UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

SAVIENNE MARIA FIORENTINI ELERBROCK ZORN

Desenvolvimento do processo de extração de lipídios da
biomassa de microalgas marinhas

Lorena - SP

2017

SAVIENNE MARIA FIORENTINI ELERBROCK ZORN

Desenvolvimento do processo de extração de lipídios da biomassa de microalgas marinhas

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na área de Concentração: Processos Catalíticos e Biocatalíticos.

Orientador: Prof. Dr. Messias Borges Silva.

Edição reimpressa e corrigida

Lorena - SP
Agosto, 2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Zorn, Savienne Maria Fiorentini Elerbrock
Desenvolvimento do processo de extração de lipídios
da biomassa de microalgas marinhas / Savienne Maria
Fiorentini Elerbrock Zorn; orientador Messias Borges
Silva - ed. reimp., corr. - Lorena, 2017.
124 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós
Graduação em Engenharia Química na Área de Processos
Catalíticos e Biocatalíticos) - Escola de Engenharia
de Lorena da Universidade de São Paulo. 2017
Orientador: Messias Borges Silva

1. Extração. 2. Lipídios. 3. Microalgas marinhas.
4. Ácidos graxos essenciais. 5. Taguchi. I. Título.
II. Silva, Messias Borges, orient.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais Sonia e Otto, a meu marido Hans Werner e a meus filhos Gustav, Sophie e Nicolas.

Aos meus amados pais, por tudo que me ensinaram, a meu marido pelo apoio incondicional, a meus filhos pelo carinho e por serem a razão maior da minha existência.

*A todos que amo e que sempre estiveram ao meu lado.
Obrigada!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele nada seria possível.

Aos meus pais, por tudo que deles recebi e com eles aprendi. Exemplos de luta, fé e coragem. À minha querida tia e primeira professora, Icléa, sempre presente e incentivadora. À minha querida irmã Julienne, por tudo.

A meu marido, por sempre me apoiar e ajudar em tudo. A meus três filhos pela paciência, carinho e incentivo.

Ao Prof. Dr. Messias Borges Silva, pelas preciosas orientações, amizade, ensinamentos e apoio ao longo do trabalho e de todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Pereira pelo grande apoio e incentivo, principalmente no ingresso ao mestrado.

Às professoras Dr^{as}. Heizir Ferreira de Castro, Patrícia Caroline Molgero da Rós, Jayne Carlos Barboza, Daniela Helena Pellegrini Guimarães, Larissa de Freitas, pelos ensinamentos, preciosos conselhos e orientações, incentivo durante todo o mestrado. Obrigada por me acolherem e me apoiarem!

Aos amigos e companheiros de jornada do laboratório de engenharia de microalgas, Mateus de Souza Amaral, Guilherme Arantes Pedro, Eduardo Beddra, Victor Marino, Bruno Contesini e Gabriel Blanco, por todo apoio, amizade, companheirismo e ensinamentos. Pelos momentos de descontração e apoio mútuo, que nos uniram e nos fortaleceram na conquista de nossos objetivos!

Às amigas Carla Loures, Ana Paula Rodrigues, Juliana Laiate, Bruna Caroline e Larissa Canilha pelo constante incentivo e orientações, principalmente nas etapas finais deste trabalho.

À secretária do Programa de pós-graduação, Ana Beatriz de Carvalho Lourenço, por toda atenção, carinho e constantes orientações durante todo o mestrado.

Aos membros da banca de qualificação, Prof^a. Dr^a. Jayne Carlos Barboza, Prof^a. Dr^a. Patrícia Caroline Molgero da Rós e Prof. Dr. Messias Borges Silva pelas sugestões propostas para a melhoria deste trabalho.

Aos membros da banca de defesa da dissertação, Prof^a. Dr^a. Jayne Carlos Barboza, Prof^a. Dr^a. Patrícia Caroline Molgero da Rós, Prof. Dr. Ronney Mancebo e Prof. Dr. Messias Borges Silva por integrarem a banca, contribuindo na finalização deste trabalho.

A todos os funcionários do DEQUI e CPG pelo constante apoio. À toda equipe da biblioteca do Campus I, em especial à Regina Horta pelas preciosas orientações e apoio desde o início do mestrado.

À CAPES e à FUSP pelo auxílio financeiro.

A todos que contribuíram para que este trabalho se concretizasse, muito obrigada!

*Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a
eletricidade e a energia atômica: a vontade!*

Albert Einstein

RESUMO

ZORN, S. M. F. E. **Desenvolvimento do processo de extração de lipídios da biomassa de microalgas marinhas.** 2017. 124 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

O presente trabalho avaliou a influência de quatro fatores no processo de extração dos lipídios da biomassa de três microalgas marinhas: *Chlorella minutissima*, *Dunaliella salina* e *Nannochloropsis gaditana*. Estes fatores foram: a umidade da biomassa, a proporção entre os solventes, o volume total de solventes e o tempo de ultrassom, estabelecidos em três diferentes níveis e verificados simultaneamente em diferentes combinações, em um arranjo ortogonal de Taguchi. O objetivo primeiro deste estudo simultâneo foi encontrar o ajuste fornecedor da maior porcentagem de lipídios. Três diferentes níveis de umidade foram investigados na biomassa: 64%, 72% e 80%. A extração de lipídios da biomassa microalgal com elevado teor de umidade permite grande economia de tempo e energia, que seriam consumidos no processo de secagem, caso o processo de extração exigisse somente biomassa seca. Quanto à proporção entre os solventes e ao volume total de solventes, buscou-se encontrar as quantidades ideais de cada um dos solventes empregados: clorofórmio, metanol e água, que contribuem para a *lise* celular e o sequestro mais eficiente dos lipídios. A quarta variável, o tempo de ultrassom, foi verificado por ser um catalisador do processo de *lise* celular. O estudo dessas variáveis visou não somente melhorar a eficácia da extração, mas economizar tempo de processo e energia. O processo compreendeu a hidratação controlada da biomassa, seguido da extração propriamente dita, onde um sistema ternário formou-se com a separação posterior em duas fases distintas, com os lipídios dissolvidos na fase orgânica. Além de determinar a melhor condição de extração, este trabalho verificou o potencial do material lipídico das três espécies à conversão em ésteres de etila, visando a produção de biodiesel e a composição em ácidos graxos, avaliando seu potencial à aplicação nutracêutica, como fonte de ácidos graxos essenciais. A melhor condição de extração resultou de uma biomassa com 64% de umidade, proporção de 5,7 de clorofórmio para 3,0 de metanol e 1,0 de água em um volume total de 33 mL de solventes por grama de biomassa; tempos de ultrassom de 50 ou 70 minutos mostraram-se adequados para obtenção dos maiores teores lipídicos. O material lipídico extraído das três espécies revelou-se promissor como matéria-prima para a produção de biodiesel, com conversões de até 94,5%, via catálise ácida, após um tempo de reação de 5 horas a 80°C e também rico em ácidos graxos essenciais, principalmente os ácidos linoleico e α -linolênico. A composição em ácidos graxos das três espécies foi comparada com outras espécies do mesmo gênero, e diferentes meios de cultivo, mostrando a influência do cultivo sem injeção de dióxido de carbono, que favorece a síntese de ácidos graxos poli-insaturados. O método de Taguchi foi o diferencial por permitir a avaliação conjunta de todas as variáveis, contribuindo para encontrar os melhores ajustes em menor tempo, ressaltando o ineditismo deste trabalho de pesquisa.

Palavras-chave: Extração, Lipídios, Microalgas marinhas, *Chlorella minutissima*, *Dunaliella salina*, *Nannochloropsis gaditana*, Ácidos graxos essenciais, Taguchi.

ABSTRACT

ZORN, S. M. F. E. **Development of the lipid extraction process from marine microalgae biomass.** 2017. 124 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

This work aimed to study four factors that influence in the process of lipids extraction in the biomass from three marine microalgae species: *Chlorella minutissima*, *Dunaliella salina* and *Nannochloropsis gaditana*. These factors were: biomass' moisture, solvents' ratio, solvents' total volume and ultrasonic time, which were set at three different levels and observed simultaneously in a Taguchi orthogonal arrangement. The first objective of this study was to find the simultaneous adjustment provider of higher percentage of lipids. Three different humidity levels were investigated in biomass: 64%, 72% and 80%. The extraction of lipids of microalgal biomass with high moisture content allows great savings of time and energy that would be consumed in the drying process before the extraction if only dry biomass was demanded. Regarding the proportion between solvents and the total volume of solvents, we looked for to find the optimal amounts of each of the employed solvent: chloroform, methanol and water, which contribute to cell lysis and more efficient lipids sequestration. The fourth variable as a catalyst cellular lysis process, ultrasound time was checked. The method comprised controlled hydration of the biomass followed by extraction, where a ternary system formed with subsequent separation into two phases, with lipids dissolved in the organic phase. Besides determining the best extraction condition, this work had as objective verifying the potential of the lipid material to conversion into ethyl esters, aiming at the production of biodiesel and the composition of fatty acids, evaluating its potential for nutraceutical application as a source of essential fatty acids. The best extraction condition employed 64% humidity biomass, ratio of 5,7/3/1 chloroform/methanol/water, 33 mL solvents/gram, ultrasound times of 50 or 70 minutes were adequate to obtain the highest lipid contents. The lipid material extracted from the three species proved promising as raw material for biodiesel production, with conversions up to 94.5%, via acid catalysis, after a reaction time of 5 hours at 80°C and also rich in essential fatty acids, especially linoleic and α -linolenic acids. The fatty acid composition of the three species was compared to other species of the same genus and different culture media, showing the influence of the culture without injection of carbon dioxide, which favors the synthesis of polyunsaturated fatty acids. Taguchi method was the differential for allowing the joint evaluation of all the variables, contributing to find the best adjustments in a shorter time, highlighting the novelty of this research work.

Keywords: Extraction, Lipids, Marine microalgae, *Chlorella minutissima*, *Dunaliella salina*, *Nannochloropsis gaditana*, Essential fatty acids, Taguchi.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1-Microalga <i>Chlorella minutissima</i> vista ao microscópio.	22
Figura 2.2-Macroalga <i>Laminaria sp</i> em ambiente marinho.	23
Figura 2.3-Foto de um modelo de sistema aberto de cultivo (<i>raceway pond</i>).....	26
Figura 2.4-Sistema fechado de cultivo (fotobiorreatores tubulares).....	27
Figura 2.5-Esquema geral da produção e transformação de microalgas através de uma biorrefinaria.	29
Figura 2.6-Estruturas de diferentes tipos de lipídios.	31
Figura 2.7-Biossíntese de triglicerídeos em microalgas	32
Figura 2.8-Microalga <i>Scenedesmus quadricauda</i> com pirenídeos (quatro estruturas centrais circulares) claramente visíveis.....	34
Figura 2.9-Gotículas de lipídios nas células da microalga <i>Isochrysis galbana</i> , assinaladas com setas.....	35
Figura 2.10-Processo de extração por água subcrítica.....	37
Figura 2.11-Vista esquemática do dispositivo de extração de lipídios por diferença de potencial elétrico/ pulso eletromagnético.	38
Figura 2.12-Diagrama de processo de extração de lipídios por diferença de potencial elétrico/ pulso eletromagnético.	38
Figura 2.13-Diagrama de fases P-T para o CO ₂ e a região supercrítica	39
Figura 2.14-Diagrama esquemático do processo de extração de lipídios por fluido supercrítico.....	41
Figura 2.15-Diagrama esquemático das etapas que compõem o processo de extração de lipídios das células microalgais por solventes orgânicos.....	43
Figura 2.16-Etapas do cultivo até a extração de lipídios em laboratório.....	44
Figura 2.17-Extração de lipídios por solventes em escala industrial.....	45
Figura 2.18-Desenho do aparelho Soxhlet e seus componentes.	46
Figura 2.19-Diagrama de fases de Bligh & Dyer.	48
Figura 2.20-Reação de transesterificação.	50
Figura 2.21-Reação de esterificação	50
Figura 2.22-Reação de transesterificação empregando etanol.....	51
Figura 2.23-Microfotografia da microalga <i>Chlorella minutissima</i>	56
Figura 2.24-Microfotografia da microalga <i>Dunaliella salina</i>	57
Figura 2.25-Espécie do gênero <i>Nannochloropsis</i> ao microscópio.	58

Figura 3.1-Fluxograma das fases da pesquisa sobre extração de lipídios.....	62
Figura 3.2-Esquema dos fotobiorreatores utilizados para cultivo.....	65
Figura 3.3-Fotobiorreatores utilizados no cultivo, operando no laboratório de engenharia de microalgas (DEQUI - USP).	65
Figura 3.4-Silo de fundo cônico contendo biomassa floculada.	68
Figura 3.5-À esquerda, sistema montado para filtração da biomassa e à direita, detalhe da biomassa recentemente colhida.....	69
Figura 3.6-À esquerda, biomassa obtida logo após a filtração (úmida) e à direita, aspecto da biomassa após secagem em estufa a 60°C.	69
Figura 3.7-Aspecto da biomassa preparada para as extrações.	70
Figura 3.8-Fluxograma relacionando o trabalho experimental com a etapa em que o arranjo ortogonal L9 de Taguchi é aplicado.....	73
Figura 3.9-Esquema de Erlenmeyers em ultrassom.....	75
Figura 3.10-Filtração da biomassa e separação de fases.....	76
Figura 3.11-À esquerda detalhe das fases em separação e à direita a fase lipídica coletada.	76
Figura 3.12-Aparato utilizado para as reações de transesterificação.	77
Figura 3.13-Funil de separação contendo as fases formadas na etapa de lavagem dos ésteres etílicos: os ésteres localizam-se na fase superior.	78
Figura 3.14-Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear	80
Figura 3.15-Região entre 4,35 e 4,05 ppm dos espectros de RMN ¹ H dos TG, DG, MG e ésteres etílicos.	80
Figura 3.16-Desdobramento dos picos de ressonância, segundo a regra do (n+1).	81
Figura 3.17. Área dos desdobramentos do quarteto gerado pelos átomos de hidrogênio do CH ₂ etoxílico dos ésteres etílicos.....	81
Figura 3.18-Cromatógrafo a Gás Capilar CGC AGILENT 68650 SERIES GC SYSTEM.	83
Figura 4.1-Etapas do trabalho experimental.	84
Figura 4.2-Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a média da variável resposta teor de lipídios totais.	87
Figura 4.3-Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a razão S/N para a variável resposta teor de lipídios totais em %.	89
Figura 4.4-Espectros RMN ¹ H dos ésteres etílicos de <i>Chlorella minutissima</i> (a), <i>Dunaliella salina</i> (b) e <i>Nannochloropsis gaditana</i> (c).	99
Figura 4.5-Principais ácidos graxos e concentrações.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1-Comparação entre algumas fontes de biodiesel em relação ao seu rendimento em óleo e a área ocupada para cultivo.	24
Tabela 2.2-Conteúdo lipídico de algumas espécies de microalgas.....	33
Tabela 2.3-Propriedades físicas de diversos fluidos no SFE.....	40
Tabela 2.4-Relação de ácidos graxos essenciais e famílias a que pertencem.....	55
Tabela 3.1-Reagentes utilizados para a preparação do meio de cultivo.	63
Tabela 3.2-Fatores e níveis utilizados no planejamento experimental	70
Tabela 3.3-Arranjo ortogonal L9 de Taguchi.	72
Tabela 3.4-Volumes de água adicionados para hidratar 1 g de biomassa.	74
Tabela 4.1-Resultados do teor de lipídios totais (%), em triplicata, da biomassa de <i>Chlorella minutissima</i>	85
Tabela 4.2-Comparação dos níveis dos fatores empregados <i>versus</i> apontados pelos gráficos dos efeitos, para os efeitos sobre a extração de lipídios totais.....	90
Tabela 4.3-Análise da Variância para o teor de lipídios totais.	91
Tabela 4.4-Experimentos confirmatórios variando somente o tempo de ultrassom nas extrações lipídicas da biomassa de <i>Chlorella minutissima</i>	92
Tabela 4.5-Resultados de extrações com diferentes umidades de biomassa.	94
Tabela 4.6-Resultados de extrações com diferentes tempos de ultrassom.	96
Tabela 4.7-Conversões em ésteres etílicos obtidos por transesterificação.	100
Tabela 4.8-Composição em ácidos graxos da biomassa das espécies estudadas.....	101
Tabela 4.9-Composição em ácidos graxos de diferentes espécies de <i>Chlorella</i>	104
Tabela 4.10- Comparação da composição em ácidos graxos da espécie <i>Dunaliella salina</i> entre diferentes autores.	107
Tabela 4.11- Comparação entre diferentes espécies do gênero <i>Nannochloropsis</i> quanto à composição em ácidos graxos.....	110
Tabela 4.12-Propriedades preditas para o biodiesel com base na composição em ácidos graxos das três espécies de microalgas marinhas	112

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1. Comparação entre os sistemas de cultivo aberto e fechado.....	28
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	19
1.1	Objetivo geral:	20
1.2	Objetivos específicos:.....	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	Microalgas, seus diversos produtos e aplicações	22
2.2	Sistemas de cultivo	25
2.3	Lipídios e sua classificação	29
2.4	Estrutura celular das microalgas.....	33
2.5	Métodos de extração dos lipídios	36
2.5.1	Extração por água subcrítica	36
2.5.2	Extração por pulso eletromagnético / diferença de potencial elétrico.....	37
2.5.3	Extração por fluido supercrítico	39
2.5.4	Extração por solventes orgânicos	42
2.5.5	Extração com auxílio de ultrassom.....	49
2.6	Lipídios e biodiesel.....	49
2.7	Propriedades do biodiesel.....	51
2.8	Ácidos graxos essenciais à saúde	54
2.9	Espécies de microalgas marinhas estudadas.....	56
2.9.1	<i>Chlorella minutissima</i>	56
2.9.2	<i>Dunaliella salina</i>	56
2.9.3	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	57
2.10	Planejamento de Experimentos e Taguchi	58
2.10.1	Método de Taguchi.....	59
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	62
3.1	Materiais	63
3.1.1	Microalgas marinhas	63
3.1.2	Reagentes.....	63
3.2	Equipamentos	64
3.2.1	Fotobiorreatores tipo coluna de bolhas.....	64
3.2.2	Outros Equipamentos	66
3.3	Procedimentos	66
3.3.1	Preparação dos materiais e equipamentos	66

3.3.2	Inóculos e Repicagem.....	66
3.3.3	Acompanhamento dos cultivos.....	67
3.3.4	Colheita e floculação da biomassa.....	67
3.3.5	Filtração da biomassa	68
3.3.6	Pré-tratamento da biomassa (secagem e trituração)	69
3.3.7	Planejamento experimental.....	70
3.3.8	Método de extração de lipídios.....	73
3.4	Transesterificação do material lipídico.....	77
3.4.1	Processo de síntese de ésteres de etila de ácidos graxos	77
3.5	Análises realizadas.....	79
3.5.1	Quantificação de Ésteres de Etila por Espectrofotometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹ H)	79
3.5.2	Composição em ácidos graxos.....	82
3.5.3	Determinação das propriedades do biodiesel	83
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	84
4.1	<i>Chlorella minutissima</i> - Resultados de extrações de acordo com planejamento experimental completo (L9 - Taguchi)	85
4.1.1	Resultados do arranjo ortogonal completo	85
4.1.2	Efeito dos fatores sobre a média da variável resposta teor de lipídios totais (%).	87
4.1.3	Efeito dos fatores sobre a Razão Sinal Ruído (S/N) da variável resposta teor de lipídios totais (%)	88
4.1.4	Confirmação da influência dos fatores pela ANOVA (Análise de Variância) ..	90
4.1.5	Extrações confirmatórias para o fator tempo de ultrassom	91
4.1.6	Influência do volume total e da proporção entre os solventes.....	92
4.1.7	Influência da umidade da biomassa.....	93
4.1.8	Influência do tempo de ultrassom.....	96
4.2	Conversão dos lipídios em ésteres de etila	98
4.3	Composição em ácidos graxos das três espécies de microalgas.....	100
4.4	Comparação dos perfis de ácidos graxos – outras espécies/meios de cultivo ..	103
4.5	Composição em ácidos graxos e biodiesel	111
4.6	Microalgas como fonte de ácidos graxos essenciais.....	114
5	CONCLUSÕES	115
	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	116

REFERÊNCIAS 117

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Fontes de energia de origem fóssil são altamente poluidoras e não renováveis. Tais fontes como carvão mineral, petróleo e seus derivados tem sido exploradas há séculos pela humanidade, para prover o desenvolvimento tecnológico e industrial que se conhece. Esses combustíveis são diretamente ligados ao aumento dos gases poluentes na atmosfera terrestre, que causam o aquecimento global e outros desequilíbrios climáticos (CHEAH et al., 2015). A partir da década de 1990, há, no entanto, uma crescente consciência mundial para diminuir o uso de fontes poluidoras e não renováveis, substituindo-as por energia limpa e renovável.

