,56)*	3,69 (9,23)*	5,11 (12,78)*

* Resultado entre parêntesis representa uma estimativa de extração para a microalga dessalinizada.

A utilização do etanol possibilitou a obtenção de uma maior quantidade de extratos (19,2 g/100 g de biomassa), seguido pela mistura clorofórmio:metanol (18,1 g/100 g biomassa) e pelo hexano (4,8 g/100 g biomassa). Em seguida, estas frações lipídicas foram submetidas à metodologia modificada de Hartman e Lago e a conversão em relação aos extratos em etanol, clorofórmio:metanol e hexano foram de 23,61, 15,42 e 54,60%, respectivamente. Tais resultados representam rendimentos mássicos de

Hartman e Lago (H&L) de 4,53, 2,79 e 2,62 g/100 g de biomassa para o etanol, clorofórmio:metanol e hexano, respectivamente.

O melhor rendimento em monoésteres, obtido para a extração com etanol (4,53 g/100 g de biomassa), corresponde a 89% do obtido para o material *in natura* (5,1g/ 100 g). Assim, devido à evidência de que parte da fração lipídica se manteve retida nos extratos após o processo de extração, estes também foram submetidos a metodologia de H & L e foram obtidos 0,89, 0,90 e 2,49 g/100 g de biomassa utilizando-se o etanol, clorofórmio :metanol e o hexano, respectivamente. Por outro lado, como no caso da extração de *P. pyrenoidosa*, os resultados obtidos para a *N. oculata* também revelaram que a lavagem exaustiva com solvente não foi suficiente para extrair toda a fração lipídica da biomassa. Entre os solventes utilizados, o etanol apresentou melhores rendimentos, tanto para a extração quanto para a conversão a monoésteres. Por outro lado, a mistura clorofórmio:metanol extrai praticamente a mesma quantidade de extrato que o etanol, porém, somente 15,4% deste material foi passível de esterificação, indicando que esta mistura proporciona a retirada de outros constituintes desta biomassa.

A lavagem com hexano proporcionou a obtenção de menores quantidades de extrato (4,8 g/100 g de biomassa), assim como demonstrado para os ensaios realizados com a microalga *P. pyrenoidosa*. O hexano é eficiente na extração de lipídios neutros e outros componentes de baixa polaridade que geralmente se encontram em proporção minoritária. Portanto, estes dados sugerem que a proporção de lipídios neutros nesta microalga é inferior à de lipídios polares. Por outro lado, a biomassa residual obtida após extração com hexano foi a que reteve maior quantidade de material lipídico residual, particularmente quando comparada aos resultados obtidos com etanol. Vale ressaltar que o total de monoésteres recuperado na extração com clorofórmio:metanol foi inferior ao esperado, ou seja, os 5,1 g/100 g de biomassa obtidos diretamente a partir do material *in natura*, enquanto que os totais obtidos com etanol ou hexano foram muito próximos a este valor. Tal observação provavelmente revela a ocorrência de um erro experimental, já que o mesmo não foi observado nas extrações realizadas com *P. pyrenoidosa* (TABELA 8). Por outro lado, a extração por solventes foi mais eficiente para *N. oculata* (TABELA 9) do que para *P. pyrenoidosa* (TABELA 8), pois o teor residual de material lipídico no material extraído foi muito menor para a primeira em relação à segunda.

O uso do fator de correção para se estimar a quantidade de extrato e suas conversões a monoésteres, considerando que a biomassa estivesse totalmente

dessalinizada (resultado apresentado entre parêntesis na TABELA 9), demonstra que a utilização do etanol como solvente possibilitaria a obtenção de uma quantidade de monoésteres próxima a que foi obtida ao se realizar a transesterificação direta no material dessalinizado *in natura* ($13,9 \pm 0,66$ g de éster/100 g biomassa seca). Com base nestes e nos resultados obtidos anteriormente para *P. pyrenoidosa* (TABELA 8), ficou clara a opção pelo etanol como solvente de extração, pois, além de promover maiores rendimentos de extração, este solvente é menos tóxico que os demais. Assim, o etanol foi selecionado como cossolvente ideal para as extrações a serem realizadas com fluidos pressurizados (vide abaixo).

A análise cromatográfica das frações provenientes dos diferentes extratos de acordo com a metodologia modificada de Hartman e Lago (ANTONIOSI FILHO e LANÇAS, 1995), revelou a presença dos mesmos componentes na forma de monoésteres metílicos, com pequenas diferenças na porcentagem relativa de cada um deles, conforme pode ser observado nas FIGURAS 19, 20 e 21. Com efeito, esta observação foi coerente com os resultados obtidos anteriormente para os extratos após a metodologia modificada de Hartman e Lago utilizando a microalga *P. pyrenoidosa*.

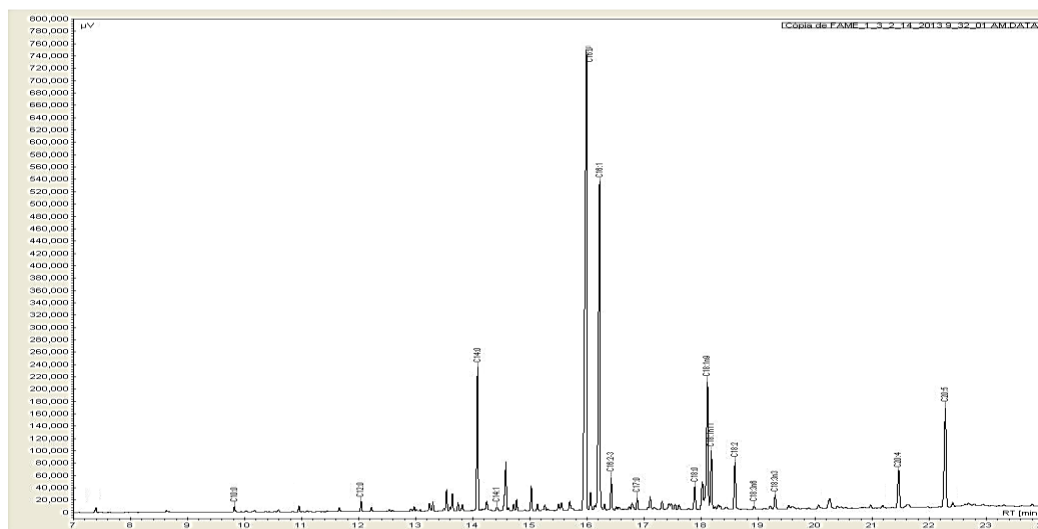


FIGURA 19 - PERFIL LIPÍDICO DA MICROALGA *N. oculata*, OBTIDO APÓS A EXTRAÇÃO EM SOXHLET COM ETANOL

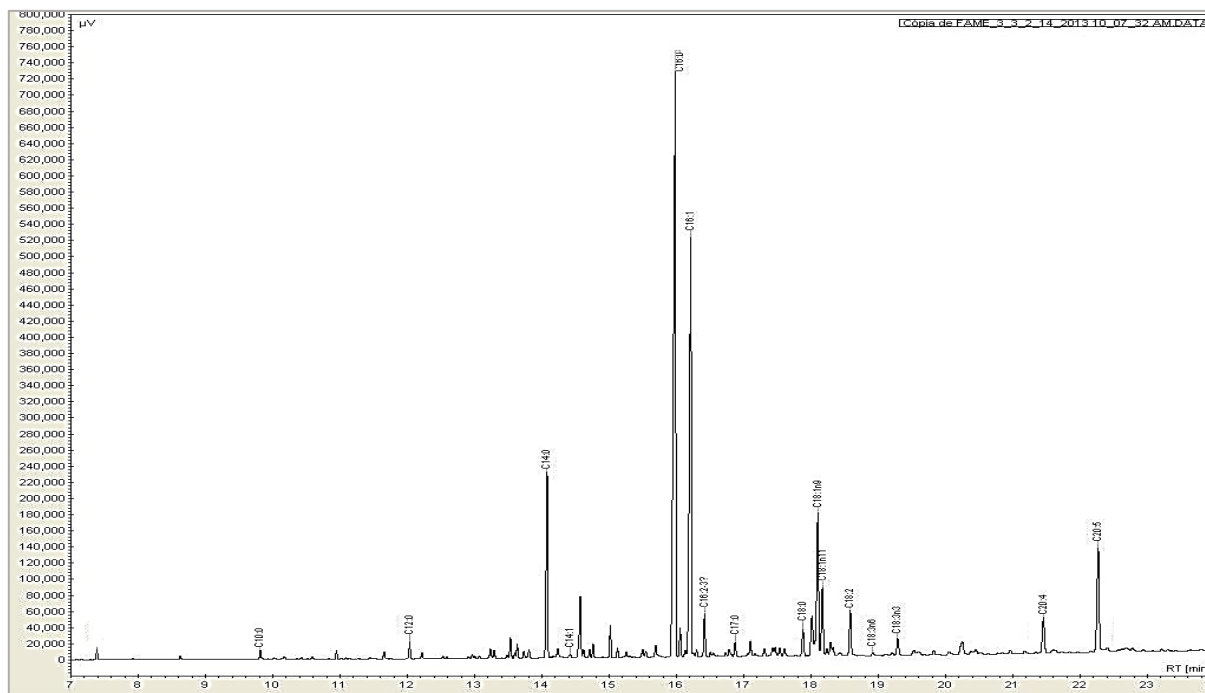


FIGURA 20 - PERFIL LIPIDICO DA MICROALGA *N. oculata*, OBTIDO APÓS A EXTRAÇÃO EM SOXHLET COM CLOROFÓRMIO:METANOL.

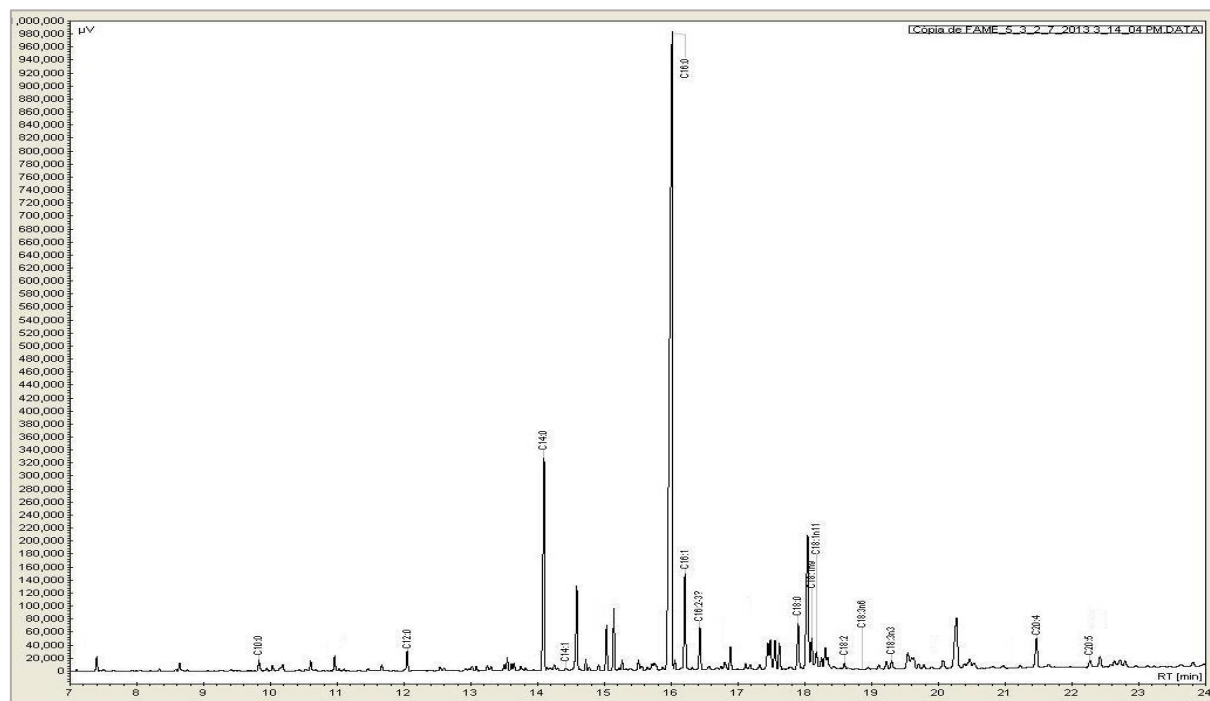


FIGURA 21 - PERFIL LIPIDICO DA MICROALGA *N. oculata*, OBTIDO APÓS A EXTRAÇÃO EM SOXHLET UTILIZANDO HEXANO COMO SOLVENTE.

As diferenças observadas nas FIGURAS 19, 20 e 21 em relação aos percentuais dos monoésteres presentes nas diferentes frações lipídicas, foram quantificadas e apresentadas na FIGURA 22.

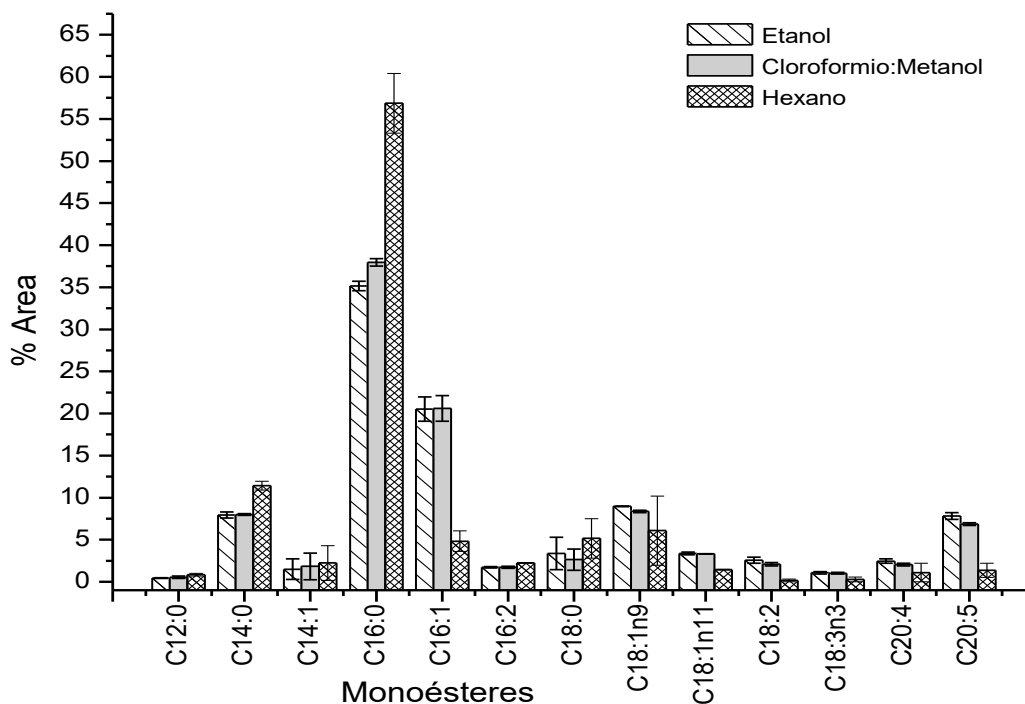


FIGURA 22 - PERFIL DOS MONOÉSTERES ORIUNDOS DOS DIFERENTES EXTRATOS LIPÍDICOS DA MICROALGA *N. oculata*.

As principais variações dizem respeito aos monoésteres dos ácidos palmítico (C16:0) e palmitoléico (C16:1) obtidos a partir das extrações realizadas com hexano. Para este extrato, o teor de C16:0 na mistura chegou a 56,9%, enquanto que, nos outros extratos, este percentual ficou entre 35,2 e 38,0%. Já o componente C16:1 foi obtido em menores quantidades no produto da extração com hexano (4,8%), sendo que nas outras extrações este monoéster foi detectado em percentuais cinco vezes maior (20,5 a 20,6%). Uma situação semelhante foi observada para o C14:0, dadas as devidas proporções. Por isto, tais resultados podem ser indicativos de que o hexano foi mais seletivo para a extração de monoésteres de cadeia hidrocarbônica saturada, fato que ainda exigirá a realização de outros ensaios para sua confirmação.

4.5 CINÉTICA DE EXTRAÇÃO UTILIZANDO FLUIDO PRESSURIZADO

Inicialmente foi avaliada a influência da temperatura e da pressão sobre o rendimento de extração, de modo a definir as condições experimentais a serem empregadas. No entanto, estes experimentos foram realizados apenas com a microalga *P. pyrenoidosa* porque a quantidade da microalga *N. oculata* disponível naquele momento era bastante reduzida.

As pressões utilizadas foram de 50, 100, 150 e 200 bar e as temperaturas avaliadas foram de 40 e 80°C utilizando propano como solvente. Além destes experimentos, foi também avaliado o rendimento de extração para condições intermediárias de 125 bar e 60°C. A quantidade de extrato obtida para cada um destes experimentos está apresentada na TABELA 10 e os valores relatados correspondem à soma de todas as alíquotas coletadas durante o processo de extração. Tais alíquotas foram coletadas a cada 10 minutos sob uma vazão do solvente de 2 mL.min⁻¹.

TABELA 10 - RENDIMENTO DE EXTRATO DA MICROALGA *P. pyrenoidosa* OBTIDO EM DIFERENTES TEMPERATURAS E PRESSÕES.

EXPERIMENTO	TEMPERATURA (°C)	PRESSÃO (bar)	RENDIMENTO MÁSSICO DE EXTRATO (%)
1	40	50	0,6
2	40	100	0,6
3	40	150	1,0
4	40	200	1,2
5	60	125	1,1
6	80	50	1,2
7	80	100	1,2
8	80	150	1,7
9	80	200	2,3

Em experimentos realizados na mesma temperatura (experimentos 1 a 4 e 6 a 9), pode-se observar que o aumento da pressão auxilia a retirada de um teor maior de extrato, sendo que os maiores rendimentos foram obtidos para a pressão de 200 bar. Já

nos experimentos realizados em uma mesma pressão, foi possível dobrar a quantidade de material extraído ao variar a temperatura de 40 para 80°C. Portanto, após a realização destes experimentos, concluiu-se que os aumentos da pressão e da temperatura favoreceram a retirada da fração lipídica desta microalga, sendo que a melhor condição foi obtida na pressão de 200 bar e na temperatura de 80°C.

A relação gráfica entre rendimento mássico de cada alíquota e o volume de solvente gasto possibilitou a construção das cinéticas de extração da fração lipídica de *P. pyrenoidosa*. As FIGURAS 23 e 24 apresentam as cinéticas obtidas para as extrações realizadas a 40 e 80°C, respectivamente.

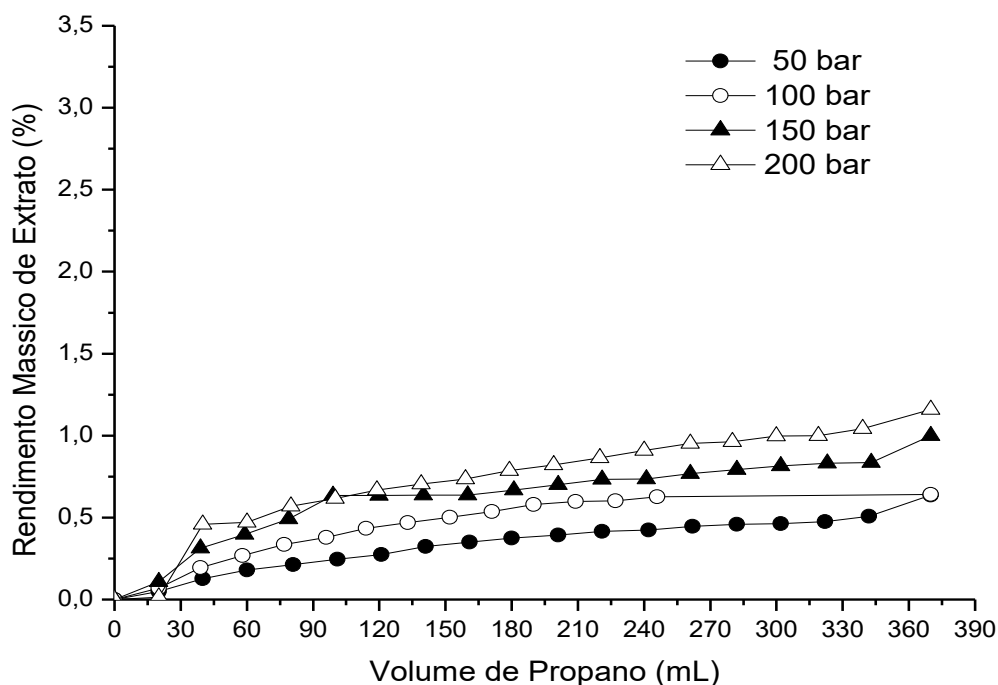


FIGURA 23 - CINÉTICA DEXTRAÇÃO DO ÓLEO DA MICROALGA *P. pyrenoidosa* REALIZADAS A 40°C NAS DIFERENTES PRESSÕES

Ao analisar as curvas obtidas para diferentes temperaturas, é possível verificar que as extrações a 80°C geraram rendimentos superiores aos obtidos para as extrações a 40°C em menor tempo. Porém, mesmo utilizando a maior temperatura, não foi possível atingir um platô e as curvas continuaram em ascensão, indicando que seria necessário um maior tempo e maior consumo de solvente para a retirada de toda a fração oleosa. Entretanto, apesar deste indicativo de que temperaturas mais altas favoreceriam um maior rendimento de extração, não nos foi possível realizar testes com temperaturas superiores a 80°C por limitações na temperatura máxima de operação do banho que

mantinha o extrator aquecido. Assim, optou-se por realizar todas as demais extrações a 80°C.

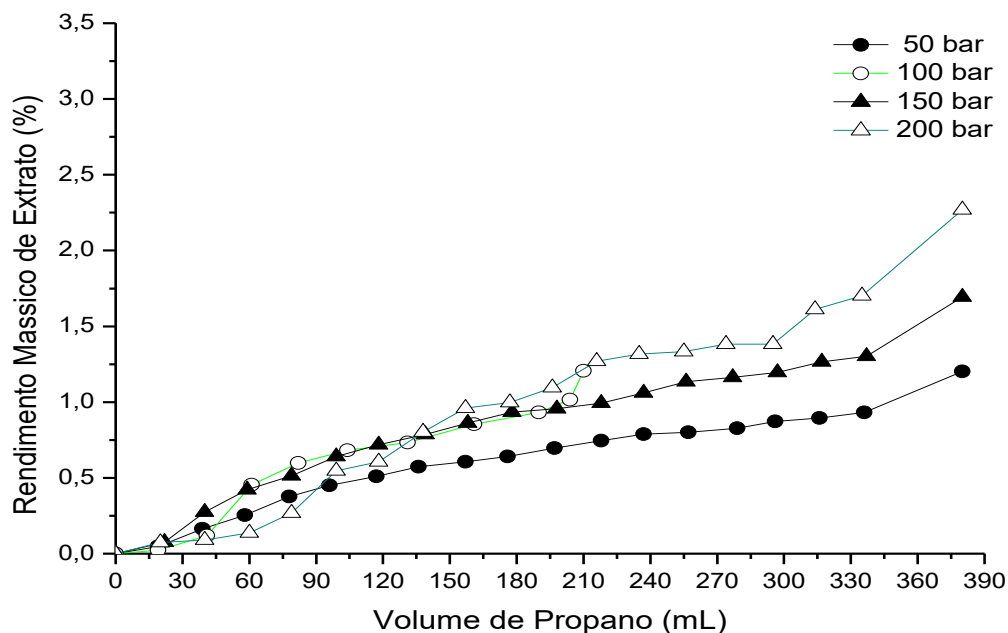


FIGURA 24 - CINÉTICA DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO DA MICROALGA *P. pyrenoidosa* REALIZADAS A 80°C PARA AS DIFERENTES PRESSÕES

Depois de estabelecida a melhor condição de extração (200 bar a 80°C), dentro das limitações experimentais em que se desenvolveu este estudo, outros ensaios foram realizados para se determinar a quantidade de cossolvente (etanol) que poderia ser adicionado a estas extrações e a influência que este teria sobre o rendimento do processo. A proporção de etanol adicionada foi calculada em relação à massa seca de microalga utilizada no experimento. Tais proporções e os rendimentos obtidos em cada ensaio estão apresentados na TABELA 11.

TABELA 11 - RENDIMENTO DE EXTRATO DA MICROALGA *P. pyrenoidosa* UTILIZANDO DIFERENTES PROPORÇÕES DE COSSOLVENTE.

EXPERIMENTO	TEMPERATURA (°C)	PRESSÃO (bar)	PROPORÇÃO MÁSSICA DE COSSOLVENTE*	RENDIMENTO MÁSSICO DE EXTRATO (%)
9	80	200	--	2,3
10	80	200	1:3	3,3
11	80	200	1:1	5,5

*Proporção em relação à massa de biomassa

Os dois experimentos realizados com a adição de etanol como cossolvente propiciaram melhores eficiências de extração da fração lipídica de *P. pyrenoidosa*, sendo que o melhor resultado foi obtido na proporção de 1:1 em relação à massa de biomassa seca. Não foram realizados testes com maiores proporções de etanol porque o volume interno do extrator era de apenas 72 mL.

A FIGURA 25 apresenta as cinéticas de extração obtidas com a utilização de diferentes quantidades de cossolvente. Em geral, ao se utilizar a mesma quantidade mássica de etanol em relação à massa de biomassa seca, maiores quantidades de extrato foram obtidas com menores volumes de solvente e em menor tempo de extração.

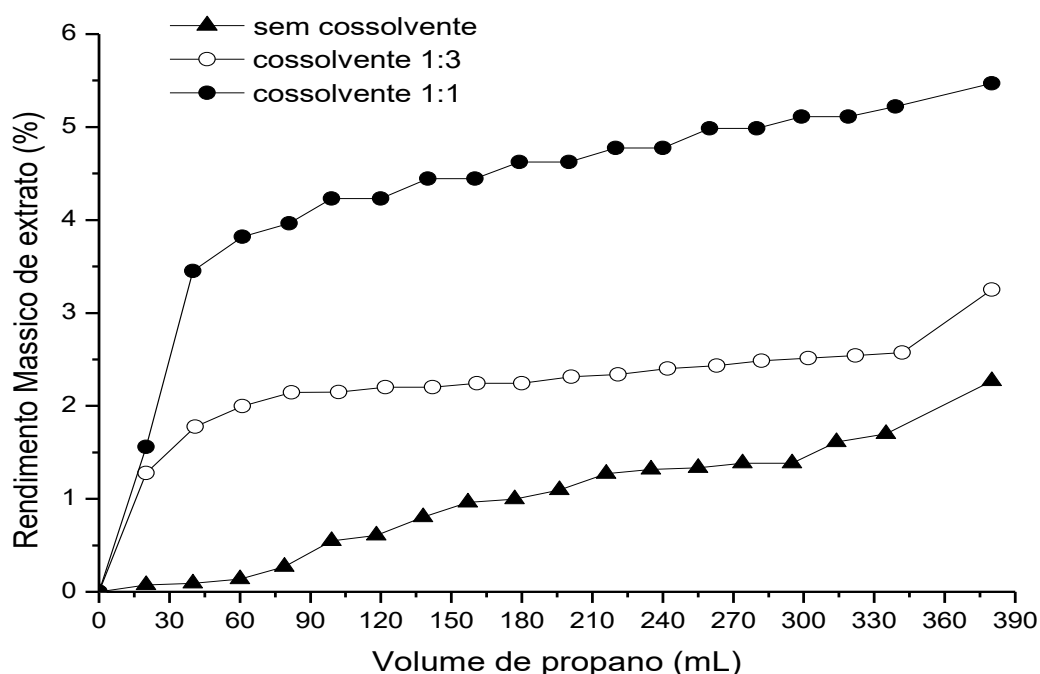


FIGURA 25 - CINÉTICA DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO DA MICROALGA *P. pyrenoidosa* UTILIZANDO PROPANO COMO SOLVENTE E ETANOL COMO COSSOLVENTE

Após a definição das melhores condições de temperatura (80°C), pressão (200 bar) e proporção de cossolvente (1:1 em relação à massa de microalga seca) para as extrações com propano, novos ensaios foram realizados nestas mesmas condições empregando CO₂ como solvente. A FIGURA 26 apresenta as cinéticas obtidas para o CO₂ e para o propano nas mesmas condições de temperatura e pressão.

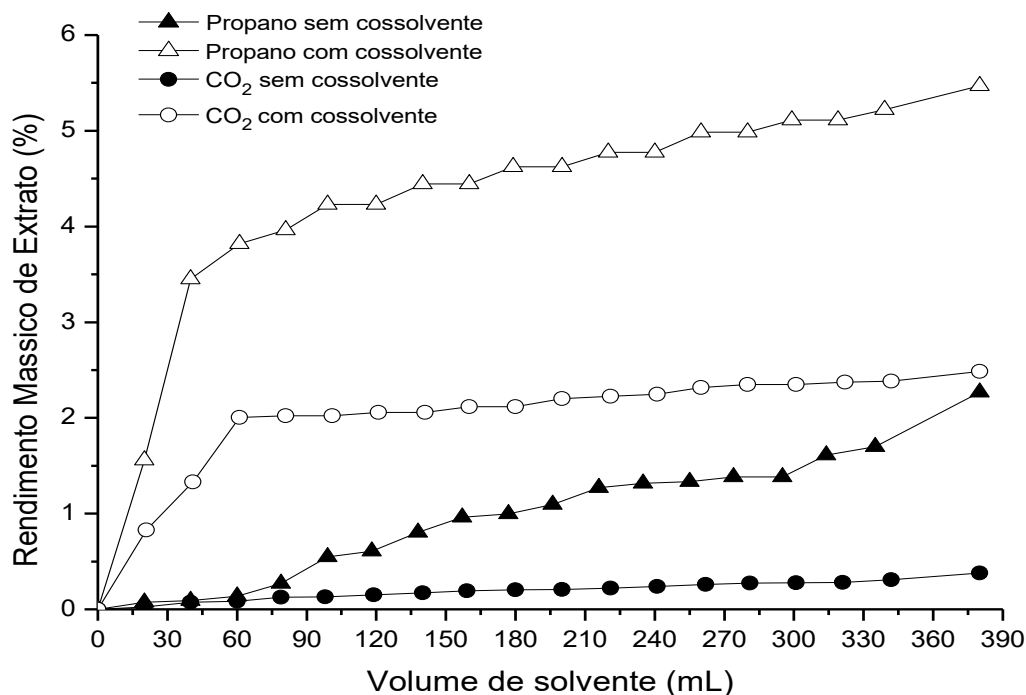


FIGURA 26 - CINÉTICAS DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO DA MICROALGA *P. pyrenoidosa* UTILIZANDO PROPANO OU CO₂ COM E SEM A UTILIZAÇÃO DE COSSOLVENTE

O rendimento mássico do extrato obtido com CO₂, sem e com a utilização de cossolvente, foi de 0,4 e 2,5%, respectivamente. As curvas cinéticas obtidas para os dois solventes permitem observar que as extrações realizadas com propano, na ausência ou na presença de cossolvente, ocorreram mais rapidamente do que as extrações realizadas para o CO₂ nas mesmas condições. Este efeito pode ter sido causado por uma maior afinidade (solubilidade) entre o propano e o óleo presente nesta microalga.

Os resultados obtidos nas extrações da microalga *P. pyrenoidosa* serviram como base para os ensaios com a microalga *N. oculata*, porém, ao se verificar que os maiores rendimentos foram obtidos a 200 bar, optou-se por realizar pelo menos um teste acima desta pressão. Portanto, as amostras de *N. oculata* foram extraídas a 80°C sob pressões de 150, 200 e 250 bar, com e sem a utilização de cossolvente. Vale ressaltar que, nas condições de pressão e temperatura mencionadas acima, o propano apresenta comportamento de fluido subcrítico e o CO₂ apresenta comportamento de fluido supercrítico.