Nesse cenário surgem as microalgas, fonte promissora de energia renovável, capazes de fornecer diversos produtos e substâncias importantes em diferentes campos tecnológicos e aplicações. No ramo energético, por exemplo, fornecem matéria-prima para gerar biocombustível, como biodiesel, bio-óleo, biogás (metano e hidrogênio) e bioetanol.

De acordo com Liu; Song; Qiu (2017), apresentam-se vantajosas, não somente pelo fato de não concorrerem com fontes de alimento, como a soja ou milho, mas por possuírem elevado rendimento por hectare, ao converterem 3 a 8% da energia solar disponível em biomassa, enquanto as culturas terrestres rendem em média 0,5%. A alta produtividade, combinada com a não concorrência com culturas alimentares e o potencial de utilização do CO₂ industrial como combustível de crescimento, tornam as microalgas uma fonte alternativa promissora de biodiesel e outras substâncias relevantes.

Dentre as diversas substâncias de interesse, destacam-se os lipídios. Lipídios algais são compostos por glicerol ou bases esterificadas de ácidos graxos saturados ou insaturados (NEOFOTIS et al., 2016).

Dentre todos os ácidos graxos encontrados nas microalgas, alguns das famílias ômega 3 e ômega 6 são de particular interesse (FERREIRA et al., 2013; MESKO; JACOB-LOPES, 2013). No grupo dos lipídios, encontram-se os lipídios neutros como triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos livres e lipídios polares, como os fosfolipídios entre outros (KWIETNIEWSKA et al., 2012).

Dentre as muitas espécies conhecidas, as microalgas marinhas são de especial interesse para a obtenção de lipídios a partir de sua biomassa, visto que, adaptam-se com facilidade em condições similares ao ambiente marinho e, sob condições adequadas de cultivo, reproduzem-se com facilidade e rapidez, produzindo conteúdos significativos de

lipídios, inclusive podem ser cultivadas em águas residuais de estações de tratamento (HE et al., 2016; YANG et al., 2016).

A utilização de um método que seja confiável para uma extração adequada e reprodutível, de baixo custo, e em condições seguras, não agressivas ao meio ambiente, objetivando a produção de lipídios em ampla escala, é de extrema importância, pois este processo fornecerá a matéria prima básica de interesse para outros produtos: os lipídios (DU et al., 2015), seja para sua posterior conversão em biodiesel ou para a obtenção de outras substâncias de valor agregado, como os ácidos graxos essenciais, dentre eles os ômega 3 e 6.

Diversos estudos demonstram que a utilização de algumas técnicas de pré-tratamento atuam como coadjuvantes no processo de extração, potencializando-o. Uma dessas técnicas é a utilização do ultrassom, que pode elevar em mais de 50% o teor de lipídios extraídos da biomassa (GAROMA; JANDA, 2016; SANTOS et al., 2014).

Dentro deste contexto, neste trabalho propõe-se estudar fatores que podem auxiliar na extração de lipídios da biomassa, com os seguintes objetivos:

1.1 Objetivo geral:

- Extrair os lipídios da biomassa das microalgas marinhas *Chlorella minutissima*, *Nannochloropsis gaditana* e *Dunaliella salina* via solventes, verificando simultaneamente a influência da umidade da biomassa, da proporção dos solventes, da quantidade total de solventes empregados e do tempo de ultrassom, visando o maior rendimento em lipídios com o menor consumo de solventes.

1.2 Objetivos específicos:

- Estabelecer a melhor ou melhores condições operacionais para o processo de extração;
- Propor os melhores ajustes, dentro dos parâmetros estudados, que resultem no maior rendimento em lipídios;
- Comparar o rendimento em lipídios extraídos da biomassa úmida das microalgas *Chlorella minutissima*, *Dunaliella salina* e *Nannochloropsis gaditana*;
- Realizar a transesterificação dos lipídios extraídos, verificando seu potencial para a produção de ésteres etílicos.

- Caracterizar os lipídios extraídos, através da composição em ácidos graxos, avaliando seu potencial para a produção de biodiesel, bem como, para finalidade nutricional ou farmacêutica (ácidos graxos essenciais).

Para a eficácia na condução do estudo simultâneo destas quatro variáveis em três diferentes níveis, bem como, a análise e proposição dos melhores ajustes, foi utilizada como ferramenta estatística o arranjo ortogonal L9 de Taguchi.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Microalgas, seus diversos produtos e aplicações

Algas são organismos muito diversos, presentes nos ambientes aquáticos e nos mais diversos ambientes onde há umidade, sendo o termo “alga” completamente desprovido de valor taxonômico, visto que designa organismos muito distintos entre si quanto à sua origem, composição química e morfologia. De acordo com Lourenço (2006), estes seres podem ser unicelulares ou multicelulares, com hábitos planctônicos ou bentônicos, daí os termos empregados: microalgas (algas com dimensões microscópicas) e macroalgas (algas com dimensões macroscópicas), conforme ilustrado nas figuras 2.1 e 2.2 (KWIETNIEWSKA et al., 2012).

Figura 2.1-Microalga *Chlorella minutissima* vista ao microscópio.

Fonte: (KWIETNIEWSKA et al; 2012)

Figura 2.2-Macroalga *Laminaria sp* em ambiente marinho.

Fonte: (KWIETNIEWSKA et al; 2012)

De acordo com diversos autores, algas são os mais simples organismos autotróficos difundidos na Terra. Seu número é ainda indeterminado, mas estima-se em até 10 milhões de espécies de algas e microalgas, a maioria das quais são provavelmente microalgas, isto é, algas unicelulares (KWIETNIEWSKA et al., 2012). Além disso, sua diversidade é imensa, formando um grupo polifético de espécies autotróficas eucarióticas. Conforme Neofotis et al. (2016), pode-se chegar até um milhão de espécies somente de microalgas, sendo que atualmente cerca de quarenta e quatro mil espécies já são conhecidas.

Assim como as plantas verdes, todas as espécies de algas caracterizam-se por realizar o processo de fotossíntese, bem como, são capazes de armazenar substâncias como as estocadas pelas plantas superiores, contudo, não produzem tecidos especializados ou órgãos tais como folhas e raízes, e seu sistema de reprodução é totalmente diferente do das plantas (KWIETNIEWSKA et al., 2012).

Alguns autores definem microalgas como organismos fotossintéticos unicelulares ou coloniais que estão naturalmente presentes nos diversos ambientes aquáticos e úmidos, incluindo rios, lagos, oceanos e solos. Relatam a importância das microalgas como fonte renovável de matéria prima, para a produção de uma ampla gama de bioprodutos, tais como os biocombustíveis, cosméticos, alimentos para animais e suplementos alimentares (BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2016).

Com referência à biomassa de algas, algumas vantagens consideráveis sobre as demais matérias primas tradicionais (as oleaginosas) são: alta produtividade: normalmente

10-100 vezes maior do que as culturas terrestres, captura altamente eficiente de dióxido de carbono, elevado teor de lipídios ou de amido, que podem ser usados na produção de biodiesel ou bioetanol, respectivamente (NEOFOTIS et al., 2016).

Sua contribuição para a redução do dióxido de carbono na atmosfera é muito importante, visto que, para cada tonelada de biomassa microalgal gerada, são consumidas 1,83 toneladas de dióxido de carbono atmosférico (PATIL; HONAGUNTIKAR; 2014 , CHEAH et al., 2014).

Comparando a cultura de microalgas com diferentes culturas de plantas oleaginosas, estas apresentam-se como uma excelente alternativa para a produção de biodiesel em larga escala, conforme ilustra a Tabela 2.1 (CHISTI, 2007):

Tabela 2.1-Comparação entre algumas fontes de biodiesel em relação ao seu rendimento em óleo e a área ocupada para cultivo.

Cultivos	Rendimento em óleo (L/ha)	Área de terra necessária (M ha) ^a	Porcentagem área de cultivo ^a
Milho	172	1540	846
Soja	446	594	326
Canola	1190	223	122
Jatropha	1892	140	77
Côco	2689	99	54
Óleo de palma	5950	45	24
Microalga ^b	136.900	2	1,1
Microalga ^c	58.700	4,5	2,5

^a Para atender a 50% de todas as necessidades de combustível de transporte dos Estados Unidos.

^b 70% óleo (em peso) na biomassa.

^c 30% óleo (em peso) na biomassa.

Fonte: (CHISTI, 2007)

Ainda de acordo com Chisti (2007), conforme observado na Tabela 2.1, utilizando o rendimento médio de óleo por hectare de várias culturas, a área de cultivo necessária para atender 50% das necessidades de combustível de transporte dos Estados Unidos é calculada na coluna 3 e na coluna 4; esta área é expressa como uma porcentagem do total da área de cultivo existente nos Estados Unidos. Observando-se nesta tabela o óleo de palma, que é uma cultura oleaginosa de alto rendimento em óleo, verifica-se que 24% do total de área cultivada deverá ser dedicada ao seu cultivo, para atender apenas a 50% das

necessidades da demanda de combustível. Isto evidencia que culturas oleaginosas não podem contribuir de forma significativa na substituição de derivados de petróleo em combustíveis líquidos. Contudo, este cenário muda drasticamente, quando as microalgas são usadas para gerar biodiesel, pois somente 1 a 3% da superfície total para cultivo nos Estados Unidos é suficiente para a produção de biomassa de microalgas, para satisfazer a 50% das necessidades de transporte.

Alguns pesquisadores destacam a importância das microalgas como novas fontes de metabólitos para várias aplicações nos campos: industrial, nutricional, farmacêutico e medicinal (vacinas). Algumas espécies produzem ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa de alto valor (PUFAs), tais como o ácido docosahexaenóico (DHA – C22:6) e o ácido eicosapentaenóico (EPA – C20:5), ambos pertencentes à família dos ácidos graxos ômega 3 (ω -3). Muitas microalgas são ricas em compostos bioativos e pigmentos, incluindo clorofilas, carotenoides, terpenos e ficolibinas, além de antioxidantes e redutores de colesterol (denominados compostos bioativos naturais), os quais podem ser empregados especialmente no desenvolvimento de alimentos funcionais (CARDOSO et al., 2011; FERREIRA et al., 2013). No campo energético, além do biodiesel, fornecem diferentes tipos de biocombustíveis, como metano, hidrogênio, bio-óleo e bioetanol (CARDOSO et al., 2011; KWIETNIEWSKA et al., 2012).

A biossíntese de diversos produtos de alto valor metabólico pode ser alcançada pela engenharia de transcrição (TE), que pretende modificar vários componentes simultaneamente, conforme as pesquisas de Bajhaiya, Ziehe Moreira e Pittman (2016). Portanto, além de serem fontes geradoras de biodiesel, verifica-se que diversas substâncias de alto valor agregado são produzidas por microalgas (CHISTI, 2007; FERREIRA et al., 2013).

2.2 Sistemas de cultivo

As microalgas podem ser cultivadas em áreas abertas ou fechadas, com luz artificial ou natural, em água salgada ou doce, águas salobras ou residuais, não dependendo das condições climáticas para seu crescimento, inclusive, utilizando terreno de terras não aráveis. Adaptam-se a diferentes condições de cultivo, reproduzindo-se e crescendo rapidamente, gerando biomassa cuja colheita pode ser realizada em ciclos semanais, ao longo

de todo o ano, o que é um tempo expressivamente menor comparado ao das plantações de grãos.

Os sistemas abertos podem ser lagoas naturais ou artificiais (*open ponds*), ou fechados, tais como os fotobiorreatores, onde é possível controlar todos os parâmetros necessários para o crescimento rápido da biomassa de algas (iluminação, incluindo fotoperíodo, temperatura, meio reacional com nutrientes, injeção ou não de CO₂, agitação) (FERREIRA et al., 2013; KWIETNIEWSKA et al., 2012; LOURENÇO, 2006). Os sistemas abertos apresentam a vantagem de utilizarem a luz solar, podendo expandir-se por grandes áreas. As vantagens e desvantagens da utilização de cada tipo de sistema devem ser previamente avaliadas antes de sua implantação, visando o tipo de microalga a ser cultivado e quais produtos deseja-se obter a partir de sua biomassa. As figuras 2.3 e 2.4 ilustram alguns modelos de sistemas de cultivo.

Figura 2.3-Foto de um modelo de sistema aberto de cultivo (*raceway pond*)

Fonte: (KWIETNIEWSKA et al., 2012)

Figura 2.4-Sistema fechado de cultivo (fotobiorreatores tubulares).

Fonte: Próprio autor.

Os fotobiorreatores tubulares tipo coluna de bolhas, conforme ilustra a Figura 2.4, foram construídos para o cultivo de microalgas, e estão instalados no laboratório de engenharia de microalgas do DEQUI, EEL-USP. Sua estrutura de acrílico, sistema de aeração e dimensões foram projetados por Loures (2016).

As primeiras tentativas de produção de algas em *open ponds* foram realizadas na Alemanha, durante a Segunda Guerra Mundial, para consumo como um complemento nutricional, conforme relatado por Kwietniewska et al. (2012).

O Quadro 2.1 demonstra as principais diferenças entre os dispositivos de cultura abertos e fechados (KWIETNIEWSKA et al., 2012).

Quadro 2.1-Comparação entre os sistemas de cultivo aberto e fechado.

Parâmetro de comparação	Sistema aberto	Sistema fechado
	Lagoa de cultivo	Fotobiorreator
Área ocupada	Grande	Pequena
Perda de água	Muito alta, com possível precipitação de sais	Baixa
Perda de CO ₂	Alta, depende da profundidade da lagoa	Baixa
Concentração de Oxigênio	Usualmente baixa, devido à contínua evaporação	Acúmulo de O ₂ no sistema fechado exige dispositivo específico
Temperatura	Altamente variável	Resfriamento usualmente necessário
Stress sobre as células	Usualmente baixo (agitação leve)	Usualmente alto (compressão de ar, agitação)
Limpeza	Muito simples	Maior exigência de limpeza das paredes
Risco de contaminação	Alto (por outras espécies)	Baixo
Qualidade da biomassa	Variável	Reprodutível
Concentração de biomassa	Baixa, entre 0,1 a 0,5 g/L	Alta, entre 0,5 a 8 g/L
Controle de processo e reprodutibilidade	Limitado	Possível sob condições adequadas
Dependência das condições climáticas	Alta (intensidade de luz, temperatura, precipitações)	Média (iluminação, pode requerer refrigeração)

Fonte: (KWIETNIEWSKA et al., 2012).

Os sistemas de cultivo podem ser em batelada ou contínuos. O rápido crescimento das microalgas, bem como a facilidade de cultivo e adaptabilidade de diversas espécies reforçam seu potencial em formar uma cadeia contínua de produção de biocombustíveis em biorrefinarias, tal como ocorre em refinarias de petróleo tradicionais (BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2016; KOLLER; MUHR; BRAUNEGG, 2014; MILANO et al., 2016).

De acordo com Bravo-Fritz et al.(2016); Ferreira et al.(2013) existem vários cenários promissores, onde diversos produtos podem ser extraídos da biomassa de microalgas, em uma biorrefinaria, o que pode tornar a produção em larga escala viável. Um possível cenário proposto por Bravo-Fritz et al. (2016) é ilustrado na Figura 2.5.

Figura 2.5-Esquema geral da produção e transformação de microalgas através de uma biorrefinaria.

Fonte: (BRAVO-FRITZ et al., 2016).

2.3 Lipídios e sua classificação

A biomassa microalgal constitui-se principalmente de: proteínas, carboidratos e lipídios (KWIETNIEWSKA et al., 2012; SALAM; VELASQUEZ-ORTA; HARVEY, 2016).

Os lipídios podem ser definidos como qualquer molécula biológica solúvel num solvente orgânico (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012; MUBARAK; SHAIJA; SUCHITHRA, 2015; SALAM; VELASQUEZ-ORTA; HARVEY, 2016).

De acordo com Salam, Velasquez-Orta e Harvey (2016), os lipídios classificam-se amplamente entre lipídios neutros e polares e os lipídios neutros estão localizados dentro das células, na forma de triglicerídeos, mono – e diglicerídeos e ácidos graxos livres.