As cinéticas de extração do material graxo da microalga *N. oculata*, utilizando propano como solvente, na ausência e na presença de etanol, estão apresentadas nas FIGURAS 27 e 28, respectivamente.

Ao se utilizar o propano como solvente, o aumento da pressão de 150 para 250 bar aumentou o rendimento em cerca de 0,6 pontos percentuais (FIGURA 27). Por outro lado, a adição do etanol (FIGURA 28) proporcionou um aumento adicional de quase três vezes em relação ao obtido nas extrações sem a adição de cossolvente.

Além do aumento no rendimento dos extratos, as curvas geradas para as extrações com adição de etanol (FIGURA 28) revelaram que, com a utilização de 150 mL de solvente, grande parte do extrato já havia sido extraído, sendo que as extrações atingiram um platô depois deste período, passando a progredir apenas lentamente. Para as extrações sem a utilização de cossolvente, não foi possível determinar a quantidade de solvente necessária para estas condições, uma vez que, ao final do período de extração, as curvas ainda continuavam ascendentes.

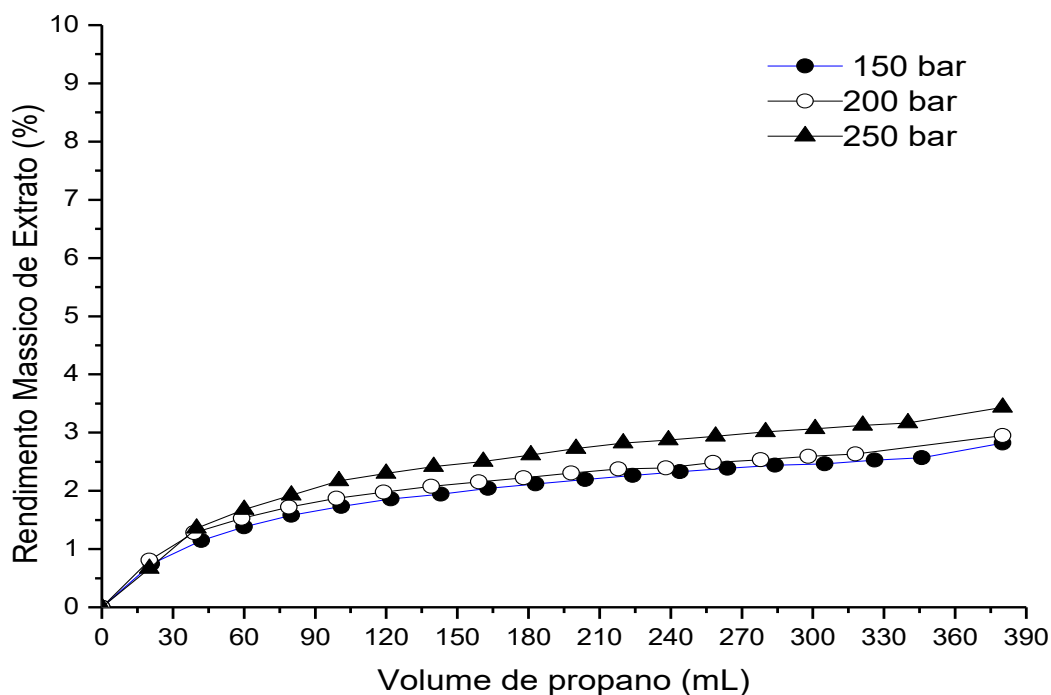


FIGURA 27 - CURVA DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO DA MICROALGA *N. oculata* REALIZADA EM DIFERENTES PRESSÕES, UTILIZANDO PROPANO NO ESTADO SUBCRÍTICO SEM A UTILIZAÇÃO DE COSSOLVENTE.

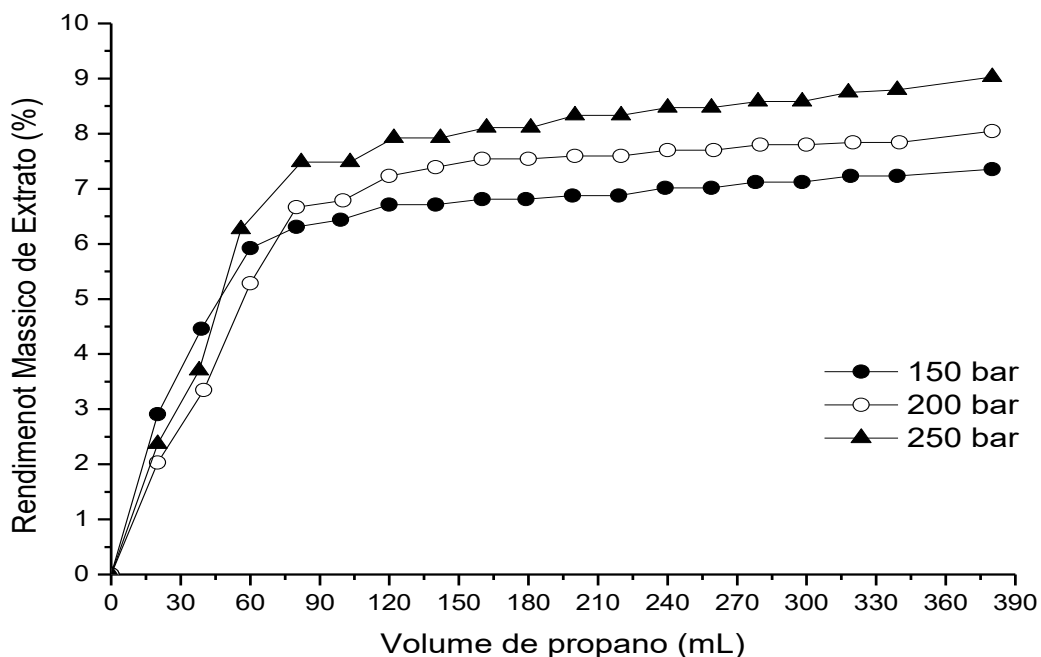


FIGURA 28 - CURVA DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO DA MICROALGA *N. OCULATA* REALIZADA EM DIFERENTES PRESSÕES, UTILIZANDO PROPANO NO ESTADO SUBCRÍTICO E ETANOL COMO COSSOLVENTE.

Para as extrações utilizando CO₂ como solvente (FIGURA 29), também foi observado um aumento nos teores de extração conforme a pressão no sistema foi aumentada. Porém, os rendimentos foram muito inferiores aos obtidos com o uso do propano, sendo que o máximo (1,07 %) foi obtido em 250 bar.

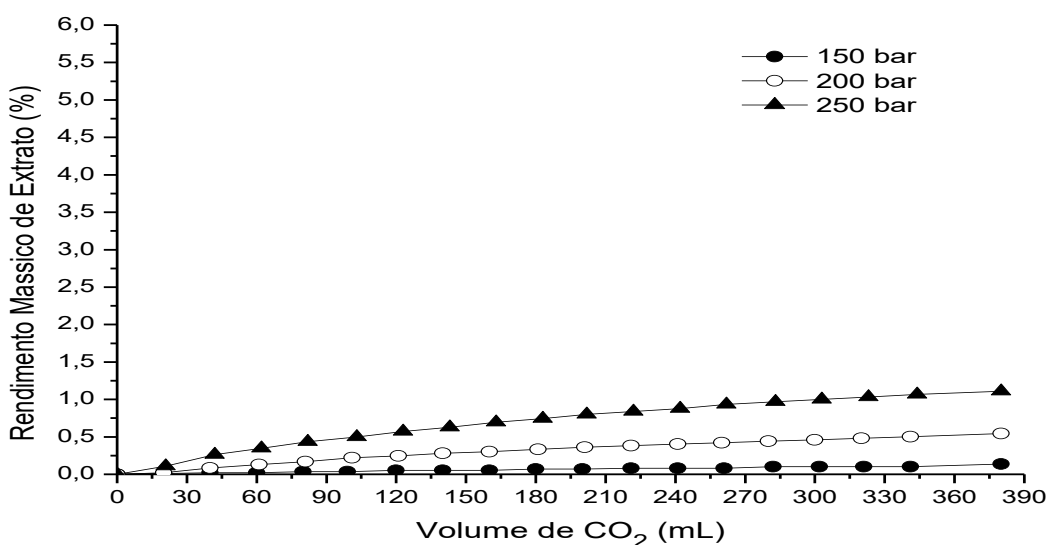


FIGURA 29 - CURVAS DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO DA MICROALGA *N. oculata* REALIZADA EM DIFERENTES PRESSÕES, UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO COMO SOLVENTE.

Por último, avaliou-se a influência da adição de etanol neste sistema (FIGURA 30) e as curvas obtidas demonstraram que, assim como para as extrações utilizando propano, o etanol favoreceu a recuperação do extrato. Assim, ao se comparar com a extração sem cossolvente, o rendimento foi cerca de 50 vezes superior ao obtido anteriormente na mesma pressão (150 bar).

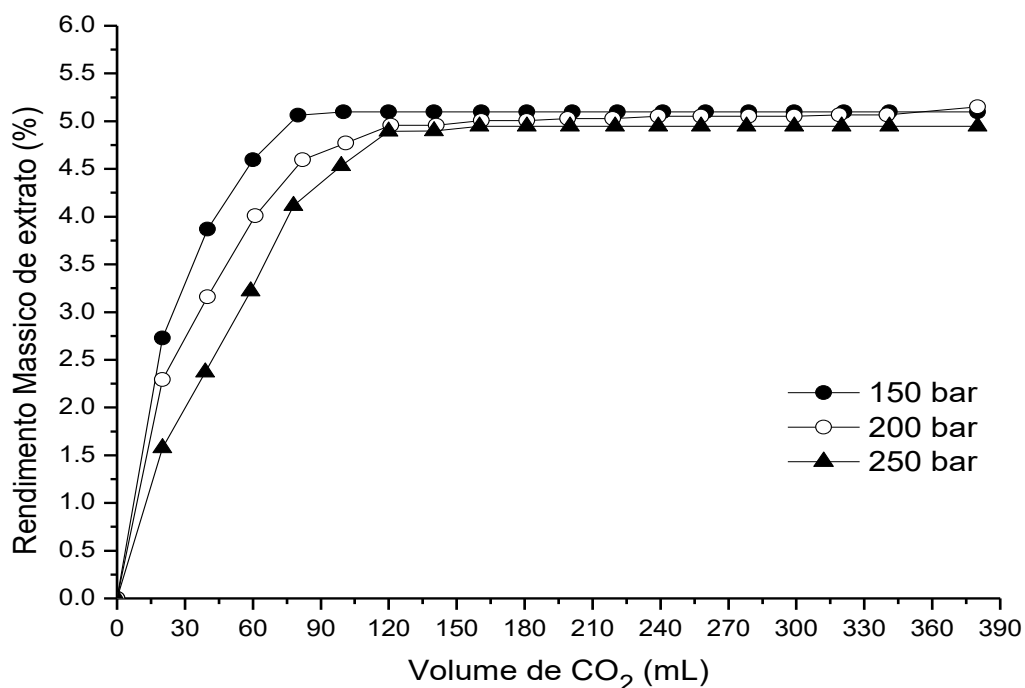


FIGURA 30 - CURVAS DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO DA MICROALGA *N. oculata* REALIZADA EM DIFERENTES PRESSÕES, UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO COMO SOLVENTE E ETANOL COMO COSSOLVENTE.

Os resultados das cinéticas de extração com CO₂ e etanol também apresentaram um platô próximo a 150 mL de solvente e, acima disto, o aumento de solvente não propiciou diferenças no rendimento da extração. Portanto, para as extrações realizadas com CO₂ e etanol, o máximo de extrato pode ser obtido com a metade do volume de solvente utilizado nas demais extrações realizadas em sistema pressurizado.

Assim como nas extrações do óleo da microalga *P. pyrenoidosa*, os melhores resultados para *N. oculata* também foram obtidos utilizando propano que, por consequência, apresentou um maior poder de solvatação nas condições de pressão e

temperatura utilizadas neste estudo. Porém, ainda não é possível afirmar que o propano é mais eficiente que o CO₂ para a extração da fração lipídica destes micro-organismos, pois os processos ainda não foram suficientemente otimizados.

4.6 AVALIAÇÃO DA CONVERSÃO EM MONOÉSTERES GRAXOS DOS EXTRATOS OBTIDOS POR ESP

Como o foco principal deste trabalho é a microalga *N. oculata*, somente os extratos desta foram analisados em relação à conversão em monoésteres. Estes extratos foram obtidos nas condições descritas no tópico 4.5.

A exemplo do que foi realizado para a extração Soxhlet, o rendimento mássico de cada extração foi determinado e, em seguida, o extrato e seus respectivos resíduos foram esterificados utilizando o método modificado de Hartman e Lago (ANTONIOSI FILHO e LANÇAS, 1995). Conforme a TABELA 12, o uso de propano como solvente possibilitou a obtenção de uma maior quantidade de material em todas as extrações e, ao se avaliar a quantidade mássica de monoéster obtida, a extração com propano possibilitou um ganho de 11 a 90% quando comparada com os mesmos rendimentos das extrações realizadas com CO₂ nas mesmas condições (TABELA 13). Outros autores já demonstraram resultados semelhantes, em que o propano líquido ou pressurizado apresentou maior miscibilidade em óleos, resultando em maiores rendimentos de extração (FREITAS *et al.*, 2008; NIMET, 2009; FREITAS, 2009).

Ao se adicionar etanol como cossolvente, na proporção 1:1 em relação à massa de microalga seca, ocorreu um aumento na quantidade de extrato obtido para ambos os solventes (TABELAS 12 e 13). Porém, a quantidade de material passível de esterificação nestes extratos variou de 18,7 a 41,5%, demonstrando que o etanol possibilita a retirada de uma maior fração oleosa, mas também remove outros componentes presentes nesta biomassa.

Ao final de cada uma destas extrações, o resíduo (material que permanece no cartucho após a extração) também foi submetido ao processo de esterificação para se verificar a quantidade da fração lipídica que ainda permaneceu retida. Obteve-se de 1,5 a 4,5 g de éster/100 g de biomassa nestes resíduos e a soma destes valores com os obtidos para a esterificação da fração oleosa resultou em percentuais próximos aos

obtidos na esterificação realizada diretamente sobre a biomassa *in natura* (5,1 g/100 g biomassa).

Os rendimentos das extrações apresentados nas TABELAS 12 e 13 estão subestimados, pois estas extrações foram realizadas com excesso de sal na biomassa (conforme foi apresentado no tópico 4.3). Portanto, o valor estimado de extrato para a biomassa dessalinizada foi calculado e está apresentado entre parêntesis para cada caso. Para a confirmação destas estimativas foram realizadas extrações nas melhores condições de temperatura (80°C) e pressão (200 bar) utilizando amostras desta microalga dessalinizada. Ao se utilizar propano como solvente, na ausência e na presença de cossolvente, o rendimento da extração foi de $8,0 \pm 0,1$ e $14,4 \pm 1,1$ g de extrato para cada 100 g de biomassa, respectivamente. Já para as extrações realizadas como o dióxido de carbono sem e com a utilização de cossolvente possibilitaram a obtenção de $1,7 \pm 0,2$ e $10,1 \pm 1,5$ g de extrato/ 100 g de biomassa.

Comparando os valores obtidos com os estimados é possível observar que para as extrações realizadas sem a utilização de cossolvente, a quantidade de extrato obtida foi próxima à estimada, demonstrando que a presença do sal não interferiu no processo de extração da fração lipídica. Já para as extrações realizadas utilizando cossolvente, os rendimentos foram menores do que os esperados, porém nas extrações da presença de sal o etanol possibilitou a obtenção de uma maior quantidade de extrato.