Os ácidos graxos, que são os principais constituintes tanto de moléculas de lipídios neutros como polares, podem ser saturados ou insaturados. Ácidos graxos saturados não têm duplas ligações, enquanto que os ácidos graxos insaturados consistem em, pelo menos, uma dupla ligação. O teor de lipídios de microalgas varia consideravelmente para as diferentes espécies. A composição e perfil dos ácidos graxos

extraídos de uma espécie particular são influenciados pelo sistema de cultivo, conforme mencionado anteriormente. Além disso, outras condições influenciam, tais como: composição do meio, temperatura, intensidade da iluminação, razão de ciclo de luz / escuridão e taxa de aeração (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012; D’ALESSANDRO; ANTONIOSI FILHO, 2016; SALAM; VELASQUEZ-ORTA; HARVEY, 2016).

Uma molécula de ácido graxo consiste de um grupo carboxila hidrofílico ligado à extremidade de uma cadeia de hidrocarboneto hidrofóbica, conforme mostrado na Figura 2.6 (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012). Os ácidos graxos são componentes das moléculas lipídicas (tanto as neutras como as polares) e distinguem-se com base em suas duas características mais importantes: o número total de átomos de carbono na cadeia de hidrocarboneto e o número de duplas ligações nesta cadeia. Quando a extremidade de carboxila da molécula de ácido graxo é ligada a um grupo principal não carregado (por exemplo, glicerol), uma molécula de lipídio neutro é formada (por exemplo, triglicerídeo). Por outro lado, a associação de uma molécula de ácido graxo a um grupo principal carregado (por exemplo, glicerol e complexo fosfato) forma uma molécula de lipídio polar (por exemplo, fosfolipídio) (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012; MUBARAK; SHAIJA; SUCHITHRA, 2015).

Desta forma, a maioria dos lipídios contém ácidos graxos que se classificam de forma geral em duas categorias, com base na polaridade do grupo molecular principal: (1) lipídios neutros, que compreendem acilgliceróis e ácidos graxos livres e (2) lipídios polares, que podem ainda ser sub categorizados em fosfolipídios e glicolipídios. Lipídios neutros são usados principalmente nas células de microalgas para armazenamento de energia, ao passo que os lipídios polares acumulam-se em paralelo para formar membranas celulares de duas camadas (SALAM; VELASQUEZ-ORTA; HARVEY, 2016).

Acilgliceróis consistem de ácidos graxos de ésteres ligados a uma estrutura de glicerol e são classificados de acordo com seu número de ácidos graxos: triacilgliceróis ou triglicerídeos (TAG), diacilgliceróis ou diglicerídeos (DAG), monoacilgliceróis ou monoglicerídeos (MAG). O ácido graxo livre é um ácido graxo ligado a um átomo de hidrogênio (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

Na figura 2.6, em **a** observam-se as cadeias de ácidos graxos, tem-se à esquerda um ácido graxo saturado, ácido esteárico (C18:0) e à direita, o ácido graxo insaturado, ácido oleico (C18:1) e em **b**, moléculas de lipídios: triacilglicerol (lipídio neutro) no lado esquerdo e fosfolipídio (lipídio polar) do lado direito. As letras R', R'', R''' na molécula de

triacilglicerol representam cadeias de ácidos graxos. A molécula de fosfolipídio é carregada negativamente (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

Figura 2.6-Estruturas de diferentes tipos de lipídios.

Fonte: (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

As microalgas sintetizam os ácidos graxos a partir de fontes de carbono, como o CO_2 , por meio da fotossíntese, e também o fazem a partir de fontes de carbono orgânicos (glicose, acetato, etc.). É importante observar que a composição e a quantidade dos diferentes lipídios sintetizados pelas células microbiais dependem da espécie de microalga e das condições autotrófica, mixotrófica ou heterotrófica de cultivo (MESKO; JACOB-LOPES, 2013). A diferença entre essas modalidades está na fonte fornecedora de carbono e de energia. No cultivo autotrófico, ou fotoautotrófico, as células obtêm a energia proveniente da luz e o carbono do CO_2 do ar ou diretamente injetado na água, produzindo suas biomoléculas pela reação de fotossíntese; no cultivo heterotrófico, as microalgas utilizam-se de compostos orgânicos como fonte de energia e de carbono e, no cultivo mixotrófico usam: luz, compostos orgânicos e inorgânicos como fonte de energia e CO_2 , e compostos orgânicos como fonte de carbono (FRANCO et al., 2013).

Conforme demonstrado por Huang et al. (2010), a síntese de ácidos graxos pode ser dividida em três etapas principais: síntese de acetil coenzima A (acetil CoA) no

citoplasma; síntese de ácido graxo saturado com 16-18 carbonos e posterior dessaturação e alongação da cadeia de carbonos e, síntese dos acil gliceróis (triglicerídeos).

As microalgas, assim como outros organismos, sintetizam e armazenam acilgliceróis como fonte de energia e carbonos. Geralmente, a síntese se dá a partir do L- α -fosfoglicerol, oriundo da via glicolítica, e acil CoA. A transferência de resíduos de acilas se dá a partir da acil CoA transferase que forma o ácido lisofosfatídico que, através da L-acilglicerol-3-fosfato-aciltransferase, transfere outra acila formando o ácido L- α -fosfatídico. Este composto é a origem dos fosfolipídios ou depois da ação de uma fosfatase e incorporação do terceiro resíduo de acila, através da diacilglicerol aciltransferase, se transforma em triacilglicerol. As reações desta biossíntese a nível celular são demonstradas na Figura 2.7 (HUANG et al., 2010).

Figura 2.7-Biossíntese de triglicerídeos em microalgas

Fonte: (HUANG et al. 2010).

Sob condições ótimas de cultivo, as microalgas multiplicam-se rapidamente, porém não acumulam tanto substâncias de armazenamento, tais como carboidratos e lipídios. Por outro lado, sob condições ambientais desfavoráveis, ou seja, sob *stress*, causado pela deficiência de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, ocorre o

acúmulo de tais substâncias (KWIETNIEWSKA et al., 2012; MESKO; JACOB-LOPES, 2012). O teor de lipídios de microalgas varia consideravelmente de uma espécie para outra e podem variar, em termos de biomassa seca, de 5 a 77 % ou mais (CHISTI, 2007; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Níveis lipídicos de 20 a 50% são bastante comuns, conforme demonstrado na Tabela 2.2.

Tabela 2.2-Conteúdo lipídico de algumas espécies de microalgas.

Microalgas marinhas e de água doce	Conteúdo em Lipídios (% biomassa peso seco)
<i>Botryococcus braunii</i>	25,0 - 75,0
<i>Chlorella emersonii</i>	25,0 - 63,0
<i>Chlorella protothecoides</i>	14,6 - 57,8
<i>Chlorella vulgaris</i>	5,0 - 58,0
<i>Chlorella minutissima</i>	10,0 - 57,0
<i>Chlorococcum sp.</i>	19,3 - 53,7
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20,0 - 51,1
<i>Dunaliella salina</i>	6,0 - 25,0
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16,7 - 71,0
<i>Dunaliella sp.</i>	17,5 - 67,0
<i>Euglena gracilis</i>	14,0 - 20,0
<i>Isochrysis galbana</i>	7,0 - 40,0
<i>Monallanthus salina</i>	20,0 - 22,0
<i>Nannochloris sp</i>	20,0 - 56,0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	22,7 - 29,7
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	12,3 - 20,5
<i>Neochloris oleoabundans</i>	29,0 - 65,0
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18,0 - 57,0
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1,9 - 18,4

Fonte: (CHISTI, 2007; GOUVEIA & OLIVEIRA, 2009; KANEMOTO, 2012).

2.4 Estrutura celular das microalgas

De acordo com Salam, Velasquez-Orta e Harvey (2016), cerca de 10% da biomassa microalgal constitui-se do material da parede celular das microalgas, e a

composição desta parede celular, bem como a estrutura celular como um todo varia grandemente de espécie para espécie.

A estrutura celular básica das microalgas eucarióticas é usualmente similar à estrutura celular de células típicas de plantas ou às células de cianobactérias. O tamanho de uma célula varia na faixa de 5-50 μm e na sua superfície a carga é negativa. Para realizar o processo de fotossíntese, as microalgas verdes possuem organelas especiais, chamadas cloroplastos.

Os cloroplastos são organelas semiautônomas, que dividem-se independentemente da divisão celular. São separados do citoplasma por duas a quatro membranas e o número de cloroplastos, seu tamanho e formato podem variar, de acordo com a espécie (KWIETNIEWSKA et al., 2012).

Em quase todos os grupos de algas, o cloroplasto contém um pirenoide. É uma estrutura proteica contendo a enzima RuBisCO, responsável pela fixação do dióxido de carbono durante o processo de fotossíntese (LOURENÇO, 2006).

O pirenoide pode acumular em volta dele mesmo os materiais de armazenamento, incluindo as gotas de óleo, conforme mostra a Figura 2.8.

Figura 2.8-Microalga *Scenedesmus quadricauda* com pirenoides (quatro estruturas centrais circulares) claramente visíveis.

Fonte: (KWIETNIEWSKA et al., 2012).

As gotas de óleo frequentemente situam-se próximas às mitocôndrias, de acordo com alguns autores. A habilidade de acumular lipídios sob condições desfavoráveis de

crescimento (*stress*) relaciona-se quase que exclusivamente às microalgas, conforme ilustrado na Figura 2.9 (KWIETNIEWSKA et al., 2012).

Figura 2.9-Gotículas de lipídios nas células da microalga *Isochrysis galbana*, assinaladas com setas.

Fonte: (KWIETNIEWSKA et al., 2012).

As microalgas possuem também vários tipos de estruturas externas, as paredes celulares, cuja função é proteger as células contra danos físicos, mecânicos ou químicos, como por exemplo, doenças, predadores ou seca.

A parede celular típica aparece nas espécies eucarióticas, sendo uma estrutura rígida que envolve o protoplasto. Nas células de algas azul esverdeadas, esta parede é do tipo Gram negativo, construída de peptidoglicano ou de ácido murâmico e adicionalmente, coberto por uma camada de mucilagem (KWIETNIEWSKA et al., 2012; SALAM; VELASQUEZ-ORTA; HARVEY, 2016).

A espessura da parede celular na maioria das vezes na faixa de 1-10 nm, mas em certas espécies do gênero *Oscillatoria* pode ser ainda de 200 nm. A parede celular de eucariontes situa-se sempre no lado de fora da membrana celular e é comparável com a parede celular das células das plantas. Basicamente é construída de dois componentes - um componente fibrilar, formando o andaime/armação da parede, e um componente amorfo que forma o enchimento entre as fibras. O componente fibrilar é na maioria das vezes celulose, embora possa ser substituído com manano, quitina ou xilano (KWIETNIEWSKA et al., 2012; ECKELBERRY et al., 2015).

Os diferentes processos de extração existentes objetivam romper a parede celular, para a posterior extração propriamente dita dos lipídios. Este processo de quebra ou rompimento da parede celular é denominado comumente de *lyse*.

2.5 Métodos de extração dos lipídios

Há diversos métodos de extração que podem ser empregados para obtenção de lipídios: com água subcrítica, por pulso eletromagnético/ diferença de potencial elétrico, por fluido supercrítico e extração via solventes orgânicos, que pode ser assistida por ultrassom ou por micro-ondas. Cada um desses métodos pode apresentar vantagens e bons resultados, como também desvantagens, pois alguns requerem alto investimento em equipamentos e em manutenção, demandando elevado consumo de energia (DU et al., 2015, REDDY et al., 2014).

No processamento de microalgas para a obtenção de lipídios, a extração ocorre após as seguintes etapas: a) Cultivo (crescimento das microalgas em meio de cultivo apropriado), b) Colheita da biomassa microalgal, passando pelas seguintes operações: decantação / floculação ou centrifugação, c) Filtração, para obtenção do concentrado, biomassa contendo ainda elevado teor de umidade; d) Pré-tratamento da biomassa, que pode ser por completa secagem / desidratação da biomassa em temperatura ambiente, ou em estufas, ou por liofilização, seguida de moagem/ trituração (redução do tamanho das partículas). Os lipídios podem ser extraídos da biomassa ainda úmida, o que representa significativa economia de tempo de processo e energia (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

2.5.1 Extração por água subcrítica

A extração via água subcrítica (SCW) ou liquefação hidrotermal (HTL) consiste na conversão da biomassa por HTL a uma temperatura entre 200 a 370 °C e pressão elevada (REDDY et al., 2014). As características do extrato bruto produzido durante este processo variam com a temperatura e pressão empregadas.

A solubilidade da matéria orgânica começa a aumentar rapidamente por volta de 200 °C e esta solubilidade melhorada para os compostos orgânicos é fornecida por um meio de fase única e homogênea, para a síntese orgânica na água subcrítica. A redução da constante dielétrica da água a torna um solvente adequado para compostos orgânicos em

pequena quantidade. Este método foi empregado durante a extração de manitol a partir de folhas de oliveira e óleos essenciais a partir de sementes de coentro. O esquema do processo de extração por água subcrítica é demonstrado na Figura 2.10 (REDDY et al., 2014).

Figura 2.10-Processo de extração por água subcrítica.

Fonte: (REDDY et al., 2014).

A água é identificada como uma forma ambientalmente benigna, não tóxica, com capacidades de extração ou reação seletiva e é um solvente verde prontamente disponível. Apesar de não utilizar solventes orgânicos para a extração e permitir o trabalho com biomassa úmida, este método requer elevados investimentos em instalações e o consumo de energia para a manutenção da água aquecida a pressões elevadas.

2.5.2 Extração por pulso eletromagnético / diferença de potencial elétrico

Um dispositivo de extração de lipídios, constituído por um anodo e um catodo formando um canal e definindo um caminho de escoamento para a passagem da biomassa microalgal diluída em água, foi patenteado (ORIGINOIL, 2015). Neste dispositivo, uma força eletromotriz é aplicada através do canal, durante a passagem da biomassa, o que quebra as paredes das células (*lyse*), liberando ao menos 80% de lipídios não polares e no máximo 20% de lipídios polares nelas contidos, constituindo-se um método bastante seletivo. Na figura 2.11 tem-se uma vista esquemática do dispositivo de extração dos lipídios e na figura 2.12 o diagrama de processo ilustrando a extração de lipídios, que,

devido à diferença de potencial elétrico, gera pulsos eletromagnéticos. Esta nova tecnologia parece ser promissora e deve ser melhor estudada para sua utilização seja em escala laboratorial ou em produção, devido ao grande detalhamento técnico exigido para sua construção e instalação.

Figura 2.11-Vista esquemática do dispositivo de extração de lipídios por diferença de potencial elétrico/ pulso eletromagnético.

Fonte: (ORIGINOIL, 2015).

Figura 2.12-Diagrama de processo de extração de lipídios por diferença de potencial elétrico/ pulso eletromagnético.

Fonte: (ORIGINOIL, 2015).

2.5.3 Extração por fluido supercrítico

O método de extração por fluido supercrítico (SFE) (também conhecido por tecnologia supercrítica) consiste em elevar a pressão e temperatura de um fluido acima de seus valores críticos (T_c e P_c) até que este fluido entre em uma região chamada supercrítica, conforme mostrado para o CO_2 na Figura 2.13 (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012; LI et al., 2014; MUBARAK; SHAIJA; SUCHITHRA, 2015).

Figura 2.13-Diagrama de fases P-T para o CO_2 e a região supercrítica

Fonte: (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

O SFE apresenta propriedades físicas diferentes do estado líquido e gasoso, quando elevado ao seu ponto crítico, o que permite uma rápida penetração deste fluido através da matriz celular, resultando em um rendimento mais elevado de lipídios totais e um tempo menor de extração. Além do CO_2 , diversos fluidos podem ser utilizados nas extrações por fluido supercrítico, conforme mostrado na Tabela 2.3 (SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016).

Tabela 2.3-Propriedades físicas de diversos fluidos no SFE.

Solventes	Propriedades Críticas	
	Temperatura (°C)	Pressão (atm)
Dióxido de Carbono	31,2	72,9
Etano	32,4	48,2
Eteno	10,1	50,5
Metanol	-34,4	79,9
Óxido Nitroso	36,7	71,7
n-Pentano	-76,5	33,3
Água	101,1	217,6

Fonte: (SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016).

A uma pressão de 72,9 atm e temperatura de 31,2 °C, o CO₂ atinge seu estado crítico, capaz de extrair lipídios da biomassa microalgal (SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016; LI et al., 2014). Durante o processo de extração, uma mistura de biomassa microalgal e terra de diatomáceas permanece armazenada firmemente dentro de um vaso cilíndrico de extração. O dióxido de carbono supercrítico desloca-se sobre a superfície dessa mistura e os lipídios são dessorvidos, formando-se por dissolução um complexo dióxido de carbono supercrítico-lipídios (SCCO₂-lipídios). A etapa seguinte consiste na separação dos lipídios do fluido supercrítico, por despressurização, de tal forma que o SCCO₂ juntamente com alguma água residual, retorna ao seu estado gasoso e os lipídios brutos extraídos precipitam-se em um recipiente coletor. Na Figura 2.14 pode-se observar o processo de extração de lipídios por fluido supercrítico de uma biomassa microalgal.

Figura 2.14-Diagrama esquemático do processo de extração de lipídios por fluido supercrítico.

Fonte: (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

Este processo é uma tecnologia nova e considerada ambientalmente correta por permitir a sintonização da força do solvente, neste caso, o dióxido de carbono, e também porque os lipídios brutos extraídos da biomassa encontram-se isentos de solventes, economizando a etapa de remoção do próprio solvente. Por outro lado, devido à sua natureza não polar, SCCO₂ é incapaz de interagir com os lipídios neutros ou lipídios que formam complexos com lipídios polares, sendo necessária a adição de um modificador polar, como um co-solvente para aumentar a afinidade do fluido com os lipídios polares e lipídios complexos.

A extração de lipídios e carotenoides da microalga marinha *Nannochloropsis oculata* é relatada por diversos autores (SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016; MCKENNEDY et al., 2016), que mostraram que a modificação contínua de dióxido de carbono com etanol como co-solvente foi altamente importante, para atingir uma elevada eficiência de extração de tais compostos.

Contudo, há que se considerar os requisitos em segurança e elevados investimentos nas instalações, principalmente no reator de extração e o alto consumo de energia para a compressão do fluido e seu aquecimento (MUBARAK; SHAIJA; SUCHITHRA, 2015).