Em geral, as extrações com fluidos pressurizados na presença de etanol apresentaram rendimentos inferiores aos obtidos para as extrações convencionais (Soxhlet) com este mesmo solvente e esta menor eficiência de extração pode ter sido ocasionada por dificuldades no processo de transferência de massas. Nestes sistemas, as amostras foram colocadas em sacos de algodão que depois foram alocados no extrator. Assim, é possível que este procedimento tenha forçado uma compactação excessiva da amostra, dificultando a penetração do solvente e fazendo com que a interação ocorresse somente na biomassa que estavam próximas às paredes do extrator. Segundo POURMORTAZAVI e HAJIMIRSADEGHI (2007), a estrutura da matriz está diretamente relacionada com a eficiência da extração, pois pode dificultar a difusão do solvente para o seu interior. Além disto, pode ocorrer a formação de caminhos preferenciais e isto resulta em uma extração não homogênea.

Outros fatores que ocasionaram a obtenção de menores rendimentos foram perdas eventuais de extrato durante o processo de extração, evidenciadas quando se

realiza o balanço mássico da quantidade de extrato obtida e a massa de resíduo resultante. Não houve registro evidente da perda de material durante a coleta do extrato ou recuperação dos resíduos. No entanto, perdas de material podem ter ocorrido dentro do extrator, de tal forma que este material tenha ficado retido e não tenha saído no coletor.

TABELA 12 - RENDIMENTOS NORMALIZADOS DE EXTRAÇÃO E ESTERIFICAÇÃO PARA OS EXTRATOS E RESÍDUOS NAS DIFERENTES PRESSÕES (150, 200 E 250 BAR) A 80°C, UTILIZANDO *N. oculata* E PROPANO COMO SOLVENTE.

EXPERIMENTOS		1	2	3	4	5	6
Condições							
Pressão (bar)		150	150	200	200	250	250
Cossolvente (Etanol)		Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim
Rendimentos							
Rendimento Mássico da Extração (g/100 g)	Extrato	2,8	7,4	3,1	8,4	3,2	9,0
	Resíduo	92,5	85,5	91,0	78,5	92,6	81,5
Rendimento Mássico de H & L (%)	Extrato	39,9 ± 3,1	18,7 ± 0,2	48,1 ± 2,0	35,8 ± 5,3	29,0 ± 0,4	26,0 ± 5,4
	Resíduo	3,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,7 ± 0,1	3,5 ± 0,1	2,1 ± 0,5
Rendimento Mássico de H & L (g/100 g)	Extrato	1,12 (2,80)	1,38 (3,45)	1,49 (3,73)	3,01 (7,53)	0,93 (2,32)	2,34 (5,85)
	Resíduo	3,24 (8,10)	1,28 (3,20)	1,18 (2,95)	1,33 (3,33)	3,24 (8,10)	1,71 (4,28)
	Total	4,36 (10,90)	2,66 (6,65)	2,67 (6,68)	4,34 (10,85)	4,17 (10,42)	4,05 (10,13)

TABELA 13 - RENDIMENTO NORMALIZADO DE EXTRAÇÃO E ESTERIFICAÇÃO PARA OS EXTRATOS E RESÍDUOS NAS DIFERENTES PRESSÕES A 80°C, UTILIZANDO *N. oculata* E DIÓXIDO DE CARBONO COMO SOLVENTE.

EXPERIMENTOS		7	8	9	10	11	12
Condições							
Pressão (bar)		150	150	200	200	250	250
Cossolvente (Etanol)		Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim
Rendimentos							
Rendimento Mássico da Extração (g/100 g)	Extrato	0,1	5,1	0,5	5,2	1,1	5,0
	Resíduo	88,4	78,7	84,0	85,0	90,7	84,0
Rendimento Mássico de H & L (%)	Extrato	70,7 ± 16,1	41,5 ± 1,5	59,0 ± 11,6	31,4 ± 0,1	70,8 ± 7,2	32,2 ± 0,9
	Resíduo	4,5 ± 0,5	3,6 ± 0,2	3,7 ± 0,4	4,5 ± 1,1	4,0 ± 0,2	3,4 ± 0,2
Rendimento Mássico de H & L (g/100 g)	Extrato	0,07 (0,18)	2,12 (5,30)	0,30 (0,75)	1,63 (4,08)	0,78 (1,95)	1,61 (4,03)
	Resíduo	3,98 (9,95)	2,83 (7,08)	3,11 (7,78)	3,83 (9,58)	3,63 (9,08)	2,86 (7,15)
	Total	4,05 (10,13)	4,95 (12,38)	3,41 (8,53)	5,46 (13,66)	4,41 (11,03)	4,47 (11,18)

5. CONCLUSÃO

A análise dos onze cultivos da microalga *N. oculata* apresentaram diferenças qualitativas e quantitativas em relação aos monoésteres obtidos. Porém, os monoésteres majoritários em todas as amostras foram os seguintes: miristato (C14:0), palmitato (C16:0), palmitoleato (C16:1), oleato (C18:1) e o *cis*-5,8,11,14,17-eicosapentaenoato de metila (EPA, C20:5). Estas diferenças em relação ao perfil de monoésteres motivaram a mistura destes lotes para composição de uma única amostra.

A extração em sistema convencional utilizando etanol proporcionou maiores rendimentos de extrato lipídico e melhores conversões a monoésteres. Com base nestes resultados, optou-se por utilizar o etanol como cossolvente para as extrações com fluido pressurizado.

O rendimento das extrações com fluido pressurizado aumentou com o aumento da temperatura e da pressão utilizadas no processo, sendo que os melhores resultados foram obtidos a 80°C e 200 bar. A utilização do etanol como cossolvente propiciou um aumento na quantidade de material extraído e no rendimento final de monoésteres tanto para as extrações realizadas com propano quanto para as realizadas com CO₂.

O propano no estado subcrítico apresentou melhores rendimentos de extração, porém, não houve muita diferença entre os rendimentos obtidos a 200 ou 250 bar, indicando que tais extrações poderiam ser realizadas a 200 bar, com uma consequente redução no consumo de solvente durante o processo. Apesar do propano ter gerado melhores rendimentos de extração, ainda não é possível afirmar que sua eficiência é maior do que a do CO₂ para extração da fração lipídica desta microalga, pois as condições utilizadas para a extração com CO₂ ainda não foram otimizadas.

A extração utilizando dióxido de carbono e etanol atingiu um platô com aproximadamente 150 mL de solvente, demonstrando que ao se utilizar este conjunto (solvente e cossolvente), as extrações são mais rápidas e mais econômicas em relação ao consumo de solvente.

As extrações em sistema convencional apresentaram melhores rendimentos. Porém, é necessário considerar que as extrações com fluidos

pressurizados utilizaram pelo menos dez vezes menos etanol por grama de biomassa do que a extração com sistema Soxhlet. Outra vantagem dos fluidos pressurizados é que o extrato obtido está praticamente livre de solventes, enquanto que nas extrações convencionais, há a necessidade de etapas adicionais para a remoção destes e a subsequente purificação dos produtos.

6. REFERÊNCIAS

- ANUÁRIO BRASILEIRO DO BIODIESEL; 2nd Brazilian Biodiesel Yearbook. Organização de Rogério Menani. Monte Alto: Letra Boreal, 2008.
- ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível em < www.anp.gov.br >. Acesso em 20/02/2013.
- ANTONIOSI FILHO N. R.; LANÇAS, F.M. Identification of FAMEs using ECL values and a three-dimensional Kováts retention index system. *Journal of High Resolution Chromatography*, v. 18, p. 167-170, 1995.
- BASOVA, M. M. Fatty acid composition of lipids in microalgae. *International Journal on Algae*, v. 7, p. 33 – 57, 2005.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v. 37, p. 911-917, 1959.
- BOLTO, B.; GREGORY, J.; Organic polyelectrolytes in water treatment. *Water Research*, v.41, p. 2301 – 2324, 2007.
- BORGES, L.; MORÓN-VILLARREYES, J. A.; D'OCA, M. G. M; ABREU, P. C. Effects os flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. *Biomass & Biotechnology*, v. 35, p. 4449–4454, 2011.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae – a reiew of technologies for production, processing, and extraction of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, p. 557-577, 2010.
- BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. *Química Nova*, v. 32, n. 4, p. 849-854, 2009.
- BRUNNER, G. Gas extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes. Ed. Darmstadl, Alemanha: Steinkopff, 1994.
- CAMPOS, B. V.; BARBARINO E.; LOURENÇO, S. O. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. *Ciência Rural*, v.40, p. 339-347, 2010.
- CHEUNG, P. C. K., Temperature and pressure effects on supercritical carbon dioxide extraction of n-3 fatty acids from red seaweed, *Food Chemistry*, v. 65, p. 399-403, 1999.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, v. 25, p. 294-306, 2007.

- CHIU, S. Y.; KAO, C. Y.; TSAI, M. T.; ONG, S. C.; CHEN, C. H.; LIN, C. S.; Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 833 – 838, 2009.
- CONVERTI, A.; CASAZZA, A. A.; ORTIZ, E. Y.; PEREGO, P.; BORGHI, M. D. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, v. 48, 1146-1151, 2009.
- CORDEIRO, C. S.; SILVA, F. R.; WYPYCH, F.; RAMOS, L. P. Catalisadores heterogêneos para a produção de monoésteres graxos (biodiesel). *Química Nova*, v. 34, p. 477-486, 2011.
- CORDEIRO, C. S. Compostos lamelares como catalisadores em reações de (trans)esterificação (m)etílica. 167 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- CORSO, M. Estudo da extração de óleo de sementes de gergelim (*Sesamun indicum* L.) empregando os solventes dióxido de carbono supercrítico e n-propano pressurizado. 106 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2008.
- D'ARCE, M. A. B. R. Matérias-primas oleaginosas e biodiesel. ESALQ/USP, setor de açúcar e álcool, 2005.
- D'OCA, M. G. M.; VIÊGAS, C. V.; LEMÕES, J. S.; MIYASAKI, E. K.; MÓRON-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*, v. 35, p.1533-1538, 2011.
- DERNER, R. B.; OHSE S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, v.36, p.1959-1967, 2006.
- DURMAZ, Y. Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. *Aquaculture*, v. 272, p. 717-722, 2007.
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 497-507, 1957.
- FREITAS, L. S.; OLIVEIRA, J. V.; DARIVA, C.; JACQUES R. A.; CARAMÃO, E. B. Extraction of grape seed oil using compressed carbon dioxide and propane: extraction yields and characterization of free glycerol compounds. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 2558-2564, 2008.
- FREITAS, L. S. Desenvolvimento de procedimentos de extração do óleo de semente de uva e caracterização química dos compostos extraídos. 227 p. Tese (Doutorado em Química), Instituto de Química – UFRGS, Porto Alegre, 2007.
- GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W. **Algae**. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2000.

- 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 the Royal Society Interface*, v.7, p. 703-726, 2010.
- GRIMA, E. M.; MEDINA, A. R.; GIMÉNEZ, A. G.; PÉREZ, J. A. S.; CAMACHO, F. G.; SÁNCHEZ, J. L. G. Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 71, p. 955-959, 1994.
- HALIM, R.; GLADMAN, B.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 178-185, 2011.
- HODGSON, P. A.; HENDERSON, R. J.; SARGENTE, J. R.; LEFTLEY, J. W., Patterns of variation in the lipid class and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) during batch culture. *Journal of Applied Phycology*, v. 3, p. 169-181, 1991.
- HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A., Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances, *The plant journal*, v. 54, p. 621-639, 2008.
- HUNTLEY, M. E.; REDALJE, D. G. CO₂ Mitigation and Renewable oil from photosynthetic microbes: A new appraisal, *Mitigation and adaptation Strategies for Global Change*, v. 12, p. 573-608, 2006.
- ILLÉS, V.; DAOOD, H. G.; PERNECZKI, S.; SZOKONYA, L.; THEN, M.; Extraction of coriander seed oil by CO₂ and propane at super- and subcritical conditions, *Journal of Supercritical Fluids*, v. 17, p. 177-186, 2000.
- KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. *Manual de Biodiesel*. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2006.
- KOBERG, M.; COHEN, M.; AMOTZ, A. B.; GEDANKEN, A. Bio-diesel production directly from the microalgae biomass of *Nannochloropsis* by microwave and ultrasound radiation. *Bioresource Technology*, v. 102, 4265-4269, 2011.
- LANÇAS, F. M. Extração com Fluido Supercrítico: Quo Vadis? *Revista Analytica*, p. 30-37, 2002.
- LEE, J. Y.; YOO, C.; JUN, S. Y.; AHN, C. Y.; OH, H. M. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae, *Bioresource Technology*, v. 101, p. S75-S77, 2010.
- LOURENÇO, S. O. *Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações*. São Carlos: RiMa, 2006.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, p. 217-232, 2010.

- MEIRELES, M. A. A. Tecnologia supercrítica aplicada ao processamento de produtos naturais em leito fixo. Monografia – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, 1999.
- MENDES, A. P. A.; COSTA, R. C. Mercado brasileiro de biodiesel e perspectivas futuras. Biocombustíveis. BNDES Setorial, v. 31, p. 253-280, 2010.
- MENEZES, R. S.; LELES, M. I. G.; SOARES, A. T.; FRANCO, P. I. B. M.; SANT'ANNA, C. L.; VIEIRA, A. A. H.; ANTONIOSI FILHO, N. R. 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.
- MURAKAMI, R.; HASHIMOTO, H., Unusual nuclear division in *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae, Heterokonta) which may ensure faithful transmission of secondary plastids. Protist, v. 160, p. 41-49, 2009
- NIMET, G. Avaliação dos solventes dióxido de carbono supercrítico e propano subcrítico na extração do óleo de girassol. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – UNIOESTE, Toledo, 2009.
- OHSE, S.; DERNER, R., B.; OZÓRIO, R. A.; BRAGA, M. V. C.; CUNHA, P.; LAMARCA, C. P.; SANTOS, M. E.; Produção de biomassa e teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e proteína em microalgas. Ciência Rural, v. 39, n.6, p. 1760 – 1767, 2009.
- PEDERSSETTI, M. M. Análise dos efeitos da temperatura e pressão na extração supercrítica do óleo essencial de canola com dióxido de carbono supercrítico e n-propano pressurizado. 90 p. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2008.
- PEREIRA, C. M. P.; HOBUSS, C. B.; MACIEL, J. V.; FERREIRA, L. R.; DEL PINO, F. B.; MESKO, M. F. Biodiesel renovável derivado de microalgas: avanços e perspectivas tecnológicas. Química Nova, v. 35, p. 2013-2018, 2012.
- PETKOV, G.; GARCIA, G.; Which are fatty acids of the green alga *Chlorella*?. Biochemical Systematics and Ecology, v. 35, p. 281 – 285, 2007.
- PINTO, G. M. F.; PINTO, J. F.; JARDIM, I. C. S. F., Extração com Fluido Supercrítico, Chemkeys - Liberdade para aprender, p.1-12, 2006.
- POURMORTAZAVI, S. M.; HAJIMIRSADEGHI, S. S.; Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. Journal of Chromatography A, v. 1163, p. 2 – 24, 2007.
- QUINN, J. C.; YATES, T.; DOUGLAS, N.; WEYER, K.; BUTLER, J.; BRADLEY, T. H.; LAMMERS, P. J.; *Nannochloropsis* production metrics in a scalable outdoor photobioreactor for commercial applications. Bioresource Technology, v. 117, p. 164 – 171, 2012.
- RAMOS, L. P.; SILVA, F. R.; MANGRICH, A. S.; CORDEIRO, C. S. Tecnologias de produção de biodiesel. Revista Virtual de Química, v. 3, p. 385-405, 2011.

- RCC – ROSCOFF CULTURE COLLECTION. Station Biologique de Roscoff – Palnkton Group. Disponível em <<http://www.sb-roscoff.fr/Phyto/RCC/index.php>>. Acesso em 10/01/12.
- RENAUD, S. M.; THINH, L. V.; PARRY, D. L. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture*, v. 170, p. 147-159, 1999.
- RICHMOND, A. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford: Blackwell Science, 2004
- RODOLFI, L.; ZITELLI, G. C.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. R. Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 102, p. 100-112, 2009.
- SANTANA, A.; JESUS, S.; LARRAYOZ, M. A.; FILHO, R. M. Supercritical carbon dioxide extraction of algal lipids for the biodiesel production, *Procedia Engineering*, v. 42, p. 1755 -1761, 2012.
- SOARES, D.; Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciências: Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- SOH, L.; ZIMMERMAN, J. Biodiesel production: the potential of algal lipids extracted supercritical carbon dioxide. *Green Chemistry*, v. 3, p. 1422-1429, 2011.
- SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS, A. L. F.; RODRIGUES, J. P.; ALVES, M. B. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. *Química Nova*, v. 32, p. 768-775, 2009.
- SU, C. H.; CHIEN, L. J.; GOMES, T.; LIN, Y. S.; KUN, Y. Y.; LIOU, J. S.; SYU, R. J., Factors affecting lipid accumulation by *Nannochloropsis oculata* in two-stage cultivation process. *Journal of Applied Phycology*. v. 23, p. 903-908, 2011.
- SUKENIK, A.; Ecophysiological considerastion in the optimization of eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis sp.* (Eustigmatophyceae), *Bioresource Technology*, v.35, p. 263-269, 1991..
- TAKAGI, M.; KARSENKO; YOSHIDA, T. Effect of salt concentration on intracelular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *Journal of Bioscience and bioengineering*, v. 101, p. 223-226, 2006.
- TANG, S.; QIN, C.; WANG, H.; LI, S.; TIAN, S., Study on supercritical extraction of lipids and enrichment of DHA from oil-rich microalgae. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 57, p. 44-49, 2011(a).

- TANG, D.; HAN, W.; LI, P.; MIAO, X.; ZHONG, J.; CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels, *Bioresource Technology*, v. 102, p. 3071 – 3076, 2011 (b).
- VAUCHINSKI, L.; SOBRINHO, R. C. M. A; FARIAS, S. P.; CALDAS, S. S.; ROSELET, F. F. G.; PRIMEL, E. G.; ABREU, P. C.; D'OCA, M. G. M.; Determinação do teor lipídico e do perfil graxo das microalgas *Amphora* sp, *Chlorella* sp, *Nannochloropsis oculata* e *Thalassiosira weissflogii*, 34^o SBQ, Florianópolis, 2010.
- VOGEL, A.I. *Análise Química Quantitativa*. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1992.
- VOOREN, G. V.; GRAND, F. L.; CUINÉ, S.; PELTIER, G.; PRUVOST, J. Investigation of fatty acids accumulation in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel application. *Bioresource Technology*, v. 124, p. 421-432, 2012.
- ZITTELLI, G. C.; LAVISTA, F.; BASTIANINI, A.; RODOLFI, L.; VINCENZINI, M.; TREDICI, M. R.; Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. Cultures in outdoor tubular photobioreactors, *Journal of Biotechnology*, v. 70, p. 299 – 312, 1999.

APÊNDICE 1 - MONOESTERES IDENTIFICADOS E SEUS RESPECTIVOS TEMPOS DE RETENÇÃO

TEMPO DE RETENÇÃO (min)	ÉSTER METÍLICO DO ÁCIDO GRAXO	NOTAÇÃO TAQUIGRÁFICA	MICROALGA
6,55	Decanóico	C10:0	<i>N. oculata</i>
9,07	Dodecanóico	C12:0	<i>N. oculata</i> e <i>P.pyrenoidosa</i>
11,41	11 – Tetradecenóico	C14:1	<i>N. oculata</i>
11,48	Tetradecanóico	C14:0	<i>N. oculata</i> e <i>P.pyrenoidosa</i>
12,30	Pentadecanóico	C15:0	<i>N. oculata</i>
14,04	7,10 – Hexadienóico	C16:2	<i>N. oculata</i> e <i>P. pyrenoidosa</i>
14,14	7,10,13 – Hexatrienóico	C16:3	<i>P. pyrenoidosa</i>
14,35	9 – Hexadecenóico	C16:1	<i>N. oculata</i> e <i>P.pyrenoidosa</i>
14,55	7 - Hexadecenóico	C16:1	<i>N. oculata</i>
14,61	Hexadecanóico	C16:0	<i>N. oculata</i> e <i>P.pyrenoidosa</i>
16,52	Heptadecanóico	C17:0	<i>P. pyrenoidosa</i>
17,89	9,12 - Octadienóico	C18:2	<i>N. oculata</i> e <i>P.pyrenoidosa</i>
18,03	9,12,15 - Octadecatrienóico	C18:3	<i>N. oculata</i> e <i>P.pyrenoidosa</i>
18,09	9 - Octadecenóico	C18:1	<i>N. oculata</i> e <i>P.pyrenoidosa</i>
18,17	6 - Octadecenóico	C18:1	<i>N. oculata</i>
18,54	Octadecanóico	C18:0	<i>N. oculata</i> e <i>P.pyrenoidosa</i>
21,37	5, 8, 11, 14 - Eicosatetranóico	C20:4	<i>N. oculata</i>
21,58	5, 8, 11, 14, 17 - Eicosapentanóico	C20:5	<i>N. oculata</i>
22,15	5,8 - Eicosadienóico	C20:2	<i>N. oculata</i>

APÊNDICE 2 - ESPECTROS DE MASSAS DOS MONOÉSTERES

Espectros de massas de monoésteres metílicos obtidos após a metodologia de Hartman e Lago nas amostras das microalgas *N. oculata* e *P. pyrenoidosa*. Os espectros com linhas em vermelho se referem a compostos de referência obtidos através da biblioteca NIST do equipamento e os espectros com as linhas em verde foram obtidos para os componentes das amostras.

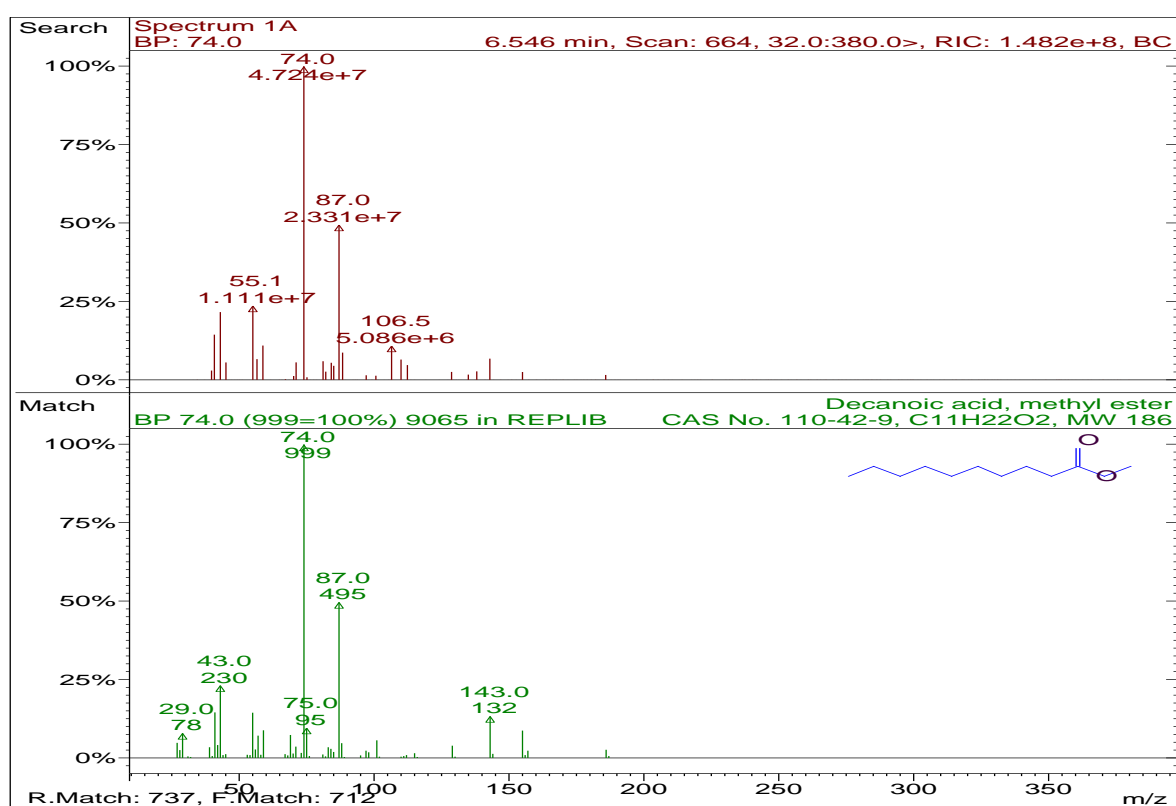


FIGURA 2.1 - Espectros do decanoato de metila (caprato de metila) com tempo de retenção de 6,55 min, presente na microalga *N. oculata*.

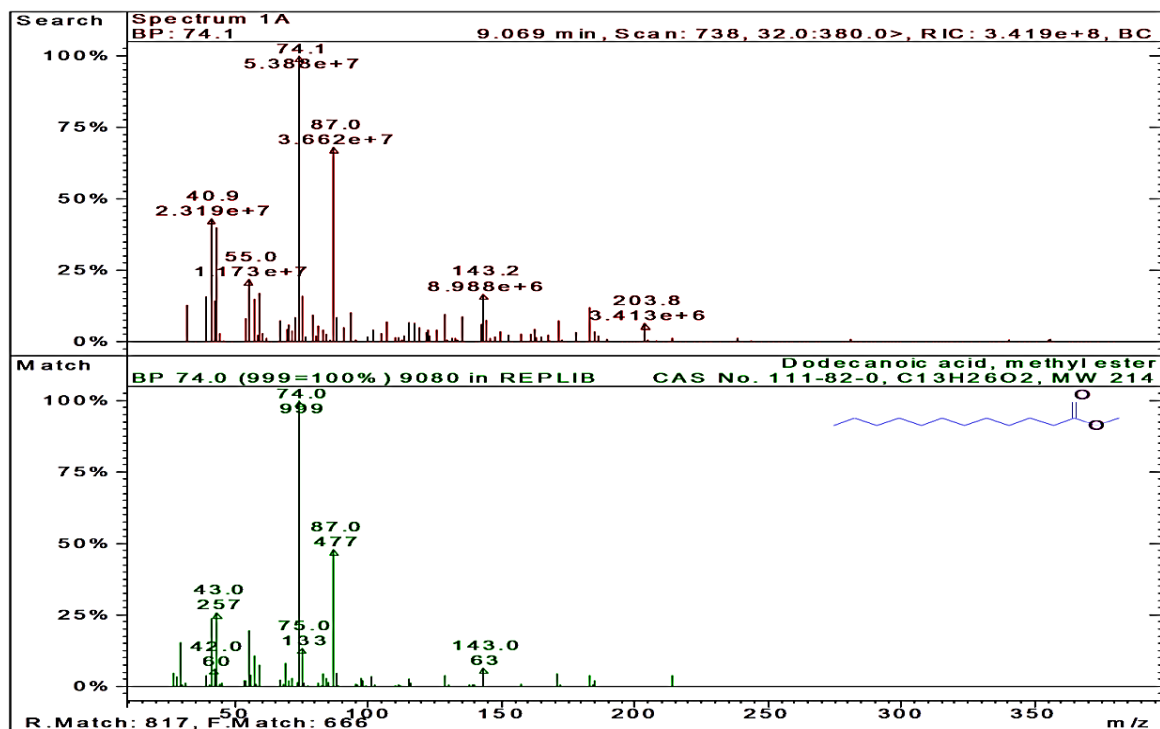


FIGURA 2.2 - Espectros do dodecanoato de metila (laurato de metila) com tempo de retenção de 9,07 min, presente nas microalgas *N. oculata* e *P. pyrenoidosa*.

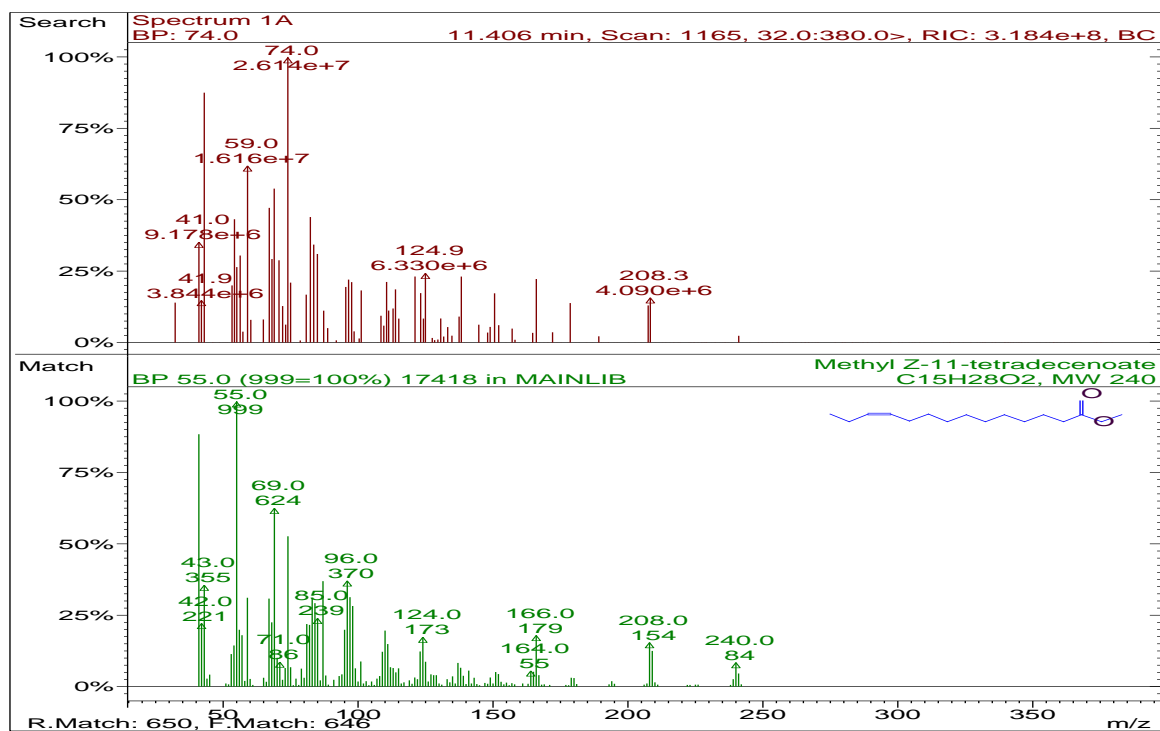


FIGURA 2.3 - Espectros do 11 - tetradecenoato de metila com tempo de retenção de 11,41 min, presente na microalga *N. oculata*.

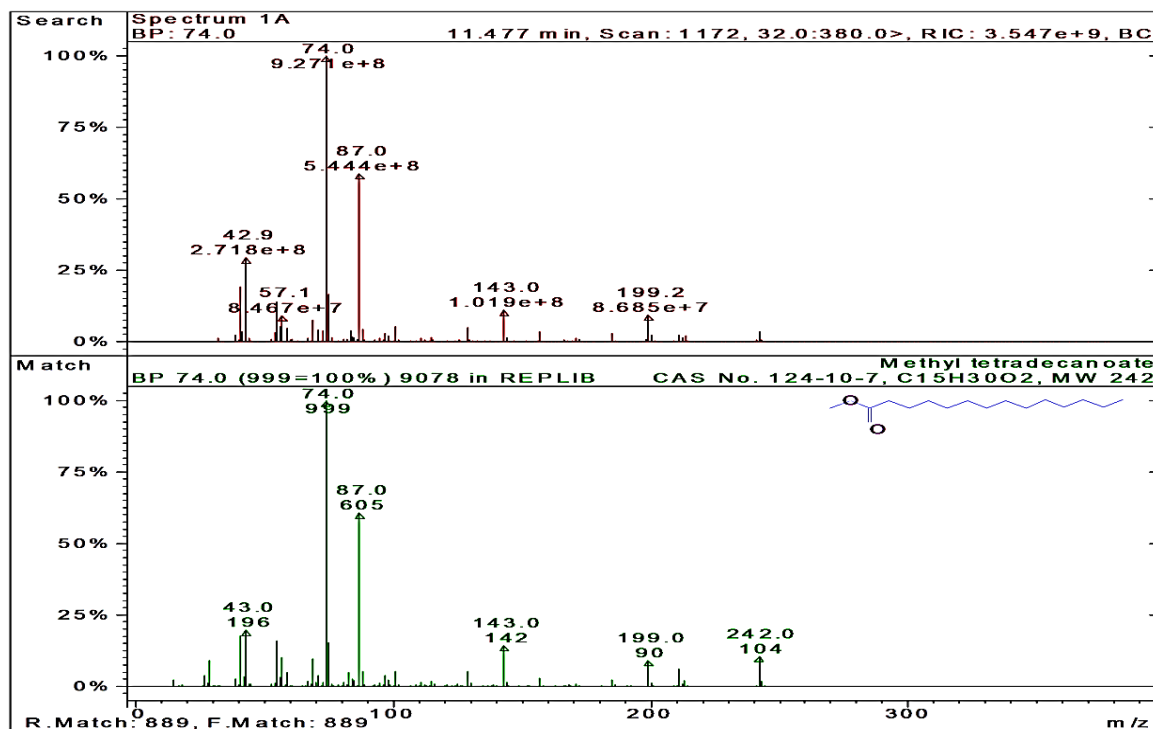


FIGURA 2.4 - Espectros do tetradecanoato de metila (miristato de metila) com tempo de retenção de 11,48 min, presente nas microalgas *N. oculata* e *P. pyrenoidosa*.