2.5.4 Extração por solventes orgânicos

Quanto à extração por solventes orgânicos, primeiramente é importante compreender como ocorre esse processo a nível celular.

De acordo com diversos autores, a extração por solventes orgânicos compreende cinco etapas em sequência (SANTOS et al., 2015; HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012; PRAGYA; PANDEY; SAHOO, 2013):

Etapas 1: O solvente não polar, como clorofórmio ou hexano, em contato com uma célula microalgal, penetra através da parede celular para dentro de seu citoplasma;

Etapas 2: Após esta penetração, ocorre uma interação do solvente com os lipídios neutros por meio de forças de van der Waals similares;

Etapas 3: Forma-se um complexo orgânico solvente-lipídios;

Etapas 4: O complexo solvente-lipídios formado, impulsionado por um gradiente de concentração, difunde-se através da membrana celular;

Etapas 5: Os lipídios extraídos, após difusão através da parede celular, permanecem dispersos no filme de solvente orgânico que envolve a célula.

A Figura 2.15 ilustra esquematicamente uma célula microalgal e as etapas numeradas de 1 a 5, nas quais ocorre a penetração do solvente através da parede celular, a formação do complexo orgânico solvente-lipídios e a sua difusão através da membrana celular para fora da célula.

Como resultado, os lipídios neutros são extraídos para fora das células e permanecem dissolvidos no solvente não polar. Um filme de solvente orgânico é formado devido à interação entre o solvente e a parede celular. Esse filme envolve a célula microalgal e permanece intacto a qualquer agitação ou fluxo de solvente (PRAGYA; PANDEY; SAHOO, 2013; SANTOS et al., 2015).

Dentro da matriz celular há lipídios neutros, que se ligam fortemente via pontes de hidrogênio a proteínas localizadas na membrana celular, formando um complexo com lipídios polares. As interações de Van der Waals entre o solvente não polar e os lipídios não são capazes de romper esta membrana baseada nas associações lipídio-proteínas. Os solventes polares, tais como metanol ou isopropanol, são aptos a romper essas associações, formando ligações de hidrogênio com os lipídios polares no complexo. Portanto, a adição de um solvente polar a um solvente não polar facilita a extração do complexo de lipídios neutros associados à membrana, mas os lipídios polares também são extraídos (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012; SANTOS et al., 2015).

Figura 2.15-Diagrama esquemático das etapas que compõem o processo de extração de lipídios das células microalgais por solventes orgânicos.

Fonte: Adaptado (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

A adição de um volume equivalente de solvente não polar reforça a captura do restante dos lipídios que não foram extraídos na primeira interação, bem como, juntamente com a pequena quantidade de água, adicionada por último, induz à separação bifásica, pela composição de um sistema ternário.

De acordo com diversos autores, a água dissolve a estrutura de polissacarídeos contida na biomassa, o que aumenta a permeabilidade dos solventes através da parede celular, aumentando o teor de lipídios extraído (COHEN ZWI, 2012; HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

Após a extração dos lipídios, procede-se a remoção da biomassa residual, utilizando-se um meio de separação sólido-líquido, como a filtração. Após a completa separação em duas fases, os lipídios neutros e polares concentram-se na fase orgânica (predomínio do solvente não polar), enquanto que os componentes não lipídicos, tais como proteínas e carboidratos, ficam na fase aquosa (predomínio de água e solvente polar). A

separação em duas fases remove não só a água residual, mas também contaminantes não lipídicos da mistura de solventes orgânicos e lipídios.

A fase orgânica coletada é evaporada, restando os lipídios brutos secos. A figura 2.16 resume as etapas até a extração por solventes em escala laboratorial e a figura 2.17 demonstra esquematicamente a extração por solventes orgânicos em escala industrial (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

Figura 2.16-Etapas do cultivo até a extração de lipídios em laboratório.

Fonte: Adaptado (HALIM; DANQUAH; WEBLEY 2012).

Figura 2.17-Extração de lipídios por solventes em escala industrial.

Fonte: Adaptado (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

2.5.4.1 Método de Soxhlet

Uma alternativa baseada também na utilização de solventes orgânicos é o método de extração por aparelho de Soxhlet. Criado por Franz von Soxhlet, em 1879, para a extração de lipídios de matéria sólida, o aparelho é constituído por três compartimentos: um balão de fundo redondo, continuamente aquecido, que armazena o solvente orgânico da extração, o extrator Soxhlet onde é colocada a biomassa microalgal, e um condensador em contínuo resfriamento. O aquecimento do balão de fundo redondo pode ser efetuado por banho-maria, ou placa com aquecimento ou manta elétrica, conforme ilustrado na Figura 2.18 (PRAGYA; PANDEY; SAHOO, 2013).

Através do ciclo contínuo de evaporação e condensação do solvente orgânico escolhido, as células da biomassa são continuamente reabastecidas com solvente orgânico puro. O solvente orgânico proveniente do balão aquecido entra no condensador e é imediatamente canalizado para dentro do extrator. Através do contato do solvente com a biomassa, ocorre a extração dos lipídios. Um dedal localizado dentro do extrator evita que a biomassa seja carregada junto com o fluxo de solvente, funcionando como um filtro.

Quando o solvente orgânico no extrator atinge o nível de transbordamento, um sifão descarrega a mistura solvente orgânico-lipídios do extrator de volta ao balão de fundo redondo. O solvente orgânico é novamente aquecido e evaporado, enquanto os lipídios brutos extraídos permanecem no balão de fundo redondo. Este ciclo é repetido até que não haja mais lipídios brutos para serem extraídos no extrator de Soxhlet. Apesar do seu

desenho vantajoso, o aparelho Soxhlet requer elevado consumo de energia para uma destilação contínua. Usualmente os solventes empregados são hexano ou ciclohexano.

Este método é uma alternativa ao processo de extração via solventes em batelada, visto que permite uma extração contínua e por isto pode apresentar ótimos resultados (POHNDORF et al., 2016). Contudo, essa metodologia requer uma quantidade significativa de biomassa, o que é uma desvantagem para aplicação em pequena escala.

Pohndorf et al. (2016) realizaram a extração de lipídios da espécie *Spirulina sp.*, demonstrando que a extração por Soxhlet foi mais seletiva em comparação à extração a frio, resultando em um extrato com menos impurezas e compostos polares.

Figura 2.18-Desenho do aparelho Soxhlet e seus componentes.

Fonte: Adaptado (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

2.5.4.2 Método de Bligh & Dyer

O método publicado por Bligh & Dyer, em 1959, apesar de inicialmente empregado em tecidos de peixes, tem-se mostrado promissor quando aplicado à biomassa microalgal, especialmente por permitir trabalhar com elevados teores de umidade na biomassa e pouca quantidade de biomassa (BLIGH; DYER, 1959; BRUM; ARRUDA; REGITANO-D'ARCE, 2009; CHATSUNGNOEN; CHISTI, 2016). Este método emprega solventes de baixo custo (metanol e clorofórmio) e que podem ser facilmente recuperados

e reutilizados (BLIGH; DYER, 1959), seja em escala laboratorial ou em produção, conforme ilustrado nas figuras 2.16 e 2.17.

De acordo com Bligh e Dyer (1959), as misturas de clorofórmio e metanol têm uma ampla utilização como extratores lipídicos. Conforme os autores, uma ótima extração lipídica resulta quando o tecido é homogeneizado com uma mistura de clorofórmio e metanol que, ao se misturar com a água contida no tecido, resulta em uma solução monofásica e o homogeneizado resultante poderia ser diluído com água e/ou clorofórmio, produzindo um sistema bifásico (BLIGH; DYER, 1959). Pela análise de um diagrama de fases clorofórmio/metanol/água, representado na figura 2.19, buscou-se a melhor proporção entre estes reagentes (clorofórmio, metanol e água) para alcançar o melhor rendimento (extração quantitativa). Através de diversas proporções de mistura foi determinado o sistema ternário, com a separação de duas camadas distintas, sendo a camada inferior composta principalmente por clorofórmio e a camada superior composta por metanol e água; lipídios polares e neutros permanecem na fase inferior, não lipídios e impurezas permanecem na fase superior, resultando na proporção de 2:2:1,8 respectivamente para clorofórmio, metanol e água (BLIGH; DYER, 1959; SMEDES; ASKLAND, 1999; SMEDES; THOMASEN, 1996).

Figura 2.19-Diagrama de fases de Bligh & Dyer.

Fonte: (BLIGH; DYER,1959).

O método original de Bligh e Dyer foi reestudado por Chatsungnoen e Chisti (2016), aplicando-o à biomassa microalgal, e utilizando uma proporção de solventes de 5,7:3:1 (respectivamente para clorofórmio: metanol: água) para a biomassa da microalga marinha *Nannochloropsis salina* contendo 72% de umidade. Obtiveram 45,7% de lipídios totais, trabalhando com um volume total de apenas 33 mL/ g de biomassa.

Conforme verificado por Chatsungnoen e Chisti (2016), o sistema de solventes de Bligh e Dyer tem se mostrado o mais efetivo para a extração quantitativa de lipídios totais.

Diversos métodos de extração foram avaliados por Santos et al. (2015), que avaliaram diferentes solventes, com e sem ultrassom, utilizando como substrato a biomassa da *Chlorella vulgaris*. Os solventes avaliados foram etanol, hexano, clorofórmio:metanol (1:2), clorofórmio:metanol (2:1); o melhor resultado foi obtido por clorofórmio:metanol (2:1) assistido por ultrassom (19% de lipídios totais).

2.5.5 Extração com auxílio de ultrassom

A extração assistida por ultrassom é reconhecida como uma técnica eficiente na redução do tempo de trabalho e aumento do rendimento em termos de lipídios totais extraídos. Neste processo, ocorre a cavitação (funções mecânica e térmica juntas) que aumenta a eficiência da extração (SANTOS et al., 2015).

Converti et al. (2009) extraíram 24,5% de lipídios totais da biomassa da microalga *Nannochloropsis oculata*, utilizando a mistura de clorofórmio e metanol assistida por ultrassom e este foi o melhor resultado comparado aos demais realizados.

2.6 Lipídios e biodiesel

Uma importante aplicação dos lipídios extraídos das microalgas é sua conversão em biodiesel.

O biodiesel pode ser produzido a partir de gorduras animais, óleos usados ou óleos vegetais de culturas oleaginosas e material lipídico de microalgas, como descrito por Skorupskaite; Makareviciene e Gumbyte (2016). O biodiesel apresenta diversas vantagens sobre o diesel de origem fóssil, tais como: elevado ponto de fulgor, alta lubricidade e elevada biodegradabilidade, podendo ser utilizado nos motores a diesel convencionais sem qualquer modificação (CHEN et al., 2015).

Para se produzir biodiesel a transesterificação é o método mais usual e a melhor opção, uma vez que os ácidos graxos de ésteres metílicos ou etílicos (biodiesel) produzidos através deste processo, tem suas características físicas muito próximas do diesel de origem fóssil. Além disso, a transesterificação é um processo relativamente simples e menos oneroso que outras alternativas como micro emulsificação, pirólise e craqueamento catalítico (PRAGYA; PANDEY; SAHOO, 2013).

Na transesterificação os triglicerídeos (de alto peso molecular) são convertidos em ácidos graxos de ésteres alquílicos, de baixo peso molecular; quanto aos ácidos graxos livres presentes no meio reacional ocorre a esterificação, obtendo-se ao final os ésteres alquílicos correspondentes (SALAM; VELASQUEZ-ORTA; HARVEY, 2016). O grupo alcoxi do éster é substituído por um álcool, na presença de um catalisador, que pode ser um ácido, uma base ou uma enzima (PROCÓPIO, 2014).

Nas reações de transesterificação recomenda-se o uso de álcoois de cadeia curta, como metanol ou etanol. Embora o metanol seja vantajoso por permitir a separação espontânea do glicerol formado durante a reação, o etanol é de origem renovável e não tóxico (GARCIA, 2006; VÖLZ, 2009).

A catálise alcalina conduz a reações mais rápidas e maiores rendimentos que a catálise ácida nos processos de produção de biodiesel, no entanto, como os óleos microalgais apresentam elevado índice de acidez, a transesterificação via catálise ácida apresenta-se como a rota mais adequada para a produção de biodiesel a partir dos lipídios microalgais (PRAGYA; PANDEY; SAHOO, 2013).

A figura 2.20 sintetiza a reação de transesterificação, onde o glicerol é formado como coproduto. Os ésteres metílicos são o biodiesel (SALAM; VELASQUEZ-ORTA; HARVEY, 2016).

Figura 2.20-Reação de transesterificação.

Fonte: Adaptado (SALAM; VELASQUEZ-ORTA; HARVEY, 2016).

A figura 2.21 representa a reação de esterificação, em que os ácidos graxos são convertidos em ésteres alquílicos

Figura 2.21-Reação de esterificação

Fonte: Adaptado (VÖLZ, 2009).

Ao empregar-se etanol em lugar de metanol, tem-se a formação de ésteres etílicos (biodiesel de origem etílica) (AMARAL, 2014; LEMÕES, 2011). A figura 2.22 sintetiza a reação de transesterificação empregando etanol.

Figura 2.22-Reação de transesterificação empregando etanol

Fonte: Adaptado (ALVES, 2012).

Nesta reação, o biodiesel é constituído por ésteres etílicos.

2.7 Propriedades do biodiesel

As propriedades do biodiesel são determinadas pelas propriedades dos ésteres graxos que o constituem. Por sua vez, estas propriedades dependem das características e composição em ácidos graxos, bem como, do álcool empregado para gerar os ésteres (RÓS, 2012). Dentre as características estruturais dos ácidos graxos que influenciam nas propriedades finais do biodiesel tem-se: o comprimento da cadeia, o grau de insaturação e a presença de ramificações nas moléculas de ácidos graxos (KNOTHE, 2014; KNOTHE; MATHEAUS; RYAN, 2003). Portanto, para bons resultados, principalmente quanto à boa performance dos motores a diesel, é necessário analisar e controlar as características físico-químicas do biocombustível.

A padronização do biodiesel é estabelecida por diferentes normas, dentre as quais destacam-se e são mais utilizadas: ASTM D6751 (American Society for Testing and Materials - Estados Unidos), EN 14214 (European Norm - Europa) (DA RÓS, 2012). No Brasil, a Resolução ANP n° 45, de 25/08/2014 determina as diretrizes a serem seguidas em território nacional e é complementada pelo Regulamento Técnico ANP n° 3/2014 que contém as especificações para o biodiesel, bem como as metodologias a serem utilizadas (ANP, 2014).

Dentre as análises importantes para determinar a qualidade do biodiesel tem-se: número de cetano, calor de combustão, viscosidade, ponto de névoa, ponto de fluidez, entre outras (KNOTHE, 2014).

O número de cetano é um valor adimensional referente à qualidade de ignição de um combustível diesel. O número de cetano é determinado pelo tempo de retardamento da

ignição, isto é, pelo tempo que se passa entre a injeção do combustível nos cilindros e a ocorrência da ignição. É importante que os valores do número de cetano estejam dentro de uma faixa adequada, pois, caso contrário, o combustível pode ocasionar problemas no bom funcionamento do motor. Se o número de cetano for muito elevado, pode haver a geração de fumaça devido à combustão incompleta, ou seja, elevado risco de a combustão ocorrer antes do combustível e do ar estarem apropriadamente misturados. Por outro lado, valores muito baixos do número de cetano podem causar trepidações e falhas no funcionamento do motor, além de aquecimento lento na primeira partida do dia (KNOTHE, 2014; KNOTHE; MATHEAUS; RYAN, 2003; TALEBI et al., 2013).

O índice de cetano do biodiesel depende da matéria-prima utilizada para a sua produção, bem como do tamanho da cadeia carbônica dos ácidos graxos e do grau de saturação. Assim, quanto maior o número de carbonos encadeados e mais saturados (ausência de duplas ligações), maior será o número de cetano. Existe uma faixa para o número de cetano de acordo com cada norma; conforme a norma européia, o número de cetano deve ser no mínimo 51. Portanto, matérias-primas graxas que contenham um elevado grau de insaturação não são capazes de atender a esse padrão. Índices de cetano baixos estão associados com os componentes altamente insaturados, tais como: ésteres de ácido linoleico (C18: 2) e linolenico (C18: 3). De acordo com Talebi et al. (2013), números de cetano elevados foram encontrados para os ésteres de ácidos graxos saturados, tais como: ácido palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0), como é o caso do biodiesel de óleo de palma (matéria-prima rica nestes ácidos graxos), que resultou em elevado número de cetano.

Outra importante propriedade para a qualidade do biodiesel é determinada pelo índice de iodo. O índice de iodo é uma medida da insaturação total dentro de uma mistura de ácidos graxos. É expressa em gramas de iodo que reagem com 100 g da amostra respectiva, refletindo na adição de iodo para as duplas ligações. De acordo com a norma européia (EN 14214) o índice de iodo é limitado a 120g I₂/100g (RÓS, 2012). Torna-se necessário limitar a quantidade de ácidos graxos insaturados, para a finalidade de produção de biodiesel, pois a presença destes resulta em elevado aquecimento e consequente polimerização de triacilgliceróis. Como consequência, podem formar-se depósitos, ou a deterioração do lubrificante no motor. Portanto, quanto maior o grau de insaturação, maior o valor do índice de iodo. De acordo com a norma europeia, a quantidade máxima de ácido α -linolênico (C18:3) deve limitar-se a 12,0%, para atender às especificações para o índice de iodo. Contudo, segundo outros autores, essa regra não se confirma. O óleo de palma,

rico em ésteres de ácidos graxos saturados, tais como palmítico (C16: 0) e esteárico (C18: 0), apresenta índice de iodo superior (RAMOS et al., 2009).

Outro importante parâmetro refere-se à estabilidade à oxidação. Este parâmetro, medido em horas, determina por quanto tempo as características do biodiesel serão conservadas sob condições de calor, umidade e armazenamento, presença de traços de metais e condições do tanque de armazenagem. A auto-oxidação do combustível relaciona-se à insaturação, ou seja, à presença de ácidos graxos contendo duplas ligações em sua estrutura (RÓS, 2012).

Quanto maior o conteúdo de ésteres alquílicos poli-insaturados nas amostras de biodiesel, mais suscetível a sofrer oxidação, contudo, o biodiesel pode ser tratado com antioxidantes, substâncias tais como o alfa tocoferol e os butilatos de hidroxianisole e de hidroxitolueno, que aumentam sua estabilidade oxidativa (KNOTHE, 2005, 2007).