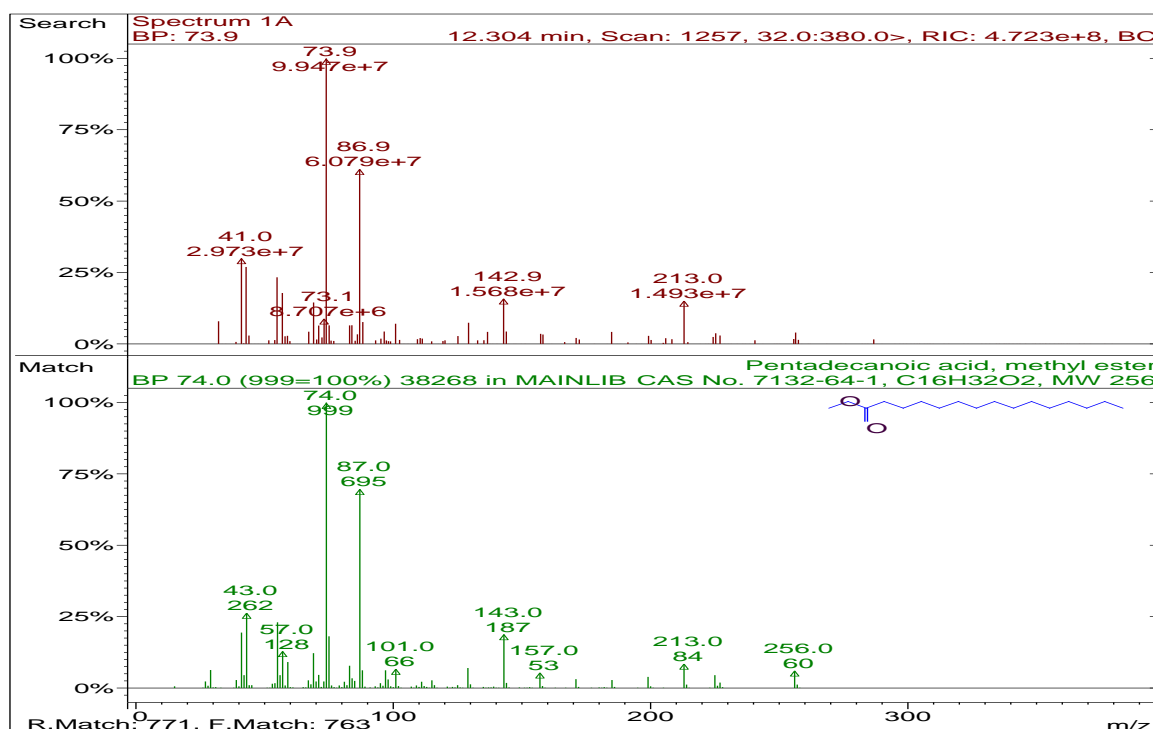


FIGURA 2.5 - Espectros do pentadecanoato de metila com tempo de retenção de 12,30 min, presente na microalga *N. oculata*

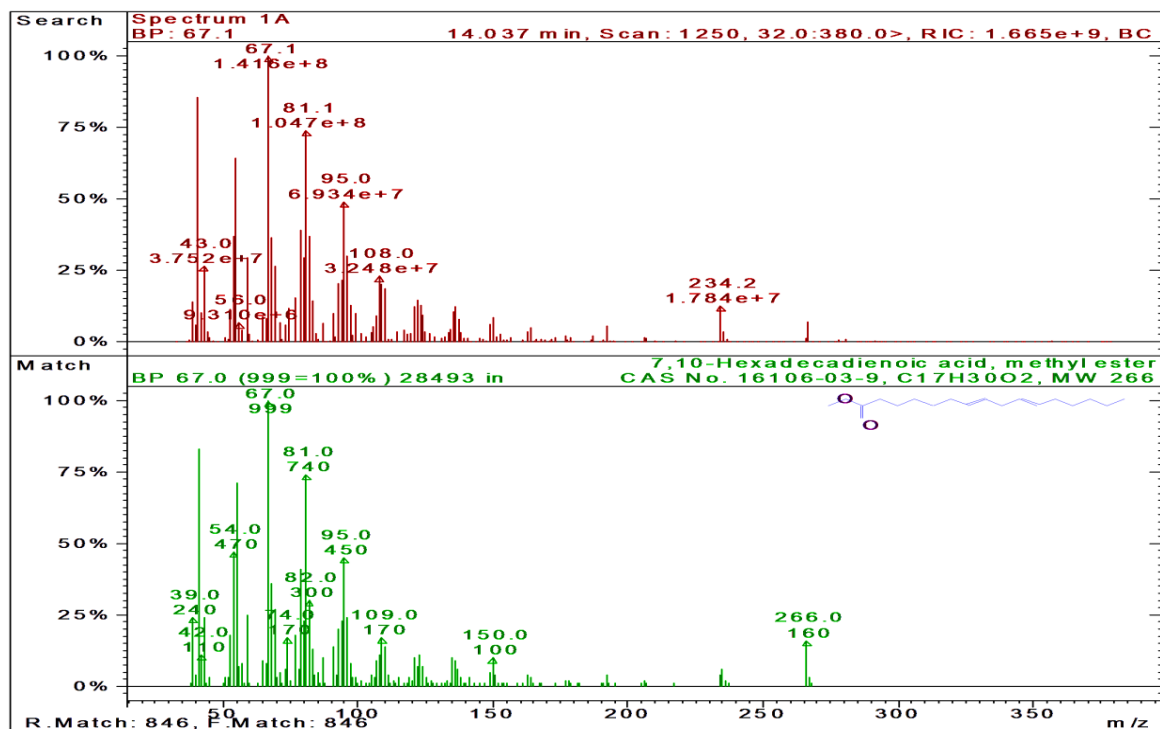


FIGURA 2.6 - Espectros do 7,10 - Hexadienoato de metila com tempo de retenção de 14,04min, presente nas microalgas *N. oculata* e *P. pyrenoidosa*.

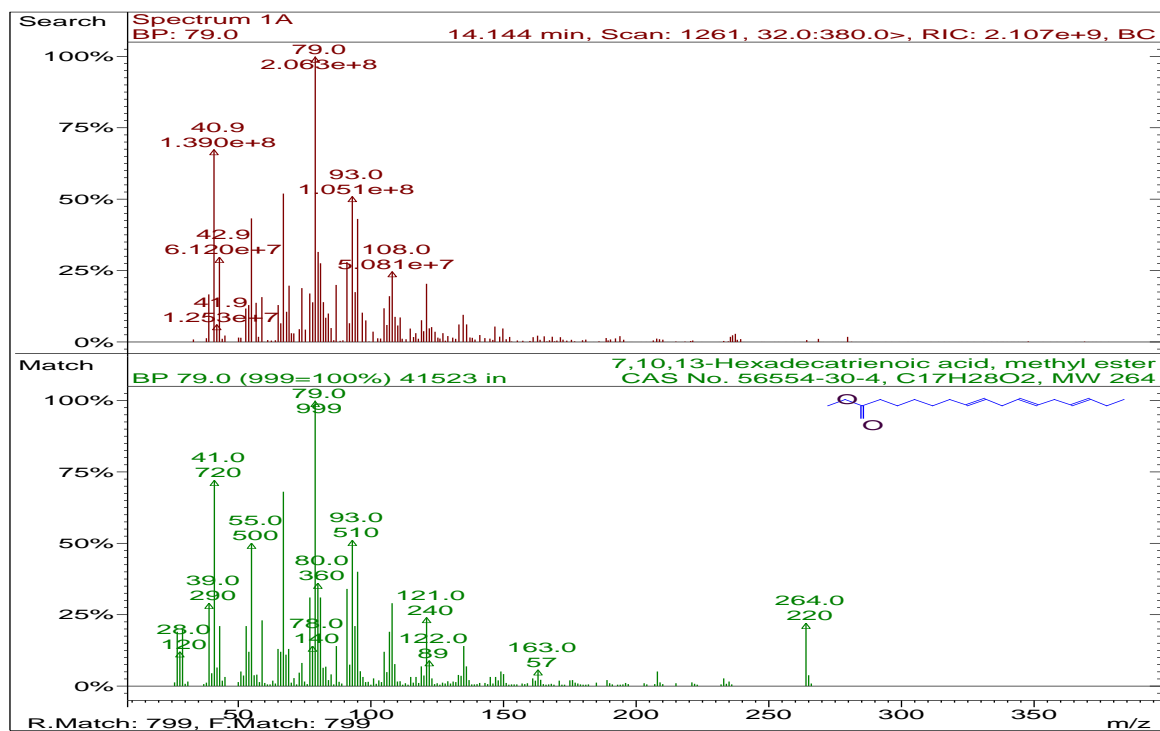


FIGURA 2.7 - Espectros do 7,10,13 – hexadecatrienoato de metila com tempo de retenção de 14,14 min, presente na microalga *P. pyrenoidosa*.

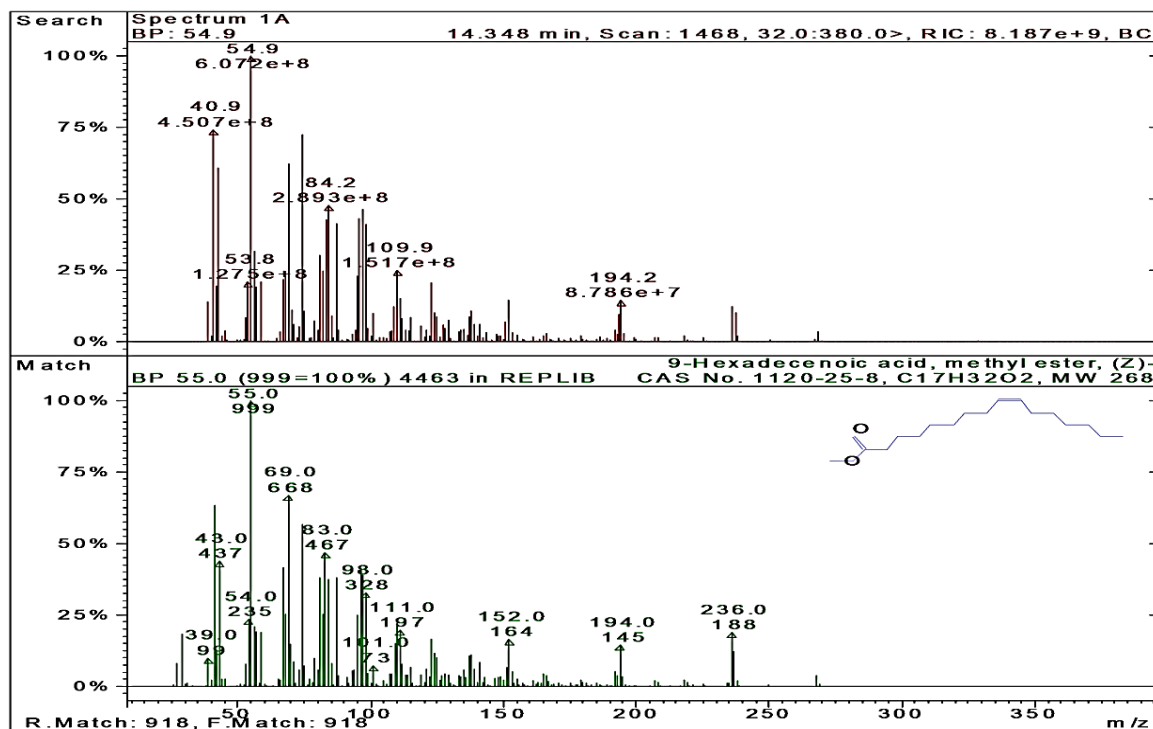


FIGURA 2.8 - Espectros do 9 - hexadecenoato de metila (palmitoleato de metila) com tempo de retenção de 14,35 min, presente nas microalgas *N. oculata* e *P. pyrenoidosa*.

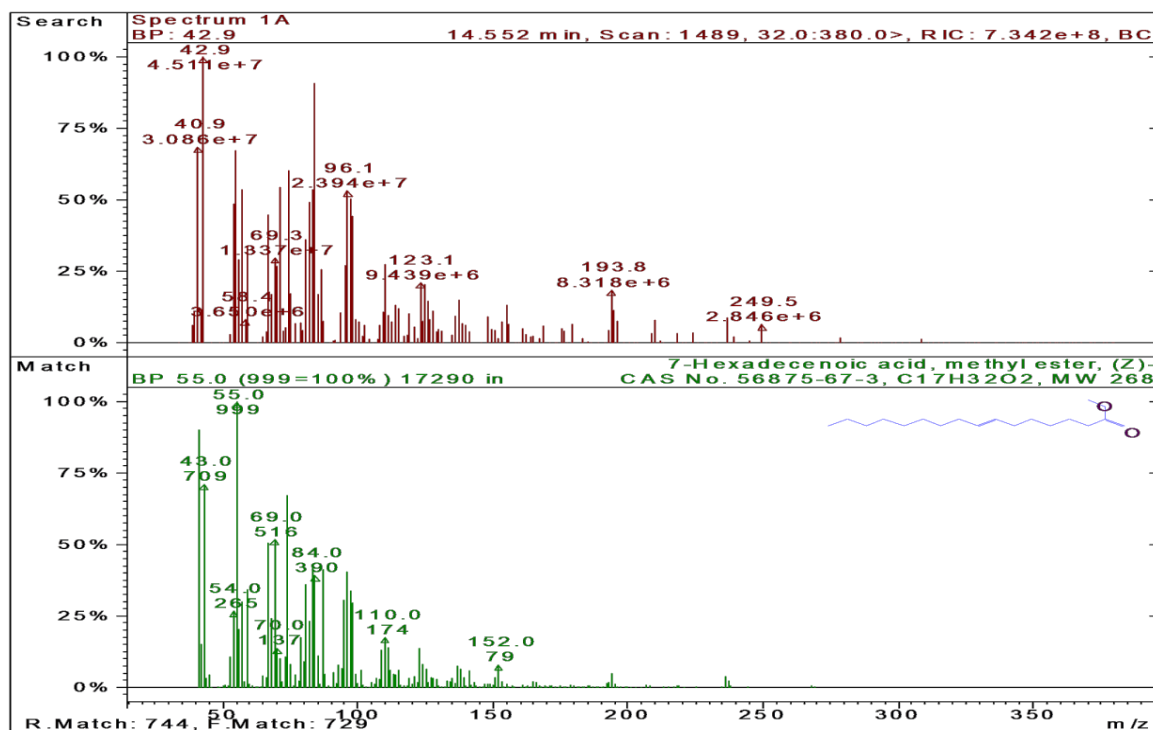


FIGURA 2.9 - Espectros do 7 - hexadecenoato de metila com tempo de retenção de 14,55 min, presente na microalga *N. oculata*