Biocombustíveis podem desenvolver problema de sedimentação de ceras e entupimento de filtros, quando sob o efeito de baixas temperaturas. No Brasil, de acordo com o Regulamento Técnico ANP nº 3/2014, o ponto de entupimento de filtro a frio (PEFF), parâmetro de controle relacionado a este efeito, é controlado através de temperaturas estabelecidas ao longo dos meses do ano, sendo no mínimo 5°C para os estados da região Sul e no máximo de 14°C para os estados das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Para as demais regiões brasileiras, este valor é de 19°C (ANP, 2014).

Ésteres metílicos de ácido esteárico e palmítico são os primeiros a precipitar e causar entupimento, portanto, biodiesel contendo quantidades elevadas desses constituintes são desfavoráveis para esta propriedade (TALEBI et al., 2013). Portanto, o valor do ponto de entupimento de filtro a frio está diretamente relacionado com a quantidade dos ésteres de ácidos graxos saturados de cadeia longa. Os ésteres insaturados não estão incluídos neste parâmetro porque os pontos de fusão destes compostos são muito mais baixos em comparação com a dos saturados (RAMOS et al., 2009).

Além das propriedades descritas, existem outras, comuns ou específicas, de acordo com os diversos países que produzem e utilizam biodiesel. Os valores estabelecidos para cada parâmetro podem variar, dependendo até mesmo das condições climáticas e das fontes de matérias primas disponíveis.

O presente trabalho visa discutir algumas dessas propriedades, com base na análise de composição em ácidos graxos dos óleos obtidos.

2.8 Ácidos graxos essenciais à saúde

Dentre os diversos ácidos graxos existentes, destacam-se os poli-insaturados de cadeia longa, e, em especial, os essenciais, assim denominados por sua importância na regulação do metabolismo celular, na produção de energia e no crescimento, e, principalmente, na prevenção de diversas doenças do sistema neurológico e cardiovascular. (SOUZA; MATSUSHITA; VISENTAINER, 2012).

Conforme diversos autores, comprova-se cientificamente que o metabolismo humano é incapaz de produzir os ácidos graxos insaturados das famílias ω -3 e ω -6, que, por serem indispensáveis à saúde, devem ser ingeridos através dos alimentos. Essas duas famílias de ácidos graxos são representadas, respectivamente, pelos seguintes ácidos essenciais: o ácido α -linolênico (C18:3) e o ácido linoléico (C18:2). Estes, por sua vez, dão origem a outros ácidos essenciais de cadeias longas, dentre os quais destacam-se o EPA (Ácido Eicosapentaenóico, C20:5), o DHA 22:6 (Ácido Docosaheptaenóico, C22:6) e o DHA 22:5 (Ácido Docosapentaenóico, C22:5), pertencentes à família ω -3 e o Ácido Araquidônico (C20:4), da família ω -6, conhecidos pelos diversos benefícios à saúde (ACIDOS..., 2010).

Segundo vários autores, a ingestão equilibrada de ácidos graxos essenciais previne reações inflamatórias, combate a depressão e o Mal de Alzheimer, bem como a esclerose múltipla amiotrófica, protege o cérebro e a visão, dentre muitos outros benefícios (SOUZA; MATSUSHITA; VISENTAINER, 2012). A tabela 2.4 lista os ácidos graxos essenciais integrantes das famílias ω -3 e ω -6.

Tabela 2.4-Relação de ácidos graxos essenciais e famílias a que pertencem.

Ácidos graxos essenciais e respectivas famílias		
Família	Nome comum	Notação do lipídio
Ômega 3 (ω-3)	Ácido alfa-linolênico (ALA)	18:3 (n-3)
	Ácido estearidônico (STD)	18:4 (n-3)
	Ácido eicosatrienóico (ETE)	20:3 (n-3)
	Ácido eicosatetraenóico (ETA)	20:4 (n-3)
	Ácido eicosapentaenóico (EPA)	20:5 (n-3)
	Ácido docosapentaenóico (DPA)	22:5 (n-3)
	Ácido docosaexanóico (DHA)	22:6 (n-3)
	Ácido tetracosapentaenóico (TPA)	24:5 (n-3)
	Ácido tetracosahexaenóico (THA) (Ácido Nisínico)	24:6 (n-3)
Ômega 6 (ω-6)	Ácido linoléico	18:2 (n-6)
	Ácido γ -linolênico	18:3 (n-6)
	Ácido eicosadienóico	20:2 (n-6)
	Ácido dihomo-gamma-linolênico	20:3 (n-6)
	Ácido araquidônico	20:4 (n-6)
	Ácido docosadienóico	22:2 (n-6)
	Ácido adrenico	22:4 (n-6)
	Ácido docosapentaenóico	22:5 (n-6)
	Ácido calêndico	18:3 (n-6)

Fonte: Adaptado (ACIDOS..., 2010; SOUZA; MATSUSHITA; VISENTAINER, 2012).

Os ácidos graxos ω -3 apresentam a sua primeira dupla ligação entre os 3° e 4° carbonos, enquanto a família ω -6 apresenta a primeira dupla ligação entre o 6° e o 7° carbonos, a partir do último grupo metílico da molécula.

Os alimentos que se apresentam como fontes expressivas de ômega 3 e 6 são os peixes e crustáceos, principalmente os que habitam águas frias e profundas, contudo, as microalgas, de acordo com diversos autores, são microorganismos que os sintetizam naturalmente, variando seus teores de acordo com a espécie, sendo uma fonte de matéria prima promissora dessas substâncias.

2.9 Espécies de microalgas marinhas estudadas

Neste trabalho utilizou-se a biomassa de três diferentes espécies de microalgas marinhas: *Chlorella minutissima*, *Dunaliella salina* e *Nannochloropsis gaditana*.

2.9.1 *Chlorella minutissima*

A espécie *Chlorella minutissima* pertence ao reino Eukaryota, sub-reino Viridiplantae, linhagem das Chlorophyta, classe Trebouxiophyceae e ordem Chlorellales e seu aspecto ao microscópio pode ser visualizado na Figura 2.23.

Esta espécie é rica em ácidos graxos poli-insaturados, e adapta-se bem a diferentes condições de cultivo em larga escala; o gênero *Chlorella* é conhecido por diversos autores como um excelente produtor de lipídios, tanto pelo cultivo fotoautotrófico, como pelo heterotrófico (LOURENÇO, 2006; FERREIRA et al., 2017).

Figura 2.23-Microfotografia da microalga *Chlorella minutissima*.

Fonte: (UNIPROT TAXONOMY 3081, 2010).

2.9.2 *Dunaliella salina*

A espécie *Dunaliella salina* pertence ao reino Eukaryota, sub-reino Viridiplantae, linhagem das Chlorophyta e classe Chlorophyceae. Seu aspecto ao microscópio está conforme a Figura 2.24. As espécies desse gênero são móveis, unicelulares, e comuns em águas marinhas. Os organismos são relativamente simples de cultivar (FAKHRY; MAGHRABY, 2013).

Figura 2.24-Microfotografia da microalga *Dunaliella salina*.

Fonte: (WIKIWAND, 2007).

2.9.3 *Nannochloropsis gaditana*

A espécie *Nannochloropsis gaditana* pertence à divisão Ochrophyta, classe Chrysophyceae e ordem Eustigmatales. O gênero *Nannochloropsis* possui seis espécies conhecidas, consideradas microalgas promissoras para aplicações industriais devido à capacidade de acumular grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados. A espécie *Nannochloropsis gaditana* destaca-se pelo seu potencial à produção de biodiesel, devido à elevada produtividade em lipídios e ácidos graxos com cadeias na faixa de 16 a 20 carbonos (MING REN, 2014)

As espécies do gênero possuem diâmetro de 3–4 μm , forma esférica, ligeiramente ovoide e não possuem flagelo. Suas paredes celulares de polissacarídeos contém um único cloroplasto sem pirenoide, mas com várias bandas de lamelas fotossintéticas, com três membranas tilacóides por banda. As espécies do gênero não acumulam amido mas são fonte de ácidos graxos poli-insaturados, que são usados na produção de ácido eicosapentaenóico, importante na prevenção de várias doenças, bem como para produção de biodiesel. Também são excelente fonte de proteínas, vitaminas e pigmentos, tais como clorofila e astaxantina (LIU; SONG; QIU, 2017a)

Uma espécie do gênero pode ser vista ao microscópio na Figura 2.25.

Figura 2.25-Espécie do gênero *Nannochloropsis* ao microscópio.

Fonte: (HIBBERD, 1981).

2.10 Planejamento de Experimentos e Taguchi

O Planejamento ou delineamento de experimentos ou em inglês DOE (*Design of Experiments*) é uma poderosa técnica estatística que foi inicialmente introduzida por R. A. Fisher, na Inglaterra, em 1920. Em suas pesquisas, Fisher queria descobrir sobre a influência da água, da aplicação de fertilizantes e da luz solar simultaneamente para produzir o melhor cultivo. A partir daí, esta técnica migrou para o ambiente acadêmico, descobrindo-se muitas aplicações no meio industrial. Como pesquisador no Japão, Dr. Genechi Taguchi realizou muitas pesquisas utilizando DOE na década de 1940. Taguchi padronizou a técnica, tornando-a mais fácil de aplicar e passou a utilizá-la para melhorar a qualidade dos produtos em linha de fabricação. Esta versão padronizada do DOE ficou popularmente conhecida como Método de Taguchi ou Taguchi, sendo introduzida nos Estados Unidos no início da década de 1980 (ROY, 2001).

Assim, o planejamento de experimentos é um método estruturado, que permite a avaliação de diversos fatores de entrada, inclusive verificando possíveis interações entre esses fatores, e que possibilita, através da realização de um conjunto de experimentos, o alcance de respostas para diferentes questões e variáveis envolvidas (HALLENBECK et al., 2014).

Dentre as vantagens de utilizar esta técnica, destacam-se:

- a verificação simultânea de diferentes fatores ou variáveis,
- a robustez, ao neutralizar os ruídos (influências externas que podem influenciar negativamente os resultados) e
- a economia de tempo de experimentação até o alcance dos resultados.

2.10.1 Método de Taguchi

O método de Taguchi utiliza arranjos ortogonais (em inglês – OA – Orthogonal Arrays), que são tabelas organizadas, onde as colunas para as variáveis independentes são ortogonais umas às outras. Com este modelo, formam-se matrizes, onde as combinações de múltiplos fatores podem ser verificadas em diferentes níveis. Essas matrizes são organizadas para garantir que todos os fatores de todos os níveis são considerados igualmente, sendo os fatores avaliados de forma independente (MIT, 1998).

O método de Taguchi é uma abordagem que mescla técnicas estatísticas e de engenharia, e a análise dos dados experimentais usando ANOVA (análise de variância) fornece informações sobre os fatores estatisticamente significativos e seus níveis ideais, para alcançar as respostas desejadas (CHIRANJEEVI; MOHAN, 2016). Através da ANOVA compara-se dois ou mais fatores, verificando-se sua significância (teste F), e pode-se determinar quais fatores são realmente mais significantes no processo ou problema em estudo.

Desta forma, é possível estudar um grande número de variáveis com um pequeno número de experimentos, economizando tempo e reduzindo custos (CHIRANJEEVI; MOHAN, 2016; PARDESHI; MUNGRAY; MUNGRAY, 2016).

O método de Taguchi considera as possíveis interferências (fatores externos não controláveis), que são chamadas de ruído, isto é, são interferências que influenciam sobre a variabilidade dos experimentos. A razão sinal ruído (S/N), conceito proveniente de telecomunicações, definida como a razão entre a potência de um sinal e a potência do ruído sobreposto a este sinal, é utilizada para investigar a variação da resposta, que influencia na redução da variação da característica da qualidade (YANG; HWANG; LEE, 2002).

Em termos menos técnicos, a relação sinal-ruído compara o nível de um sinal desejado com o nível do ruído. Quanto mais alta for a relação sinal-ruído, menor é o efeito do ruído sobre a detecção ou medição do sinal.

Em um experimento Taguchi planejado, manipula-se fatores de ruído para forçar a ocorrência de variabilidade e identificar, usando os resultados, configurações ideais de fatores de controle que tornem o processo ou produto robusto ou resistente a variações causadas por fatores de ruído (LIU et al., 2017).

De acordo com Yamg, Hwang e Lee (2002), Taguchi classificou as características de desempenho em três categorias, com base na relação S/N, o que é sintetizado pelas Equações 2.1, 2.2, 2.3, 2.4 e 2.5.

- **Característica S/N menor é melhor**

$$\frac{S}{N} = 10 \log \left(\frac{\sum_{i=1}^n Y_i^2}{n} \right) \quad (2.1)$$

Onde n é o número de respostas observadas para cada condição experimental, e Y_i o valor da resposta na dada condição experimental, sendo i um valor inteiro e positivo.

- **Característica S/N maior é melhor**

$$\frac{S}{N} = 10 \log \left[\sum_{i=1}^n \left(\frac{1}{n} \right) \left(\frac{1}{Y_i^2} \right) \right] \quad (2.2)$$

- **Característica S/N nominal é melhor**

$$\frac{S}{N} = 10 \log \left(\frac{\overline{Y^2}}{\overline{S^2}} \right) \quad (2.3)$$

$$\overline{Y} = \frac{Y_i}{n} \quad (2.4)$$

$$S = \frac{1}{n-1} \cdot \sum (Y_i - \overline{Y})^2 \quad (2.5)$$

Karapatsia et al. (2015) aplicaram o planejamento de experimentos de Taguchi para investigar o efeito de cinco variáveis no cultivo da microalga marinha *Stichococcus sp.* As variáveis respostas avaliadas foram as concentrações de biomassa, carboidratos, proteínas e lipídios obtidos.

Chakraborty et al.(2016) também utilizaram com sucesso o método de Taguchi no estudo de quatro diferentes variáveis para maximizar a produção de biomassa e de lipídios da microalga *Chlorella minutissima*.

Loures et al. (2015) utilizaram o método de Taguchi, matriz L8 para determinar quais os fatores mais influentes no processo de cultivo da microalga *Chlorella sp.* e concluíram que a produção de lipídios foi influenciada quando a concentração de Nitrato de Sódio foi de 0,025 g/L.

Diante da necessidade de opção para obtenção de biodiesel, bem como, de outros bioprodutos com diferentes aplicações, e de forma a não poluir o meio ambiente, neste trabalho propõe-se estudar fatores que podem influenciar no processo de extração de lipídios da biomassa microalgal, dando ênfase a quatro parâmetros: umidade da biomassa, proporção entre solventes, volume total de solventes e tempo de ultrassom.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi planejado e compreendido pelas fases e atividades sintetizadas na figura 3.1. A primeira fase consistiu no planejamento, seguida da fase II (realização dos experimentos) e fase III (análise dos resultados, discussão e conclusões).

Figura 3.1-Fluxograma das fases da pesquisa sobre extração de lipídios.

Fonte: Próprio autor.

3.1 Materiais

3.1.1 Microalgas marinhas

Os experimentos foram realizados com três diferentes microalgas marinhas: *Chorella minutissima* (Clone 26), *Dunaliella salina* (Clone 116) e *Nannochloropsis gaditana* (Clone 130), cujas cepas foram doadas pelo Banco de Microrganismos Aidar & Kutner (BMA&K) do Instituto Oceanográfico – USP- São Paulo.

3.1.2 Reagentes

Todos os reagentes utilizados para a execução dos experimentos e preparação dos meios de cultura são de grau padrão analítico. A Tabela 3.1. apresenta os reagentes necessários para a preparação do meio f/2 sem sílica (AMARAL et al., 2015; GUILLARD, 1975; LOURES et al., 2015).

Tabela 3.1-Reagentes utilizados para a preparação do meio de cultivo.

Reagentes	Concentração
NaCl	33,3 g/L
NaNO ₃	75,0 mg/L
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	5,0 mg/L
FeCl ₃ .6H ₂ O	3,15 g/L
Na ₂ EDTA	4,3 g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	22,2 mg/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	180,0 mg/L
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	6,3 mg/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	10,0 mg/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	9,8 mg/L
Tiamina (B1)	100,0 mg/L
Cianocobalamina (B12)	0,5 mg/L
Biotina (B7)	0,5 mg/L

Fonte: Adaptado (AMARAL et al., 2015; GUILLARD, 1975).

Os reagentes referenciados na Tabela 3.1 foram utilizados nos inóculos, manutenção das células e cultivos das microalgas para a obtenção da biomassa utilizada para extração dos lipídios.

Na floculação foi utilizada uma solução de Sulfato de Alumínio 1,0 eq/L (PRAGYA; PANDEY; SAHOO, 2013). Para as extrações dos lipídios da biomassa microalgal foram utilizados metanol e clorofórmio grau analítico e água destilada (BLIGH; DYER, 1959; CHATSUNGNOEN; CHISTI, 2016).

3.2 Equipamentos

3.2.1 Fotobiorreatores tipo coluna de bolhas

As microalgas foram cultivadas em um sistema composto por três fotobiorreatores do tipo coluna de bolhas, de volume total de 50 L cada, dotados de iluminação externa e agitação pneumática. Cada fotobiorreator é um tubo de material acrílico de 5 mm de espessura de parede, diâmetro interno de 135 mm, altura de 1200 mm, volume útil de 44 L. O sistema de aeração consiste de um difusor (do tipo pedra porosa, de formato anelar com 13,5 cm de diâmetro), localizado na base de cada um dos tubos, conectado por mangueira de silicone a um compressor de ar diafragmático com vazão de 2 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto) para a dispersão de microbolhas de ar no sistema (LOURES, 2016).

As microalgas foram cultivadas sem a alimentação de CO₂, apenas bolhas de ar foram injetadas no sistema, portanto, o CO₂ presente foi apenas o existente no meio ambiente dos fotobiorreatores.

A agitação pneumática foi fornecida por um compressor de ar BOYU (modelo ACQ-003). Este equipamento foi mantido em sala climatizada, isolada da luz solar, e a iluminância (150 Lux) fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40W, medida por luxímetro digital. A concentração do inóculo foi de 10% (v/v). As figuras 3.2. e 3.3 apresentam, respectivamente, desenho esquemático e foto dos fotobiorreatores de 50 L utilizados.

Figura 3.2-Esquema dos fotobiorreatores utilizados para cultivo.

Fonte: Próprio autor.

Figura 3.3-Fotobiorreatores utilizados no cultivo, operando no laboratório de engenharia de microalgas (DEQUI - USP).

Fonte: Próprio autor.

3.2.2 Outros Equipamentos

Outros equipamentos utilizados foram: balança analítica (Modelo DC-1210D, Fabricante YMC), espectrofotômetro UV-VIS (Modelo Q898DPT, Fabricante QUIMIS), , ultrassom (Modelo Q3.0/40A, Fabricante: Ultronique), estufa (Modelo MA 033, Fabricante: Marconi) e bomba de vácuo (Modelo: 141, Tipo: 2VC, Número DG009, Fabricante: PRIMAR).

3.3 Procedimentos

3.3.1 Preparação dos materiais e equipamentos

Antes da realização de cada cultivo, os fotobiorreatores foram escovados e lavados com água corrente e detergente e foi adicionado hipoclorito de sódio em solução para a completa desinfecção. Posteriormente o hipoclorito de sódio residual foi neutralizado com tiosulfato de sódio. Todos os demais materiais utilizados foram cuidadosamente lavados com água corrente e detergente, relavados com água destilada e álcool etílico em solução a 70% v/v.

3.3.2 Inóculos e Repicagem

Inicialmente as cepas passaram por um processo denominado repicagem, onde ocorreu um aumento tanto em número de células como em volume, executado sob condições controladas para garantir a qualidade dos microrganismos para o cultivo em maior escala.

Os inóculos das microalgas foram previamente cultivados em cepário (sala climatizada com temperatura controlada) e as repicagens foram cuidadosamente executadas de acordo com os procedimentos previamente desenvolvidos pelo laboratório de engenharia de microalgas (AMARAL, 2014; LOURES, 2016).

3.3.3 Acompanhamento dos cultivos

O crescimento das microalgas durante os cultivos foi acompanhado por análise de absorvância em espectrofotômetro UV-VIS, selecionando o comprimento de onda de 570 nm para a realização das leituras de absorvância para acompanhamento da reprodução de microalgas (aumento da quantidade de microalgas no meio). Utilizando-se um pequeno béquer, cerca de 10 mL de biomassa em meio de cultivo foram coletados pela saída na parte inferior dos fotobiorreatores. O meio de cultivo contendo biomassa foi transferido para uma cubeta de quartzo e em seguida efetuou-se a leitura da absorvância.

3.3.4 Colheita e floculação da biomassa

Após cerca de sete dias de cultivo nos fotobiorreatores descritos em 3.2.1, por um período de 24 horas, com aeração constante, procedeu-se a etapa de colheita da biomassa. As microalgas se reproduziram e seu crescimento foi acompanhado verificando-se a absorvância via espectrofotômetro UV-VIS, com a finalidade de garantir que a taxa de crescimento encontrava-se de acordo com parâmetros esperados (AMARAL, 2014; AMARAL et al., 2015; LOURES et al., 2015).

A colheita da biomassa consistiu em drenar todo o volume dos fotobiorreatores para um silo em formato cônico na parte inferior, onde foi adicionada solução de sulfato de alumínio 1eq/L na proporção de 2 mL da solução flocculante para cada litro de cultivo. Após cerca de 30 minutos ocorreu a separação de fases com a concomitante decantação da biomassa na fase inferior do cone, conforme mostra a figura 3.4.

Figura 3.4-Silo de fundo cônico contendo biomassa floculada.

Fonte: Próprio autor.

3.3.5 Filtração da biomassa

Após a floculação no silo de fundo cônico, procedeu-se a retirada do excesso de água e em seguida, a biomassa foi filtrada sob vácuo, utilizando um sistema montado com kitassato e funil de porcelana Büchner com papel de filtro. As figuras 3.5 e 3.6 mostram respectivamente o sistema de filtração e a biomassa obtida após a filtração.

Figura 3.5-À esquerda, sistema montado para filtração da biomassa e à direita, detalhe da biomassa recentemente colhida.

Fonte: Próprio autor.

Figura 3.6-À esquerda, biomassa obtida logo após a filtração (úmida) e à direita, aspecto da biomassa após secagem em estufa a 60°C.

Fonte: Próprio autor.

3.3.6 Pré-tratamento da biomassa (secagem e trituração)

A biomassa úmida foi uniformemente distribuída sobre um vidro de relógio e levada a secar em estufa à temperatura de 55 – 60°C por um período de 24 horas, findo os quais foi retirada, colocada em dessecador para estabilizar em temperatura ambiente, e o vidro de relógio contendo a biomassa foi novamente pesado.

Após atingir massa constante (variação de massa desprezível), esta foi triturada utilizando gral de porcelana e pistilo, até atingir a consistência de um pó fino e homogêneo, isento de grumos ou pedaços, conforme ilustra a Figura 3.7.

Figura 3.7-Aspecto da biomassa preparada para as extrações.

Fonte: Próprio autor.

3.3.7 Planejamento experimental

Uma vez que as etapas de cultivo, colheita, floculação, filtração e pré-tratamento da biomassa foram realizadas, fez-se a extração de lipídios. A etapa de extração foi precedida pelo planejamento experimental.

Neste trabalho o planejamento experimental foi estruturado para o estudo de quatro diferentes parâmetros (fatores) em três níveis distintos, que podem influenciar a extração de lipídios da biomassa microalgal, conforme especificado na tabela 3.2.

Tabela 3.2-Fatores e níveis utilizados no planejamento experimental

Fatores	Níveis		
	1	2	3
A - Umidade da biomassa (%)	64	72	80
B - Proporção de clorofórmio, metanol e água (v/v/v)	<i>P1: 2 :2 :1</i>	<i>P2: 2 :2,5 :1</i>	<i>P3: 5,7 :3 :1</i>
C- Volume total solventes* (mL)	10	20	33
D - Tempo ultrassom (min)	50	70	90

*Solventes: clorofórmio, metanol e água.

Fonte: Próprio autor.

Na escolha tanto dos fatores como dos níveis, levou-se em consideração os mais significativos, em termos de resultados obtidos nos processos de extração de lipídios por solventes, registrados por diversos autores, a saber:

Níveis para umidade da biomassa:

Bligh e Dyer (1959) enfatizam a importância de trabalhar com um tecido contendo 80% de umidade e Chatsungnoen e Chisti (2016) obtiveram excelentes resultados com uma biomassa microalgal com 72% de umidade. Decidiu-se avaliar os efeitos em uma escala decrescente de umidade, empregando-se o menor nível da matriz experimental em 64%.

Níveis para proporção de solventes:

De acordo com Bligh e Dyer (1959), a proporção do sistema ternário clorofórmio: metanol: água deve ser de 2:2:1, enquanto que Smedes e Askland (1999), Smedes e Thomasen (1996) estudaram um incremento na quantidade de metanol para melhores resultados de extração, relacionado ao rompimento das paredes das células (2:2,5:1) e Chatsungnoen e Chisti (2016) obtiveram excelentes resultados com um nível mais elevado de clorofórmio e metanol (5,7;3:1).

Níveis para volume de solventes:

Verifica-se na literatura uma variabilidade quanto aos volumes totais empregados, vários destes encontram-se dentro dos níveis especificados na tabela 3.2. Busca-se com este trabalho o melhor rendimento em extração de lipídios que simultaneamente solicite o menor consumo de solventes (BLIGH; DYER, 1959; CHATSUNGNOEN; CHISTI, 2016; DU et al., 2015; SMEDES; ASKLAND, 1999; VIÊGAS, 2010) .

Níveis para o tempo de ultrassom:

Os tempos de ultrassom empregados foram estabelecidos de acordo com trabalhos realizados por Adam et al., (2012); SANTOS et al., (2015) e Garoma e Janda (2016). Estes tempos podem variar de 20 minutos até acima de 4 horas. Dentro desse intervalo foram testados três diferentes tempos estabelecidos neste trabalho.

Em relação à modelagem matemática, foi utilizado um planejamento fatorial em triplicata, onde conjuntos de dados são obtidos por um arranjo ortogonal de Taguchi L9, conforme Tabela 3.3., com os fatores de entrada mencionados anteriormente na Tabela 3.2.

Tabela 3.3-Arranjo ortogonal L9 de Taguchi.

Experimento N^o	Fator A	Fator B	Fator C	Fator D
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

Fonte: (MIT 1998).

Trabalhando com esse arranjo ortogonal, estudou-se como variável resposta o maior teor de lipídios em %.

A ordem de realização dos experimentos em triplicata foi aleatória, sendo cada experimento realizado em triplicata.

O fluxograma na Figura 3.8 sintetiza a etapa do trabalho experimental em que se aplicou o arranjo ortogonal L9 de Taguchi, conforme a tabela 3.3.

Figura 3.8-Fluxograma relacionando o trabalho experimental com a etapa em que o arranjo ortogonal L9 de Taguchi é aplicado.

Fonte: Próprio autor.

3.3.8 Método de extração de lipídios

O método utilizado na extração dos lipídios via solventes, baseou-se no desenvolvido por Bligh e Dyer (1959). Este método tem sido estudado e modificado ao longo de décadas, adaptado à extração de lipídios totais da biomassa microalgal, com excelentes resultados.

3.3.8.1 Hidratação da biomassa

Para estudar a influência da umidade da biomassa na extração de lipídios, foi necessário hidratar esta biomassa de acordo com os teores de umidade estabelecidos na matriz experimental: 64%, 72% e 80%.

Em cada experimento foi utilizado 1 g de biomassa seca, conforme previamente efetuado na etapa de pré-tratamento da biomassa (item 3.3.5).

A quantidade de água adicionada à biomassa para atender aos teores de umidade especificados foi previamente calculada.

A biomassa foi pesada em erlenmeyer de 125 mL e com pipetador automático foi adicionado o volume de água destilada correspondente. A tabela 3.4 relaciona os volumes de água utilizados.

Tabela 3.4- Volumes de água adicionados para hidratar 1 g de biomassa.

Volume de água (mL)	Teor de umidade (%)
1,78	64
2,57	72
4,0	80

Fonte: Próprio autor.

A água foi cuidadosamente adicionada para distribuir-se uniformemente sobre a biomassa. O erlenmeyer foi manualmente homogeneizado por 1 minuto e colocado durante 30 minutos em banho de ultrassom para uma completa hidratação.

3.3.8.2 Extração de lipídios

Com a biomassa hidratada, a marcha analítica para todos os experimentos de extração consistiu de três etapas distintas:

Etapa 1: Adição de clorofórmio e metanol ao erlenmeyer contendo a amostra hidratada, agitação manual por 2 minutos e agitação em banho de ultrassom, pelo tempo especificado conforme o experimento em andamento;

Etapa 2: Retirada do erlenmeyer do banho de ultrassom, adição de clorofórmio, agitação manual por mais 2 minutos, e em seguida nova agitação em banho de ultrassom, pelo tempo especificado conforme o experimento em andamento;

Etapa 3: Retirada do erlenmeyer do banho, adição de água destilada conforme especificado para o experimento em andamento e agitação manual por mais 2 minutos.

Após a etapa 3, foi realizada a filtração do conteúdo, com papel de filtro de 12,5 cm de diâmetro, filtragem média. A biomassa ficou retida no papel de filtro e o filtrado foi cuidadosamente coletado em um funil de separação de vidro de 250 mL. Este filtrado permaneceu em repouso até a total separação de fases.

Após a separação, a fase inferior foi cuidadosamente coletada em frascos de vidro de 40 mL, previamente pesados. Os frascos contendo a fase inferior do filtrado foram identificados, levados para evaporação do solvente em estufa a 55 – 60 °C por um período

de 24 horas. Finalizado este tempo, os frascos foram retirados da estufa e deixados em dessecador por 15 minutos, para resfriamento à temperatura ambiente. Os frascos foram então novamente pesados e sua massa final registrada.

A quantidade de lipídios obtida em gramas em cada experimento foi calculada em porcentagem, em relação a 1 g de biomassa.

A figura 3.9 mostra o arranjo dos erlenmeyers no banho de ultrassom.

Figura 3.9-Esquema de Erlenmeyers em ultrassom.

Fonte: Próprio autor.

A figura 3.10 mostra o esquema de filtração e separação de fases.

Figura 3.10-Filtração da biomassa e separação de fases.

Fonte: Próprio autor.

Na figura 3.11 observam-se, em detalhe, as fases separadas e a fase lipídica colhida misturada ao solvente, preparada para ser levada à estufa.

Figura 3.11-À esquerda detalhe das fases em separação e à direita a fase lipídica coletada.

Fonte: Próprio autor

O percentual de lipídios extraídos da biomassa foi determinado conforme a equação 3.1.

$$\% \text{ Lipídios} = \left(\frac{\text{Massa final de lipídios (g)}}{\text{Massa inicial de Biomassa (g)}} \right) \times 100 \quad (3.1)$$

3.4 Transesterificação do material lipídico

Os lipídios totais extraídos da biomassa das microalgas marinhas foram convertidos em ésteres de etila, por meio de reação de transesterificação, via catálise ácida.

3.4.1 Processo de síntese de ésteres de etila de ácidos graxos

O processo de síntese de ésteres de etila, a partir dos lipídios totais extraídos, foi realizado em balão de fundo redondo, acoplado a um condensador de refluxo, em banho de água aquecido e com agitação magnética. O aparato utilizado consta na Figura 3.12.

Figura 3.12-Aparato utilizado para as reações de transesterificação.

Fonte: Próprio autor

O meio de reação foi composto de lipídios e etanol na proporção molar 1:20, catalisado por ácido sulfúrico (10% m/m), à temperatura de 80°C, durante 5 horas (GARCIA, 2006; VÖLZ, 2009).

Os lipídios extraídos foram convertidos em ésteres de etila por transesterificação via catálise ácida. Os cálculos foram efetuados de acordo com Garcia (2006).

Após a síntese dos ésteres etílicos, o meio de reação permaneceu em repouso até seu completo resfriamento à temperatura ambiente. Após resfriar, foi adicionado 0,5mL de água e 0,5 mL de hexano por mL de mistura para a transferência dos compostos hidrofílicos e hidrofóbicos para as respectivas fases. A amostra foi agitada e colocada em funil de separação e aguardou-se até a separação das fases.

Para a fase orgânica (fase superior) foram transferidos os ésteres etílicos. Na fase intermediária encontrou-se o glicerol, coproduto da reação. Para a fase inferior (fase aquosa) foi transferido o excesso de álcool e o catalisador ácido. Após a separação, a fase orgânica foi lavada duas vezes com água para retirar o excesso de ácido. A separação ocorreu em funil de separação onde aguardou-se a separação completa das fases. Por fim, a fase orgânica foi levada à estufa a 60°C por 24 horas para a evaporação do solvente orgânico. A figura 3.13 ilustra o funil com as fases formadas. Os ésteres de etila estão na fase orgânica, superior.

Figura 3.13-Funil de separação contendo as fases formadas na etapa de lavagem dos ésteres etílicos: os ésteres localizam-se na fase superior.

Fonte: Próprio autor.

3.5 Análises realizadas

Com os lipídios totais extraídos da biomassa das microalgas marinhas foram realizadas as seguintes análises:

- quantificação dos ésteres de etila por espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN¹H);
- composição em ácidos graxos, via Cromatografia a Gás Capilar (CGC).

A quantificação dos ésteres etílicos por espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN¹H) teve como objetivo verificar se os lipídios são potencialmente adequados como matéria prima para a produção de biodiesel.

A composição em ácidos graxos objetivou conhecer qualitativa e quantitativamente os ácidos graxos constituintes do material lipídico, para avaliar seu potencial tanto na produção de biodiesel como para outros bioprodutos.

3.5.1 Quantificação de Ésteres de Etila por Espectrofotometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN¹H)

A análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H) foi utilizada para contabilizar o número de hidrogênios presentes na amostra, confirmando a conversão dos lipídios em ésteres de etila. As amostras de ésteres de etila foram diluídas em clorofórmio deuterado (CDCl₃).

O equipamento utilizado foi o espectrômetro Varian, modelo Mercury- 300 MHz, pertencente ao laboratório de Química Fina (LQF), do DEQUI (EEL-USP), conforme ilustrado na figura 3.14.

Figura 3.14-Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear

Fonte: Próprio autor.

Para a conversão dos triglicerídeos em ésteres por via química utilizou-se como base os dados gerados por RMN¹H, conforme metodologia descrita por Garcia (2006).

Como pode ser observado na figura 3.15, no quarteto gerado pelos prótons do CH₂ etoxílico o desdobramento em menor deslocamento químico (4,09) é o único pico de ressonância que não apresenta sobreposição com nenhum outro sinal dos mono-, di- ou triglicerídeos.

Figura 3.15-Região entre 4,35 e 4,05 ppm dos espectros de RMN¹H dos TG, DG, MG e ésteres etílicos.

Fonte: Adaptado (GARCIA, 2006).

Através do fenômeno denominado desdobramento spin-spin, os picos de ressonância sofrem desdobramentos, que podem ser explicados empiricamente pela regra

do $n+1$. Segundo esta regra, cada tipo de próton “sente” o número de prótons equivalentes (n) do átomo de carbono vizinho ao átomo de carbono ao qual um dado próton está ligado. Assim, seu pico de ressonância se desdobra em $(n+1)$ componentes. Esses desdobramentos obedecem ao triângulo de Pascal, conforme indicado na figura 3.16

Figura 3.16-Desdobramento dos picos de ressonância, segundo a regra do $(n+1)$.

Fonte: Adaptado (GARCIA, 2006).

O pico de ressonância dos átomos de hidrogênio do CH_2 etoxílico dos ésteres etílicos é desdobrado em um quarteto, cuja área total é a somatória dos componentes externos do quarteto (menores intensidades), que possuem uma área igual a $1/8$ da área total mais os componentes internos (maiores intensidades), que têm áreas iguais a $3/8$ da área total do quarteto, como esquematizado na figura 3.17.

Figura 3.17. Área dos desdobramentos do quarteto gerado pelos átomos de hidrogênio do CH_2 etoxílico dos ésteres etílicos.

Fonte: Adaptado (GARCIA, 2006).

Onde: Ac_1 = Área do componente 1, Ac_2 = Área do componente 2, Ac_3 = Área do componente 3 e Ac_4 = Área do componente 4.

O componente 4 (Ac_4) do quarteto dos ésteres etílicos (δ na faixa de 4,07 a 4,08 ppm) é o único pico que não sofre sobreposição de nenhum outro pico, portanto esse componente foi utilizado no cálculo da conversão da etanólise de óleos vegetais, segundo a equação.3.2.

$$\%EE = [(A_{c4} \times 8) / A_{dd+ee}] \times 100 \quad (3.2).$$

Onde:

$\%EE$ = Porcentagem de ésteres etílicos de óleos vegetais.