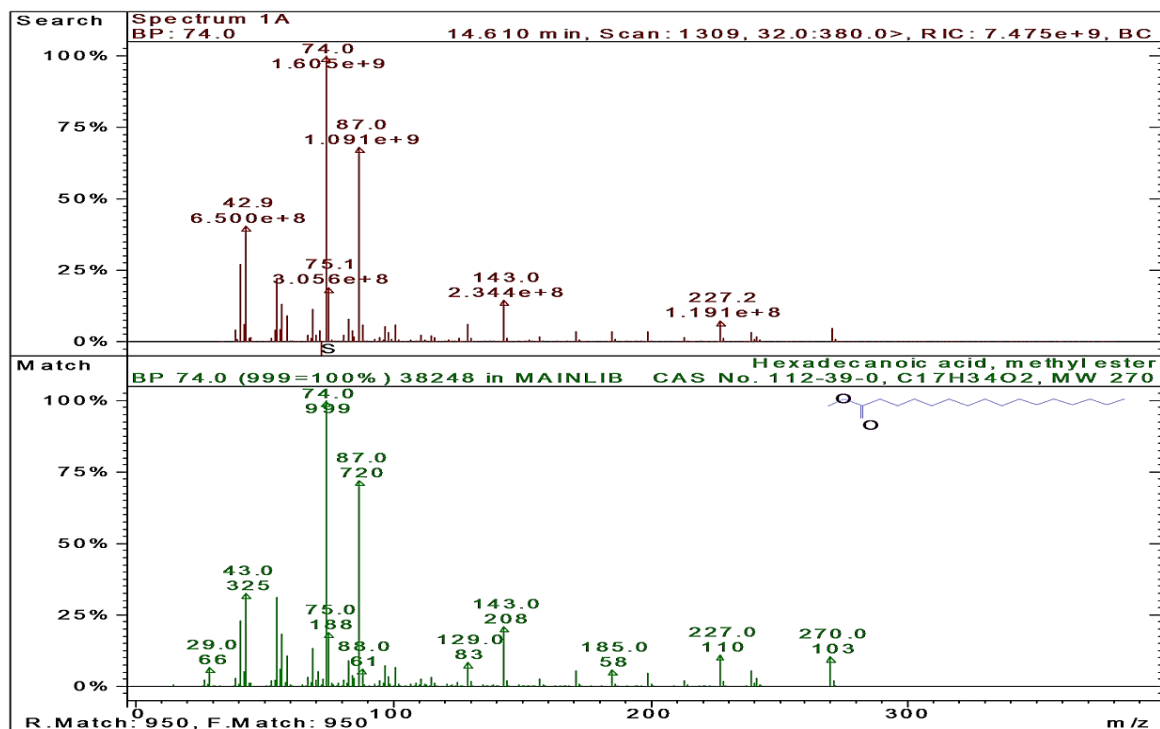


FIGURA 2.10 – Espectro do hexadecanoato de metila (palmitato de metila) com tempo de retenção de 14,61 min, presente nas microalgas *N. oculata* e *P. pyrenoidosa*.

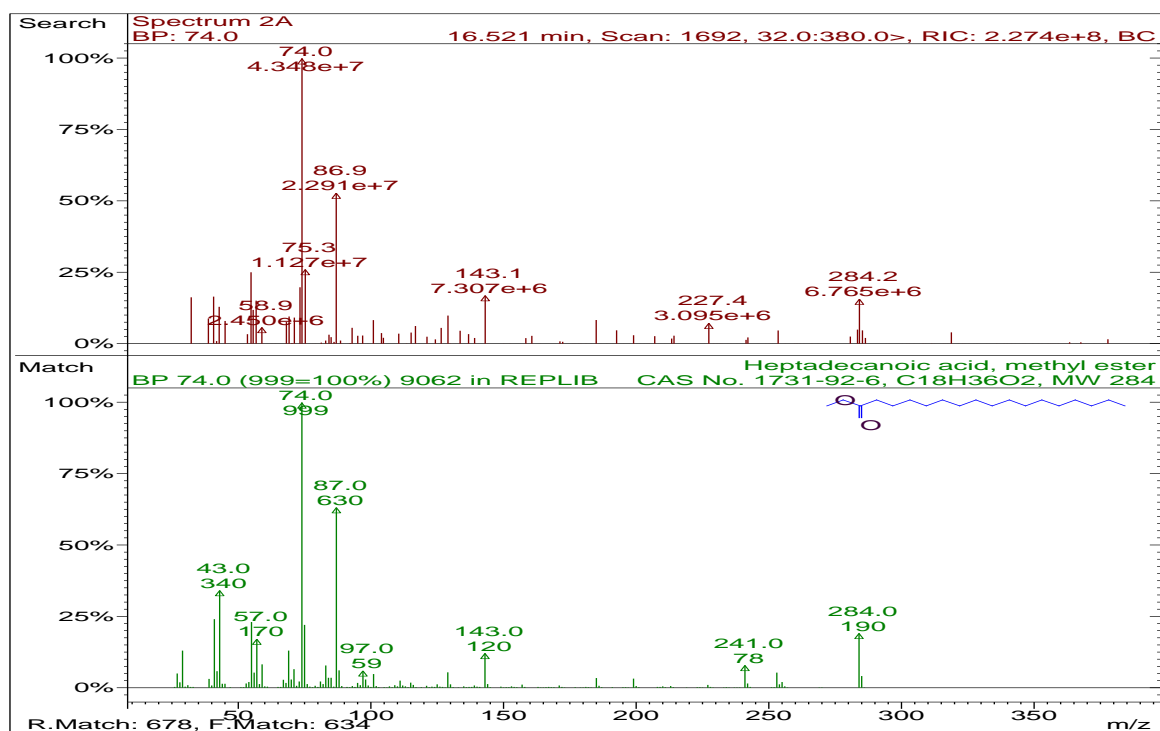


FIGURA 2.11 - Espectros do heptadecanoato de metila (margarato de metila) com tempo de retenção de 16,52 min, presente na microalga e *P. pyrenoidosa*.

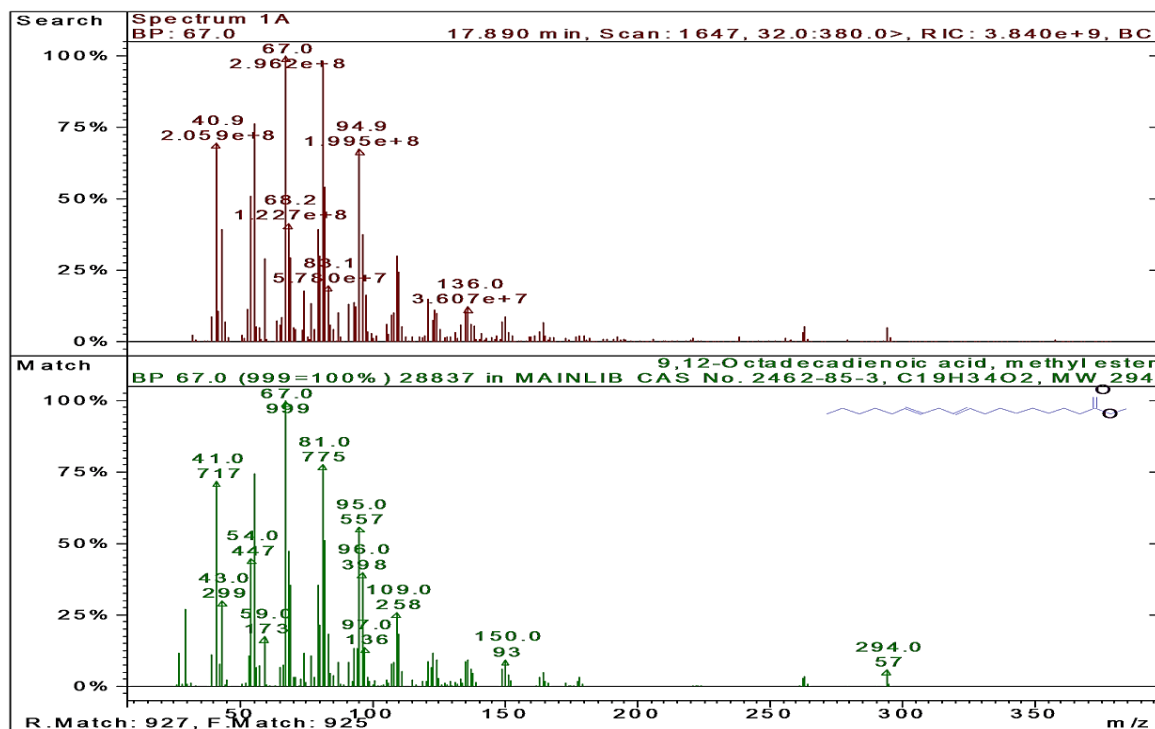


FIGURA 2.12 - Espectros do 9,12 - octadecadienoato de metila (linoleato de metila) com tempo de retenção de 17,89 min, presente nas microalgas *N. oculata* e *P. pyrenoidosa*.

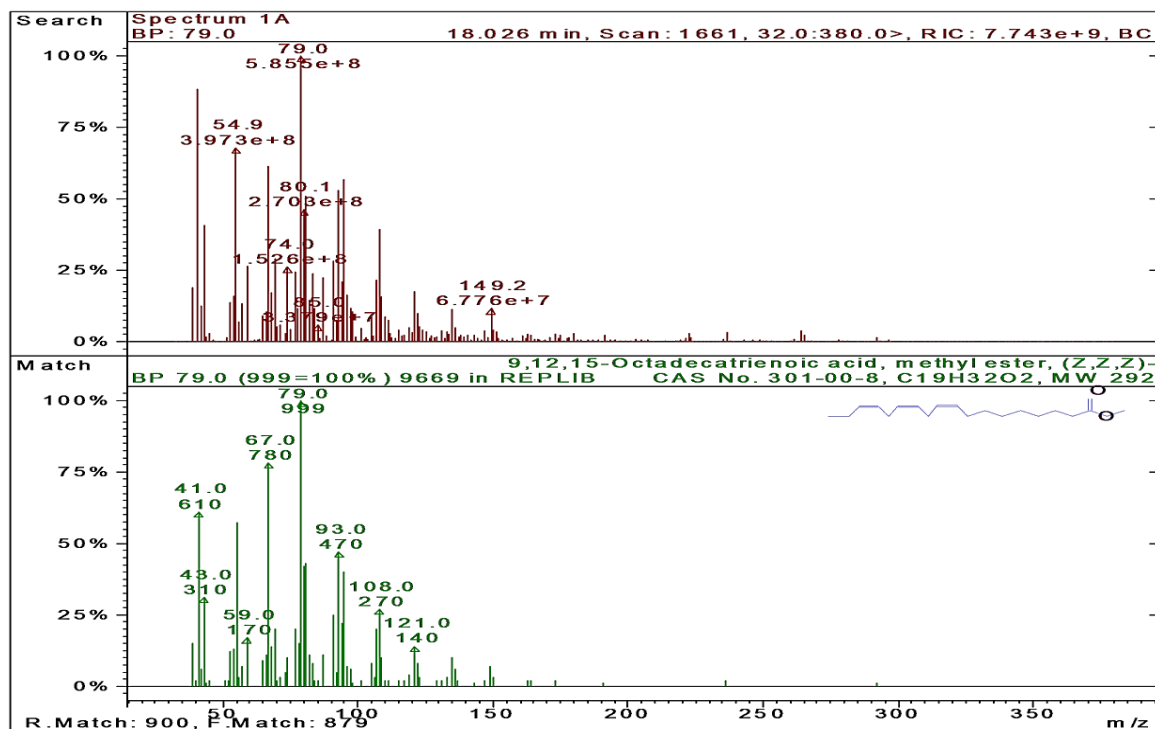


FIGURA 2.13 - Espectros do 9,12,15 - octadecatrienoato de metila (linolenato de metila) com tempo de retenção de 18,03 min, presente nas microalgas *N. oculata* e *P. pyrenoidosa*.

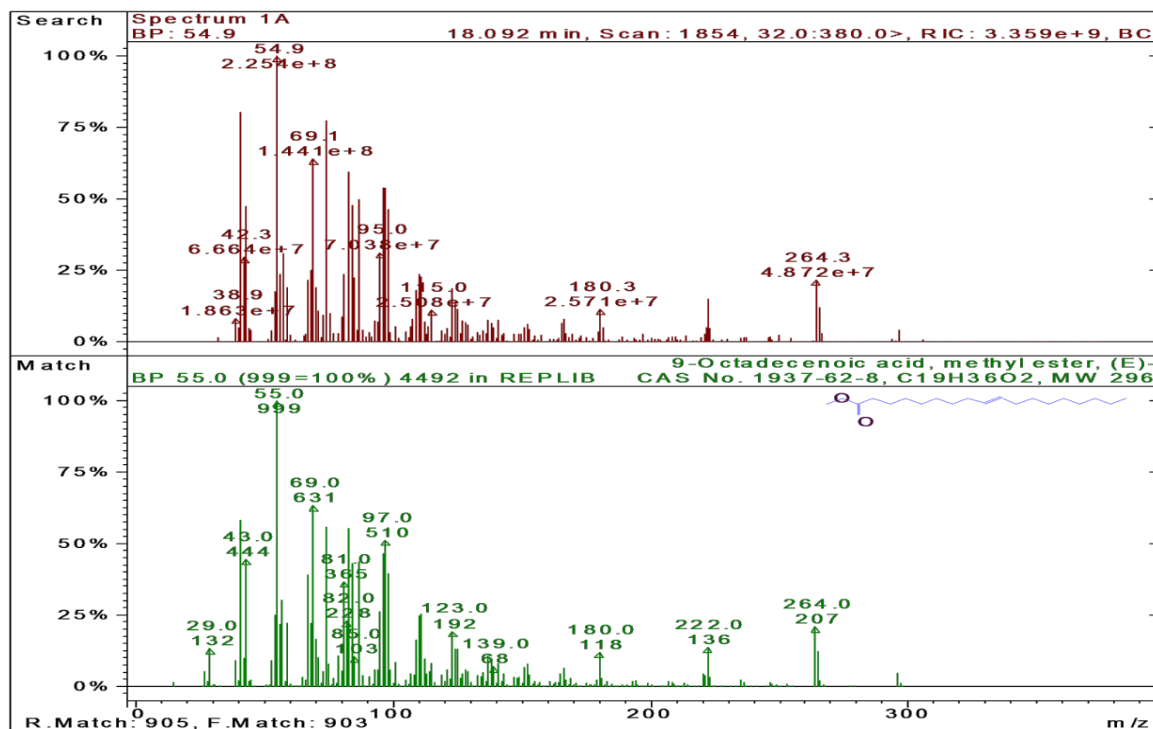


FIGURA 2.14 - Espectros do 9 - octadecenoato de metila (oleato de metila) com tempo de retenção de 18,09 min, presente nas microalgas *N. oculata* e *P. pyrenoidosa*.