Ac_4 = Área do componente c_4 ;

A_{dd+ee} = Área de todos os sinais entre 4,35 e 4,05 ppm;

3.5.2 Composição em ácidos graxos

A composição em ácidos graxos foi determinada por cromatografia a gás capilar. O equipamento utilizado nas análises foi o cromatógrafo CGC AGILENT 68650 SERIES GC SYSTEM, com coluna capilar DB-23 AGILENT (50% cianopropil - metilpolisiloxano, dimensões 60m, diâmetro interno 0,25 mm, 0,25 μ m filme), nas seguintes condições de operação: fluxo de coluna = 1,00 mL/min; velocidade linear de 24 cm/s; temperatura do detector: 280°C; temperatura do injetor: 250°C; temperatura do forno: 110°C (5 min); 110 - 215°C (5°C/min), 215°C - 24 min.; gás de arraste: Hélio; volume injetado: 1,0 μ L.

A figura 3.18 ilustra o modelo de cromatógrafo empregado para analisar a composição em ácidos graxos.

Figura 3.18-Cromatógrafo a Gás Capilar CGC AGILENT 68650 SERIES GC SYSTEM.

Fonte: Adaptado (AGILENT, 2017).

O padrão utilizado para a análise cromatográfica foi o Supelco F.A.M.E. Mix, C4-C24 do fornecedor Sigma-Aldrich.

O método de análise seguiu as especificações de AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY, "Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society", quinta edição, AOCS (2009). As análises foram realizadas em duplicata, utilizando-se aproximadamente 120 mg de óleo por análise.

3.5.3 Determinação das propriedades do biodiesel

Com base na composição em ácidos graxos das três espécies de microalgas estudadas, utilizou-se o *software* Biodiesel Analyser (versão 2.2), para prever algumas propriedades dos respectivos biocombustíveis (TALEBI; TABATABAEI; CHISTI, 2014), são elas: número de cetano, índice de iodo, ponto de entupimento de filtro a frio e estabilidade à oxidação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados das extrações, foco central deste trabalho, bem como, resultados das reações de transesterificação, quantificação de ésteres de etila e composição em ácidos graxos.

As extrações do material lipídico subdividiram-se em:

- ✓ extrações da biomassa de *Chlorella minutissima* seguindo planejamento experimental completo (arranjo ortogonal L9 - Taguchi);
- ✓ extrações confirmatórias para tempo de ultrassom;
- ✓ extrações da biomassa de *Dunaliella salina* e *Nannochloropsis gaditana* (reaplicando melhores ajustes encontrados para espécie *Chlorella minutissima*) e variando o teor de umidade da biomassa.

Os lipídios totais extraídos da biomassa das três espécies de microalgas foram convertidos em ésteres de etila e quantificados via RMN¹H e a composição em ácidos graxos foi obtida por cromatografia a gás.

A figura 4.1 ilustra esquematicamente todas as etapas que compuseram o trabalho experimental.

Figura 4.1-Etapas do trabalho experimental.

Fonte: Próprio autor.

4.1 *Chlorella minutissima* - Resultados de extrações de acordo com planejamento experimental completo (L9 - Taguchi)

4.1.1 Resultados do arranjo ortogonal completo

De acordo com os fatores de entrada (parâmetros) estabelecidos para a realização das extrações, apresentados na tabela 3.2 e as condições definidas pelo arranjo ortogonal de Taguchi da tabela 3.3, construiu-se a tabela 4.1, contendo os resultados de lipídios totais em %, extraídos da biomassa da microalga *Chlorella minutissima*. Os fatores avaliados de acordo com o arranjo ortogonal de Taguchi em três níveis foram assim descritos:

- A: Umidade da biomassa (%);
- B: Proporção de solventes (clorofórmio/metanol/água) (v/v/v);
- C: Volume total de solventes (mL);
- D: Tempo de ultrassom (min);

Tabela 4.1-Resultados do teor de lipídios totais (%), em triplicata, da biomassa de *Chlorella minutissima*.

Experimento	Fatores codificados				Teor de Lipídios (%)			Média (%)
	A	B	C	D	E1	E2	E3	
1	1	1	1	1	6,4	6,3	6,6	6,4
2	1	2	2	2	15,3	15,7	15,1	15,4
3	1	3	3	3	19,8	19,7	20	19,8
4	2	1	2	3	9,1	9,5	9,4	9,3
5	2	2	3	1	15,4	15,6	15,3	15,4
6	2	3	1	2	7,3	7,4	7,6	7,4
7	3	1	3	2	12,9	12,7	12,9	12,8
8	3	2	1	3	4,2	4,6	4,4	4,4
9	3	3	2	1	9,8	10	9,6	9,8

Fonte: Próprio autor.

Verifica-se na tabela 4.1, que o teor de lipídios variou de 4,2 até 20%, sendo o menor valor médio de 4,4% e o maior valor de 19,8%. O teor mais elevado

de lipídios, em média de 19,8%, foi obtido no experimento 3, quando empregou-se biomassa com 64% de umidade, a proporção de solventes de 5,7: 3: 1 (v/v/v), o volume total de solventes de 33,0 mL e o tempo total de ultrassom de 90 minutos.

Por outro lado, o menor teor de lipídios foi obtido no experimento 8, com média de 4,4%, com biomassa de 80% de umidade, a proporção de solventes de 2: 2,5: 1 (v/v/v), o volume total de solventes de 10,0 mL e o tempo total de ultrassom de 90 minutos.

Em uma análise preliminar, esses dois resultados sugerem que existe uma influência da umidade da biomassa no processo de extração, visto que para umidade da biomassa de 64% o teor de lipídios totais extraído foi o mais elevado e para a umidade de 80% o teor de lipídios extraído foi o mais baixo.

Com relação à proporção de solventes, também existe uma influência, pois, a proporção de 5,7 de clorofórmio para 3,0 de metanol para 1,0 de água (v/v/v), resultou em um teor de lipídios totais mais elevado, enquanto que a proporção de 2,0 de clorofórmio para 2,5 de metanol para 1,0 de água (v/v/v), resultou no teor menos elevado de lipídios.

Observa-se que o volume total empregado de solventes pode ser influente no processo de extração, visto que o maior teor lipídico foi obtido quando utilizou-se 33,0 mL e o menor teor lipídico foi obtido com apenas 10,0 mL de solventes.

Em relação ao ultrassom, com a finalidade de promover a *lyse* celular, este parece não ser tão influente no processo, visto que tanto no experimento 3 como no experimento 8, empregou-se um tempo de ultrassom total de 90 minutos, no entanto, os resultados obtidos foram totalmente opostos em termos de teor de lipídios totais extraídos.

De acordo com o planejamento experimental empregando o método de Taguchi, deve-se observar a influência conjunta das quatro variáveis (umidade da biomassa, proporção de solventes, volume total de solventes e tempo de ultrassom empregado) sobre a variável resposta, que é o teor de lipídios totais extraído da biomassa. A influência ou efeito das quatro variáveis (fatores) estudadas no presente trabalho, sobre a variável resposta desejada (teor de lipídios totais) foi verificada mediante a aplicação de um software estatístico MINITAB versão 17.1.0.

Através deste software, inserindo os resultados obtidos da tabela 4.1, avaliou-se a influência dos quatro fatores em relação à média obtida para o teor de lipídios totais, e em relação à razão sinal-ruído.

4.1.2 Efeito dos fatores sobre a média da variável resposta teor de lipídios totais (%)

Com os resultados da tabela 4.1 e aplicação do software estatístico MINITAB 17.1.0, elaborou-se a figura 4.2. Esta figura representa graficamente os efeitos de cada fator em relação à variável resposta teor de lipídios totais extraídos da biomassa da microalga *Chlorella minutissima*. No presente trabalho, “quanto maior o teor lipídico obtido, melhor”.

Figura 4.2-Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a média da variável resposta teor de lipídios totais.

Fonte: Próprio autor.

Na figura 4.2 são apresentados separadamente os efeitos que cada fator exerce sobre a variável resposta teor de lipídios totais, sendo esta análise em relação à média dos valores. No eixo vertical tem-se os valores médios do teor de lipídios totais e no eixo horizontal os diferentes níveis testados, numerados de 1 até 3. Observou-se uma maior diferença de amplitude entre os níveis 1, 2 e 3 para os fatores: umidade da biomassa e volume total dos solventes.

Quanto maior a amplitude entre a reta formada pela média da variável resposta no nível baixo (1) até o nível mais alto (3) em relação à reta central (linha tracejada), maior o efeito dos fatores sobre a variável resposta. Assim, de acordo com a figura 4.2, os fatores umidade da biomassa e volume total de solventes são bastante influentes em relação à resposta teor de lipídios totais.

Pela análise deste gráfico, obteve-se que a umidade da biomassa no nível 1 (64%), a proporção de solventes no nível 3 (5,7 clorofórmio, 3,0 metanol e 1,0 água) e o volume total de solventes no nível 3 (33,0 mL) influenciaram para a obtenção de um maior teor de lipídios totais extraídos possível.

Quanto ao tempo de ultrassom, este foi o fator que se apresentou com menor amplitude em relação à média, o que significa que este fator não influenciou tanto sobre a variável resposta como os demais fatores, portanto, pode ser vantajoso utilizar o menor tempo de ultrassom, assim, economizando-se tempo de processo e energia.

4.1.3 Efeito dos fatores sobre a Razão Sinal Ruído (S/N) da variável resposta teor de lipídios totais (%)

Os resultados das extrações também foram analisados em relação à razão Sinal Ruído (S/N). A análise dos efeitos em relação à Razão S/N é importante para confirmar a influência dos fatores estudados sobre a variável resposta teor de lipídios. Além disso, na realização das extrações trabalhou-se em ordem aleatória, objetivando a ocorrência de variabilidade; assim possibilitando que o processo realizado seja robusto, mesmo sob variações causadas por fatores de ruído (fatores que não podem ser controlados).

Assim, quanto mais alta a relação sinal-ruído encontrada, menor foi o efeito do ruído sobre a medição do sinal.

Como a variável resposta desejada é o maior teor de lipídios totais extraído da biomassa, a equação proposta por Taguchi para o cálculo da relação S/N utilizada, foi a de acordo com a relação "Maior é melhor", conforme relacionado no item 2.8.1.2 pela equação 2.2, neste trabalho.

Os resultados dos efeitos dos fatores sobre a razão S/N para a variável resposta teor de lipídios totais são mostrados na figura 4.3.

Figura 4.3-Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a razão S/N para a variável resposta teor de lipídios totais em %.

Fonte: Próprio autor.

De acordo com o gráfico da figura 4.3, confirmou-se uma maior diferença de amplitude entre os níveis dos fatores umidade da biomassa e volume total dos solventes, sinalizando que o efeito desses fatores sobre a variável resposta é o mais relevante. Logo, pela diferença de amplitude entre o nível 1 até o nível 3 em relação à linha tracejada horizontal, os fatores umidade da biomassa e volume total de solventes são bastante influentes em relação à resposta teor de lipídios totais.

Em uma primeira análise deste gráfico, obteve-se que a umidade da biomassa no nível 1 (64%), a proporção de solventes no nível 3 (5,7 clorofórmio, 3,0 metanol e 1,0 água) e o volume total de solventes no nível 3 (33,0 mL) influenciaram mais fortemente para a obtenção de um teor maior possível de lipídios totais extraídos.

Quanto ao tempo de ultrassom, novamente observou-se que é o fator que se apresenta com menor amplitude em relação à linha média de razões S/N, o que significa que este fator não influencia tanto sobre a variável resposta como os demais fatores, e, portanto, tem-se aqui uma vantagem por poder empregar menores tempos de ultrassom na extração de lipídios da biomassa (50 ou 70 minutos).

Em suma, os resultados do segundo gráfico confirmaram os do primeiro, indicando que os fatores mais influentes para o teor máximo de lipídios totais foram:

umidade da biomassa de 64%, proporção de solventes de 5,7 de clorofórmio : 3,0 de metanol e 1,0 de água e volume total de solventes de 33,0 mL. Essas condições muito se aproximam das condições empregadas no experimento 3, que foi o que levou ao teor máximo de lipídios totais obtidos (em média de 19,8%). A tabela 4.2 sumariza as condições primeiramente empregadas no experimento 3 e as condições apontadas pelos gráficos dos efeitos sobre as médias e sobre as razões sinal ruído.

Tabela 4.2- Comparação dos níveis dos fatores empregados *versus* apontados pelos gráficos dos efeitos, para os efeitos sobre a extração de lipídios totais.

Condição	Fatores ou parâmetros de entrada			
	A	B	C	D
	Umidade (%)	Proporção solventes (v/v/v)	Vol. total (mL)	Tempo ultrassom (min)
Exp. 3	64	5,7 / 3,0 / 1,0	33,0	90
Gráficos	64	5,7 / 3,0 / 1,0	33,0	70

Fonte: Próprio autor.

De acordo com a tabela 4.2, houve uma divergência apenas quanto ao fator D, onde os gráficos dos efeitos indicaram o tempo de ultrassom de 70 minutos.

4.1.4 Confirmação da influência dos fatores pela ANOVA (Análise de Variância)

Para confirmar estatisticamente quais fatores exerceram influência no processo de extração de lipídios, ou seja, para ter significância estatisticamente comprovada, utilizou-se a ANOVA (Análise de Variância).

Pela ANOVA determinou-se F e p, onde os valores de F mostram se houve diferenças significativas entre as médias dos fatores estudados e os valores de p denotam o grau de confiança dos resultados encontrados, assim, quanto maiores os valores de F calculados, mais significantes são os fatores sobre o processo em estudo, e quanto menores os valores de p, maior o grau de confiança. Ainda sobre os valores de p, valores menores que 0,05 denotam um grau de confiança maior que 95%, de que os resultados encontrados são significativos.

Foi utilizado o software Statistica versão 13, para a elaboração da análise de variância (ANOVA), cujos resultados para o teor de lipídios totais estão na tabela 4.3.

Tabela 4.3-Análise da Variância para o teor de lipídios totais.

Fatores	SQF	GL	SMQF	F	p
A	109,6141	2	54,8070	1525,557	0,000000
B	39,5763	2	19,7882	550,804	0,000000
C	446,1696	2	223,0848	6209,577	0,000000
D	7,8719	2	3,9359	109,557	0,000000
Residual	0,6467	18	0,0359		

Fonte: Próprio autor.

Onde:

SQF: Soma Quadrática dos Fatores

GL: Graus de liberdade

SMQF: Soma média quadrática dos fatores

F: Teste F

p: Nível de significância.

A análise da variância apresentada na tabela 4.3 mostrou que o fator C (volume total de solventes), seguido do fator A (umidade da biomassa) são os que se apresentam mais significativos. Em seguida vem o fator B (proporção entre os solventes) e por último o fator D (tempo de ultrassom).

Assim, por meio do teste F pode-se afirmar com confiança de 99%, que os seguintes fatores: volume total de solventes, umidade da biomassa e proporção entre solventes, exercem grande influência sobre a variável resposta teor de lipídios totais.

4.1.5 Extrações confirmatórias para o fator tempo de ultrassom

Uma vez que houve uma divergência quanto ao tempo de ultrassom, na comparação entre os resultados dos gráficos com a matriz experimental, propôs-se checar os três diferentes níveis deste fator, para confirmar se a aplicação de um tempo diferente daquele encontrado experimentalmente (conforme a tabela 4.2) pode alterar o teor de lipídios totais extraído.

Com este objetivo foram realizados experimentos confirmatórios, utilizando um segundo lote de biomassa de *Chlorella minutissima*, onde empregou-se umidade da biomassa de 64%, proporção de clorofórmio: metanol e água em 5,7: 3,0: 1,0, e volume total de solventes em 33,0 mL, mantendo esses parâmetros fixos e variou-se os tempos de ultrassom.

A tabela 4.4 sumariza os resultados destes experimentos.

Tabela 4.4-Experimentos confirmatórios variando somente o tempo de ultrassom nas extrações lipídicas da biomassa de *Chlorella minutissima*.

Experimento	Tempo de ultrassom (min)	Teor de Lipídios (L) (%)			Média (%)
		L1	L2	L3	
1	90	27,0	27,4	26,8	27,1
2	70	28,2	28,2	27,8	28,1
3	50	28,0	27,8	27,9	27,9

Fonte: Próprio autor.

Os resultados dos experimentos comprovaram que a variação do tempo de ultrassom não influenciou significativamente sobre o teor de lipídios; observando-se os valores médios das triplicatas, o teor de lipídios totais variou de 27,1% a 28,1% e não houve diferença significativa entre os teores de lipídios para os tempos de 50 e 70 minutos.

4.1.6 Influência do volume total e da proporção entre os solventes

Diferentes autores verificaram em seus trabalhos a influência do volume total de solventes utilizado, relacionado à proporção entre estes, na obtenção de ótimos resultados na extração de lipídios da biomassa microalgal.

Vários autores testaram diferentes proporções da mistura de clorofórmio e metanol, incluindo ou não adição de água, para a extração de lipídios da biomassa de diferentes microalgas.

A proporção de 1: 1: 0,3 (clorofórmio: metanol e água) foi recomendada por Ryckebosch, Muylaert e Foubert, (2012) que utilizaram 100 mg de biomassa liofilizada e um volume total de 18,4 mL para a extração de lipídios. Lee, Yoon e Oh, (1998) recomendaram a extração de lipídios da microalga *Botryococcus braunii* empregando uma proporção clorofórmio:metanol (2:1), em um volume total de 30 mL, sendo esta mais efetiva em comparação com a extração por outras misturas de solventes, tais como: hexano:isopropanol (1:1) e diclorometano:etanol (1:1).

Chatsungnoen e Chisti (2016) otimizaram a proporção original de solventes do método de Bligh e Dyer e obtiveram o melhor resultado em lipídios totais com 5,7 de clorofórmio, 3,0 de metanol e 1,0 de água, em um volume total de 29 mL da mistura para 1 g de biomassa da microalga *Nannochloropsis salina*. Estes autores testaram diversas

proporções de misturas de clorofórmio, metanol e água e verificaram que o teor de lipídios extraído aumentou com o aumento do volume de clorofórmio na mistura, até que chegaram à proporção ideal. Em seus estudos ficou comprovada estatisticamente a influência dos volumes de solvente na efetividade da extração.

Balasubramanian, Yen Doan e Obbard (2013) estudaram os fatores que afetam a extração lipídica das células da microalga marinha *Nannochloropsis sp* e constataram que os solventes clorofórmio e metanol foram os melhores para a obtenção de um maior rendimento em lipídios totais, empregando 1 a 2 g de biomassa para 50 mL da mistura de solventes.