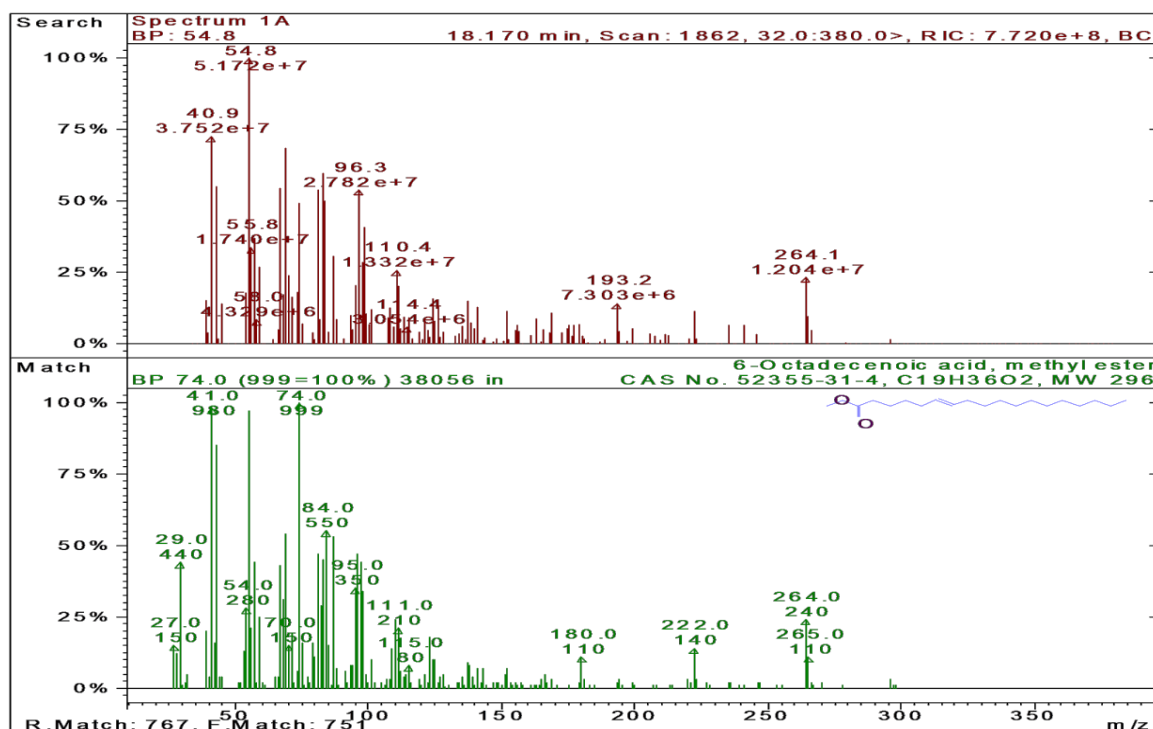


FIGURA 2.15 - Espectros do 6 - octadecenoato de metila com tempo de retenção de 18,17 min, presente na microalga *N. oculata*.

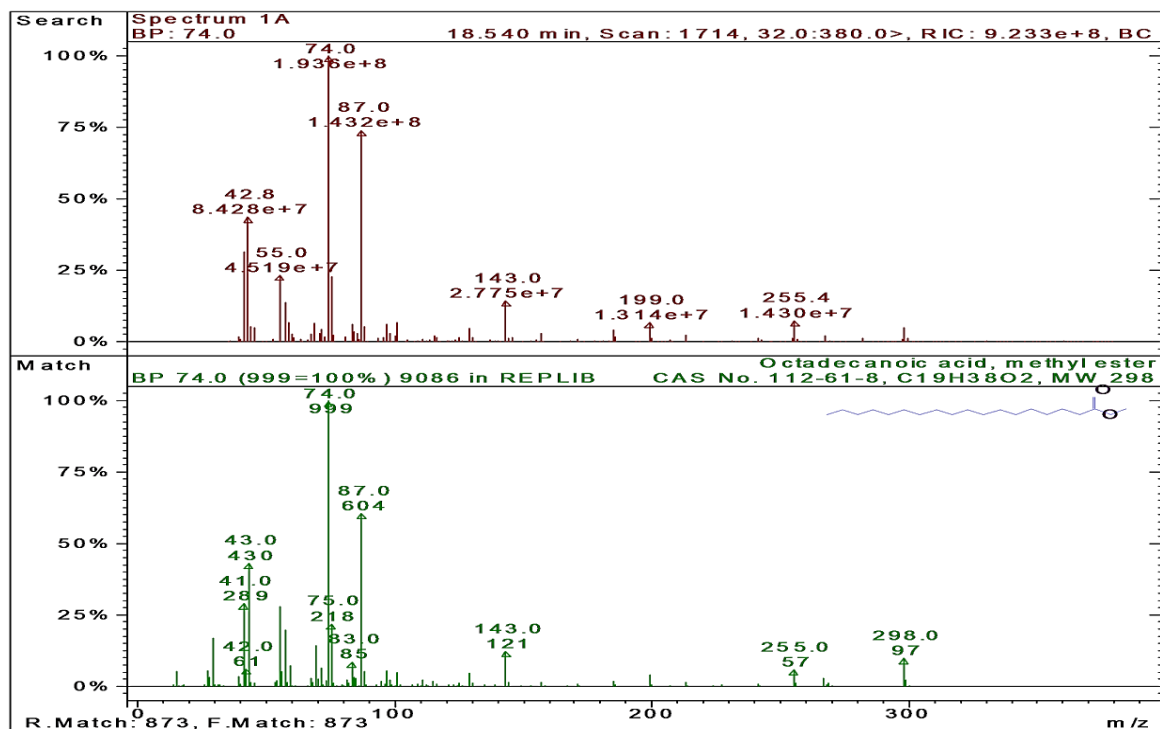


FIGURA 2.16 - Espectros do octadecanoato de metila (estearato de metila) com tempo de retenção de 18,54 min, presente nas microalgas *N. oculata* e *P. pyrenoidosa*.

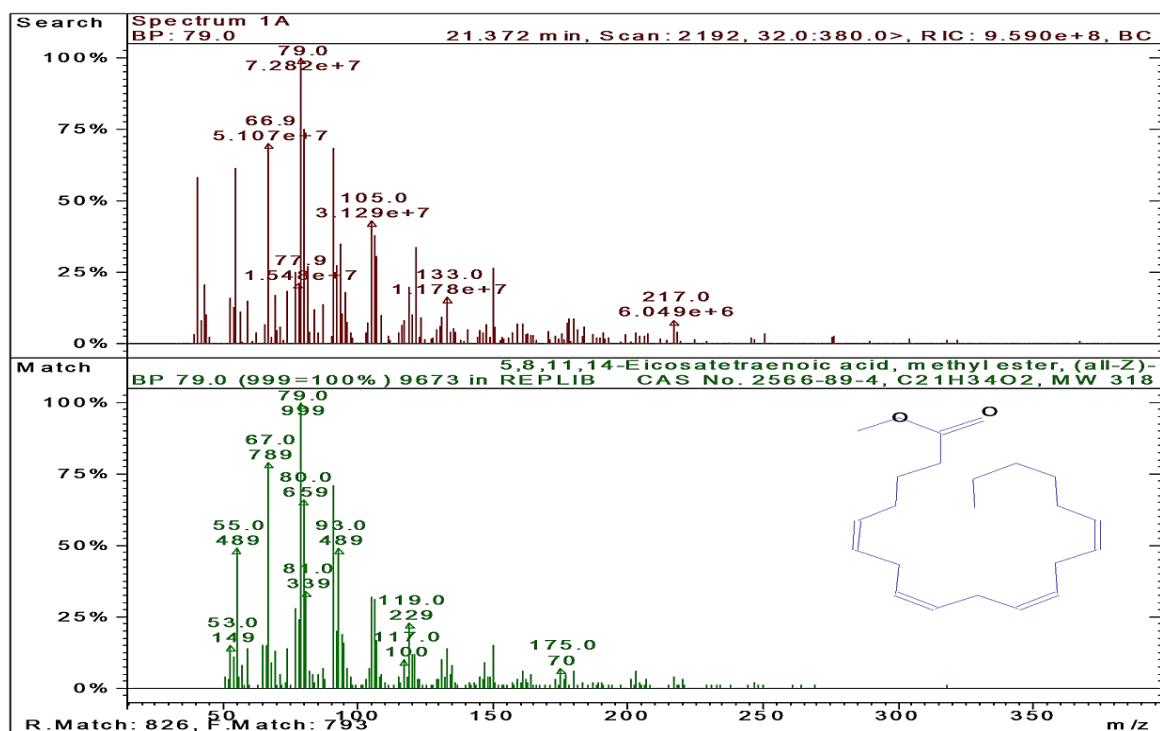


FIGURA 2.17 - Espectros do 5,8,11,14 – eicosatetraenoato de metila com tempo de retenção de 21,37 min, presente nas microalgas *N. oculata*.

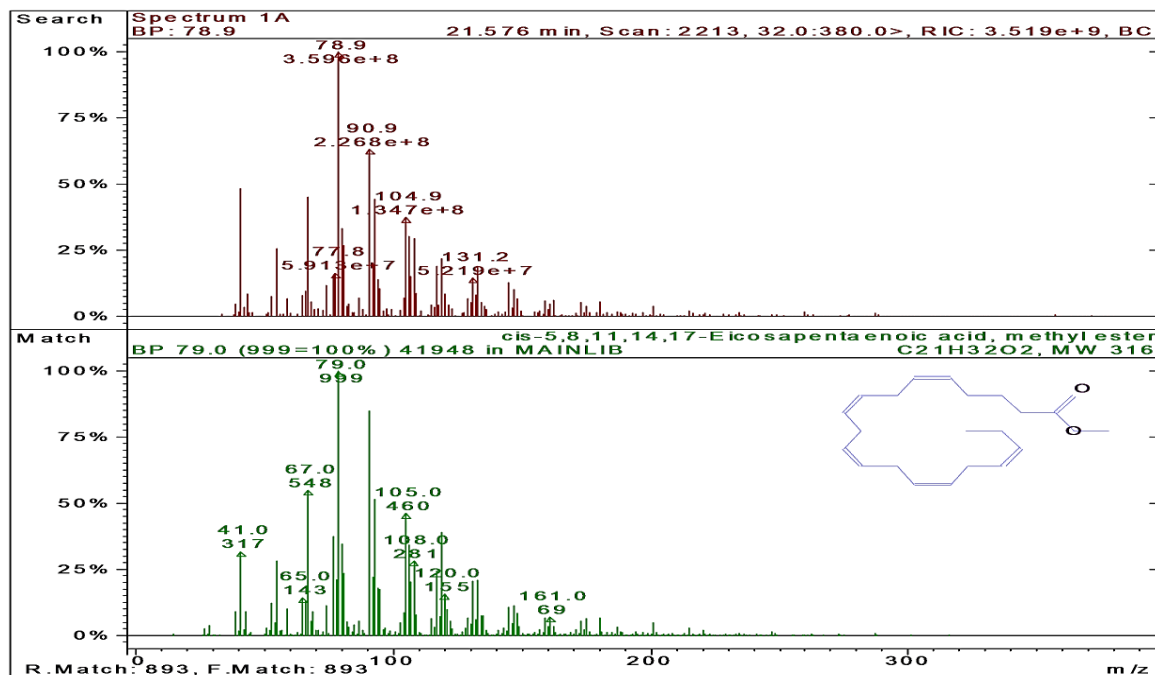


FIGURA 2.18 - Espectros do 5,8,11,14, 17 – eicosapentaenoato de metila (EPA) com tempo de retenção de 21,58 min, presente nas microalgas *N. oculata*.

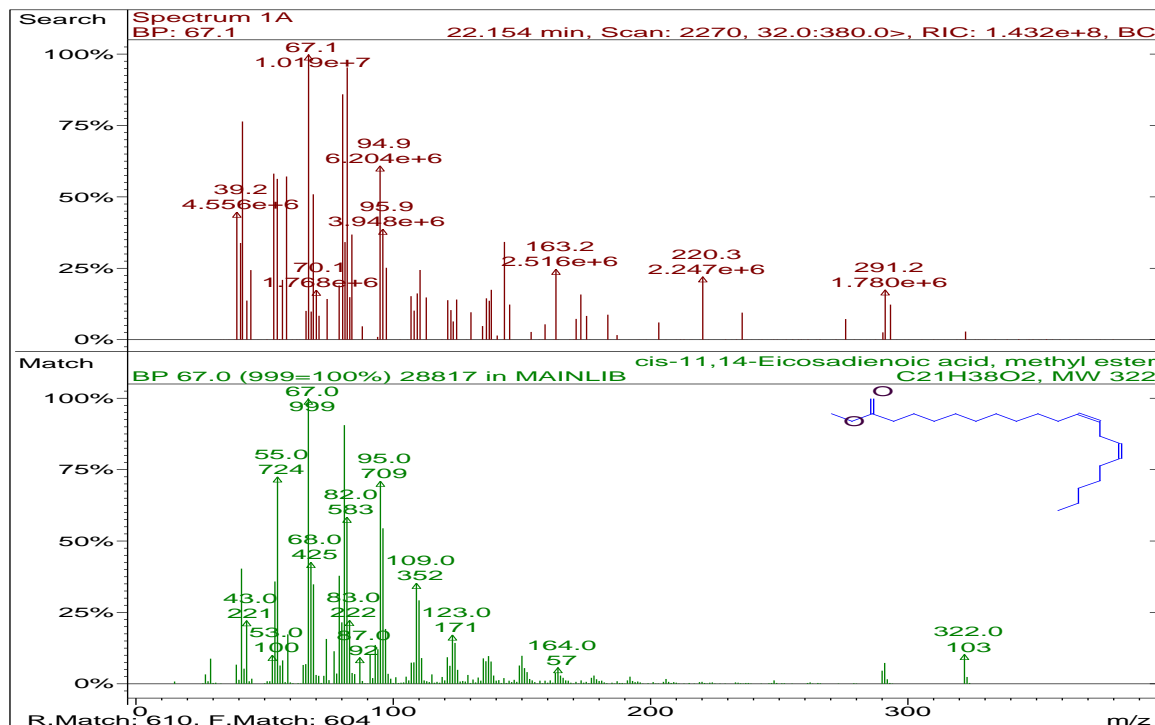


FIGURA 2.19 - Espectros do cis 11,14 – eicosadienoato de metila com tempo de retenção de 22,15 min, presente na microalga *N. oculata*.

APÊNDICE 3 – IDENTIFICAÇÃO DOS MONOÉSTERES E SEUS RESPECTIVOS FRAGMENTOS DE MASSAS

ÉSTER METÍLICO DO ÁCIDO GRAXO	NOTAÇÃO TAQUIGRÁFICA	PRINCIPAIS FRAGMENTOS	MASSA MOLECULAR
Decanóico	C10:0	29, 43, 74, 75, 87, 143	186
Dodecanóico	C12:0	42, 43, 74, 87, 143	214
11 - Tetradecenóico	C14:1	42, 43, 55, 69, 85, 96, 124, 166, 208	240
Tetradecanóico	C14:0	43, 74, 87, 143, 199	242
Pentadecanóico	C15:0	43, 59, 67, 74, 83, 115, 143, 157, 213	256
7,10 – Hexadienoico	C16:2	39, 54, 67, 74, 81, 82, 95, 109, 150	266
7,10,13 – Hexatrienoico	C16:3	28, 39, 41, 55, 79, 93, 121, 141, 163, 208, 233	264
9 - Hexadecenóico	C16:1	39, 43, 54, 55, 69, 83, 98, 111, 152, 194, 236	268
7 - Hexadecenóico	C16:1	43, 54, 55, 69, 84, 110, 152, 194, 236	268
Hexadecanóico	C16:0	29, 43, 74, 75, 87, 88, 129, 143, 185, 227	270
Heptadecanóico	C17:0	43, 57, 74, 87, 97, 143, 241	284
9,12 - Octadienóico	C18:2	41, 43, 54, 59, 67, 81, 95, 97, 109, 150	294
9,12,15 - Octadecatrienoico	C18:3	41, 43, 59, 67, 79, 93, 108, 121	292
9 - Octadecenóico	C18:1	29, 43, 55, 69, 81, 97, 123, 180, 222, 264	296
6 - Octadecenóico	C18:1	29, 41, 54, 70, 74, 84, 95, 111, 115, 180, 222, 264	296
Octadecanóico	C18:0	43, 55, 74, 87, 97, 143, 199, 255	298
5, 8, 11, 14 - Eicosatetranóico	C20:4	53, 55, 67, 79, 80, 81, 93, 119, 175, 217, 247	318
5, 8, 11, 14, 17 - Eicosapentanóico	C20:5	41, 65, 67, 79, 105, 108, 120, 161, 180, 215, 287	316
5,8 - Eicosadienoico	C20:2	43, 53, 55, 67, 68, 82, 95, 109, 123, 164	322