Conforme destacam Du et al. (2015), nos sistemas de cosolventes, como o que está em estudo no presente trabalho, o álcool, devido à sua polaridade, rompe as ligações de hidrogênio e forças eletrostáticas entre os lipídios polares associados à membrana celular e às proteínas, tornando a parede celular porosa, assim possibilitando que o solvente menos polar (o clorofórmio) penetre na célula e capture os lipídios neutros hidrofóbicos. Assim, o emprego de um solvente não polar em conjunto com um solvente polar conduz a rendimentos muito mais elevados de extração de lipídios, que quando se utiliza somente solventes não polares.

Mediante diversos autores e conforme confirmado pelo presente estudo, verificou-se que o volume total e a proporção dos solventes devem ser considerados conjuntamente, pois estes influenciam fortemente no rendimento do processo de extração, visto que, no sistema ternário formado, cada um dos solventes exerce uma função específica, portanto é importante o equilíbrio entre o volume de solventes e a melhor proporção na mistura.

4.1.7 Influência da umidade da biomassa

De acordo com Bligh e Dyer (1959), a umidade contida no substrato influencia no processo de extração dos lipídios. Em seu artigo original, Bligh e Dyer (1959) registraram que seria imperativo um conteúdo de 80% de umidade nas amostras para extrair o material lipídico, caso contrário o rendimento da extração seria comprometido, sendo necessário acrescentar água até completar 80% de umidade. Contudo, o método de Bligh e Dyer foi desenvolvido para a extração de lipídios de tecido de peixe, não sendo verificado para a extração de lipídios de outros substratos. Este método foi reestudado por Chatsungnoen e

Chisti (2016), que o adaptaram e extraíram os lipídios totais da microalga *Nannochloropsis salina* contendo 72% de umidade na biomassa, obtendo um teor de lipídios totais de 45%.

Diversos autores testaram o método de Bligh e Dyer modificado em comparação com o método de Folch, que emprega hexano, para as microalgas *Nannochloropsis oculata* e *Dunaliella salina*; utilizando a biomassa úmida com aproximadamente 80% de água, obtiveram respectivamente 23,78% e 4,03% de lipídios totais por Bligh e Dyer, enquanto que com o método de Folch obtiveram 8,31% e 1,90% (DEJOYE TANZI; ABERT VIAN; CHEMAT, 2013).

Alguns autores estudaram e compararam diferentes métodos de extração por solventes e por outras tecnologias, como a extração por fluido supercrítico, aplicados à extração de lipídios da biomassa de microalgas, e destacaram que o rendimento da extração de lipídios sempre foi superior a partir da biomassa microalgal úmida, em relação à biomassa seca (DU et al., 2015), além de o custo destas tecnologias ser muito alto, impactando negativamente sobre o custo do processo e dos produtos finais (CHATSUNGNOEN; CHISTI, 2016).

No presente estudo trabalhou-se com três diferentes teores de umidade na biomassa (64, 72 e 80%). Em concordância com outros autores, este estudo encontrou teores lipídicos mais elevados quando se empregou biomassa úmida que quando se utilizou a biomassa seca. A tabela 4.5 relaciona a média dos teores lipídicos obtidos variando-se a umidade da biomassa e também para a biomassa seca para as três espécies marinhas: *Chlorella minutissima*, *Dunaliella salina* e *Nannochloropsis gaditana*.

Tabela 4.5-Resultados de extrações com diferentes umidades de biomassa.

Espécie	Umidade biomassa (%)			
	64	72	80	0
<i>Chlorella minutissima</i>	28,1	25,8	23,7	11,9
<i>Dunaliella salina</i>	12,5	11,4	9,2	8,7
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	17,2	15,4	13,3	11,1

Fonte: Próprio autor.

Os resultados indicam, para as três espécies estudadas, que o teor de lipídios totais extraído foi maior quando foi utilizada biomassa com 64% de umidade. Para as três espécies, o teor de lipídios diminuiu à medida que a umidade da biomassa aumentou

respectivamente para 72 e 80%. Também foi constatado um teor lipídico inferior nas extrações com biomassa seca (desidratada).

Em seu trabalho com a cianobactéria *Trichormus sp*, Rós et al. (2017) também verificaram o efeito da umidade no processo de extração de lipídios das células microbiais, avaliando quatro diferentes teores de umidade (10, 20, 35 e 45%) e constataram que o teor lipídico mais elevado foi obtido com 45% de umidade na biomassa. Embora as cianobactérias sejam um grupo diverso das microalgas, há diversas similaridades entre esses microorganismos; os lipídios produzidos pelas cianobactérias acumulam-se nas membranas tilacóides; o gênero *Nannochloropsis* possui paredes polissacarídicas com várias bandas de lamelas fotossintéticas, contendo, cada uma, três tilacóides por banda (LIU; SONG; QIU, 2017a). Portanto, para ambos os microorganismos, um processo de extração deve ser capaz de romper as paredes celulares e membranas, para a penetração dos solventes e a captura de lipídios.

Conforme Rós et al., (2017), a água desempenha um papel significativo nos rendimentos de óleos extraídos das células microbiais, uma vez que, a camada de água formada sobre a parede das células torna-se um meio que contribui para a ruptura celular, por facilitar a propagação da energia liberada pelo rompimento de bolhas formadas na cavitação acústica, como foi utilizado no presente trabalho, pelo uso de ultrassom. Consequentemente isto facilita a penetração de solventes e o sequestro dos lipídios.

De acordo com vários autores, a água tem também outra função relevante no processo de extração. As paredes das células são mais rígidas quando desidratadas que quando contém certa umidade, dificultando a penetração dos solventes e a consequente saída do complexo lipídio-solvente para fora das células. A água dissolve a estrutura de polissacarídeos contida na biomassa, o que aumenta a permeabilidade dos solventes através da parede celular, melhorando a efetividade da extração lipídica (COHEN ZWI, 2012; HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

Por outro lado, observou-se que para a biomassa contendo 72 e 80% de umidade, a efetividade da extração diminuiu, ou seja, o teor de lipídios totais extraídos foi menor; baseado no método original de Bligh e Dyer, em uma primeira etapa do processo de extração, um sistema miscível é formado entre a água contida no tecido (biomassa) e uma proporção definida de clorofórmio e metanol e numa segunda etapa, com a diluição por adição de mais clorofórmio e água, o homogeneizado é separado em duas camadas distintas, sendo que a camada de clorofórmio contém os lipídios (BLIGH; DYER, 1959);

uma possível explicação para a diminuição dos rendimentos está em que esse equilíbrio foi afetado, assim, o excesso de água pode ser um fator inibitório, funcionando como uma barreira que impede a captura e consequente migração dos lipídios para a camada orgânica, uma vez que há lipídios polares, como fosfolipídios, que tem maior afinidade pelos solventes de maior polaridade como o metanol e a água, e podem concentrar-se nessa fase, quando existe água em excesso no sistema.

4.1.8 Influência do tempo de ultrassom

De acordo com os resultados da tabela 4.4, o teor de lipídios da biomassa de *Chlorella minutissima* não variou significativamente em função da variação do tempo de ultrassom. A tabela 4.6 resume os resultados das médias das extrações, realizadas em triplicata, variando somente o tempo de ultrassom e mantendo os demais parâmetros inalterados (64% de umidade da biomassa, volume total de solventes de 33 mL e proporção de 5,7: 3,0: 1,0 de clorofórmio/metanol/água) para as três espécies estudadas.

Tabela 4.6-Resultados de extrações com diferentes tempos de ultrassom.

Espécie	Tempo de ultrassom (min)		
	50	70	90
<i>Chlorella minutissima</i>	27,9	28,1	27,1
<i>Dunaliella salina</i>	11,3	12,5	12,1
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	16,2	17,2	17,5

Fonte: Próprio autor.

Para a espécie *Dunaliella salina* o teor lipídico com o tempo de 70 minutos foi um pouco maior que em comparação aos outros dois tempos, de forma similar ao que ocorreu para a espécie do gênero *Chlorella*, enquanto que para a espécie *Nannochloropsis gaditana*, com o tempo de ultrassom de 90 minutos o teor lipídico foi ligeiramente superior aos demais. Ainda assim, os valores encontrados para cada um dos diferentes tempos não são tão diferentes entre si, demonstrando que este fator pouco influencia no processo de extração, ao menos dentro do intervalo estudado.

Em seus estudos de extração de lipídios totais de diferentes espécies de microalgas marinhas tais como *Nannochloropsis oculata* e *Chlorella vulgaris*, diversos autores confirmaram que os melhores rendimentos na extração foram obtidos com a

utilização do ultrassom durante o processo (SANTOS et al., 2015). Sob a irradiação ultrassônica, microbolhas são criadas, sob pressão negativa suficientemente alta. Uma vez criadas, as bolhas crescem durante o período de pressão negativa e encolhem durante o período de pressão positiva. A expansão e a compressão causam pulsação constante ou colapso violento de microbolhas. Quando o colapso ocorre próximo às células, causa o rompimento da parede celular, facilitando a liberação dos lipídios. Ao mesmo tempo, devido à diminuição da viscosidade dos solventes pelo aumento da temperatura, a penetração e transferência de massa são facilitadas. Este efeito é muito mais forte a baixas frequências (18-40 kHz). No caso de células secas, o ultrassom acelera sua reidratação, o que também foi empregado no presente trabalho. De acordo com os estudos de Converti et al., (2009), após 6 horas de extração assistida por ultrassom, o melhor resultado para a espécie *Chlorella vulgaris*, a partir da biomassa seca, foi de 24,5%, empregando a mistura clorofórmio:metanol (2:1).

Outros autores, porém, otimizaram um procedimento analítico para extração de lipídios totais com foco sobre a mistura de solventes, o pré-tratamento e o método de rompimento de células, onde as espécies *Nannochloropsis salina* e *Chlorella vulgaris* foram estudadas, dentre outras, e concluíram que nenhuma diferença significativa foi detectada nos rendimentos de extração, entre os diferentes métodos aplicados para rompimento das células, incluindo o ultrassom (RYCKEBOSCH; MUYLAERT; FOUBERT, 2012). Tal conclusão está em consonância com o presente trabalho, uma vez que não se detectou diferenças significativas nos teores lipídicos ao variar-se os tempos de ultrassom aplicados.

Ryckenbosch, Muylaert e Foubert, (2012) atestaram também que a quantidade de lipídios extraídos da biomassa microalgal é altamente dependente dos solventes e da mistura utilizada, ou seja, os solventes são eficientes ao penetrarem a parede celular, fatores confirmados como muito influentes no presente trabalho.

Foi realizada uma segunda extração nas biomassas residuais, com a finalidade de avaliar a efetividade do processo de extração empregado. Os resultados das médias das triplicatas foram 1,1%, 1,2% e 2,0% respectivamente para *Chlorella minutissima*, *Dunaliella salina* e *Nannochloropsis gaditana*. Estes resultados demonstram que as extrações foram bem sucedidas, dada a baixa percentagem de lipídios restante na biomassa residual. Cada espécie de microalga possui diferentes estruturas de paredes celulares e o gênero *Nannochloropsis* possui uma parede externa trilaminar, bastante resistente, o que

pode explicar um teor residual de lipídios um pouco mais elevado na segunda extração (LIU; SONG; QIU, 2017a)

4.2 Conversão dos lipídios em ésteres de etila

Este trabalho não teve como objetivo principal estudar a etapa de síntese do biodiesel, no entanto, tem relevância demonstrar que os lipídios extraídos das microalgas marinhas estudadas tem potencial para a produção de biodiesel.

Empregando o material lipídico obtido sob as melhores condições (64% de umidade da biomassa, proporção de clorofórmio:metanol: água 5,7:3,0:1,0, volume total de solventes de 33 mL e tempo de ultrassom de 70 minutos), foram seguidas as prescrições conforme o item 3.4.1.1 para a conversão dos lipídios em ésteres de etila. Após a reação de transesterificação, os ésteres de etila foram quantificados segundo a técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H), descrita em 3.4.1.2.

Através de síntese por via química e cálculos baseados no espectro de ressonância magnética nuclear de prótons (RMN¹H), comprovou-se a conversão dos lipídios em ésteres de etila, para as três espécies estudadas neste trabalho. Conforme demonstrado na figura 4.4, nos espectros de RMN¹H, os picos característicos dos ésteres de etila formam o quarteto (sequencia de quatro picos agrupados) no intervalo de 4,05 a 4,35 ppm.

Figura 4.4-Espectros RMN¹H dos ésteres etílicos de *Chlorella minutissima* (a), *Dunaliella salina* (b) e *Nannochloropsis gaditana* (c).

Fonte: Próprio autor.

A tabela 4.7 resume as conversões em ésteres etílicos obtidos por transesterificação a partir do óleo extraído da biomassa úmida.

Tabela 4.7-Conversões em ésteres etílicos obtidos por transesterificação.

Espécie	Conversões em ésteres etílicos (%)
<i>Chlorella minutissima</i>	94,5
<i>Dunaliella salina</i>	90,4
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	94,4

Fonte: Próprio autor.

Loures (2016) obteve uma conversão de 96,5% utilizando um banho de ultrassom, no qual as frações lipídicas foram solubilizadas em etanol (razão molar álcool: extrato lipídico, 30:1) na presença de 10% de H₂SO₄ como catalisador à temperatura de 60°C por 6h. Lemões (2011) na transesterificação via catálise ácida, obteve conversões na faixa de 75,4 a 96,7% com a microalga *Chlorella sp.*

De acordo com a especificação da ANP o teor de éster para o biodiesel é especificado em 96,5% (ANP, 2014) e, conforme diversos autores, para a obtenção desse teor, o tempo de reação de no mínimo 6-8 horas via catálise ácida é necessário, enquanto que em reações empregando-se enzimas como catalisador o tempo de reação pode alcançar até 96 horas para uma conversão adequada (SILVA et al., 2014). Portanto, os resultados apresentados neste trabalho (tabela 4.7) demonstram que os óleos extraídos das três espécies de microalgas marinhas tem potencial para a conversão em biodiesel, dados os bons rendimentos obtidos em um menor tempo de conversão.

4.3 Composição em ácidos graxos das três espécies de microalgas

A composição em ácidos graxos do material lipídico das três espécies de microalgas foi analisada por cromatografia a gás; os resultados estão sumarizados na tabela 4.8.

Tabela 4.8- Composição em ácidos graxos da biomassa das espécies estudadas.

Ácido graxo		<i>Chlorella minutissima</i>	<i>Dunaliella salina</i>	<i>Nannochloropsis gadicana</i>
Saturado				
C12:0	láurico	0,19	0,10	0,20
C14:0	mirístico	0,52	0,43	0,69
C15:0	pentadecanóico	0,13	0,08	0,11
C16:0	palmítico	32,37	28,73	35,40
C17:0	margárico	0,23	0,17	0,18
C18:0	esteárico	3,75	3,52	5,47
C20:0	araquídico	4,02	3,65	2,78
C22:0	erúcico	0,31	0,20	0,17
C24:0	lignocérico	0,36	0,21	0,20
Total		41,87	37,10	45,20
Monoinsaturado				
C16:1	palmitoléico	3,71	3,08	3,44
C18:1 (ω -9)	oleico	8,3	12,06	18,26
C20:1	eicosenóico	0,08	0,08	0,09
Total		12,1	15,23	21,79
Poli-insaturado				
C18:2 (ω -6)	linoléico	22,15	30,02	19,71
C18:3 Trans (ω -3)	linolenelaídico	1,22	1,61	0,64
C18:3 (ω -3)	α -linolênico	22,6	15,99	12,58
C20:5	(EPA)	0,11	0,06	0,08
	eicosapentaenoico			
Total		46,04	47,67	33,01

Fonte: Próprio autor.

De acordo com o perfil organizado na tabela 4.8, foram identificados 16 ácidos graxos com tamanho de cadeia variando entre C12 a C20, com diferentes graus de insaturação.

A espécie *Chlorella minutissima* apresentou em sua composição de ácidos graxos aproximadamente 42% de ácidos graxos saturados, dentre os quais destaca-se o ácido palmítico (32%), e em menor proporção os ácidos araquídico (4%) e esteárico (3,75%). O restante da composição distingue-se entre os ácidos monoinsaturados e poli-insaturados.

Dentre os monoinsaturados, o ácido oleico (8,3%) constitui-se em maior proporção, seguido pelo palmitoléico (3,7%). O total de ácidos monoinsaturados para esta espécie foi de 12%. O total de ácidos poli-insaturados foi de aproximadamente 46%, onde os ácidos linoléico (22%) e α -linolênico (22,6%) totalizaram 44,6%.

O material lipídico da espécie *Dunaliella salina* apresentou em sua composição 37% de ácidos graxos saturados, sendo o ácido palmítico (28,7%) o de maior teor nesse grupo, seguido pelos ácidos araquídico (3,7%) e esteárico (3,5%). Os ácidos graxos monoinsaturados totalizaram 15,2%, sendo o ácido oleico (18,3%) de maior teor, seguido pelo palmitoléico (3,1%). O total de ácidos graxos poli-insaturados foi de 47,7% sendo que os ácidos linoléico (30%) e α -linolênico (16%) corresponderam a um total de 46% neste grupo.

Quanto à espécie *Nannochloropsis gaditana*, os ácidos saturados totalizaram 45%, sendo os ácidos palmítico (35,4%), esteárico (5,5%) e araquídico (2,8%) presentes em maior porcentagem. Os ácidos graxos monoinsaturados totalizaram 22% com o ácido oleico (18,3%) e o ácido palmitoléico (3,4%) em maior quantidade. Os ácidos graxos poli-insaturados totalizaram 33%, com destaque para o ácido linoléico (19,7%) e o ácido α -linolênico (12,6%).

A figura 4.5 ilustra os principais ácidos graxos de cada grupo para as três linhagens de microalgas.

Figura 4.5-Principais ácidos graxos e concentrações.

Fonte: Próprio autor.

De maneira geral, os ácidos sintetizados em maior quantidade pelas três espécies foram o ácido palmítico (C16:0), o ácido oleico (C18:1), e no grupo dos poli-insaturados, o ácido linoleico (C18:2), e o ácido α -linolênico (C18:3).

Quanto aos totais de ácidos graxos, os saturados totalizaram porcentagens variando de 37 a 45%, os monoinsaturados foram sintetizados em porcentagens bem menores, de 12 a 22% e os poli-insaturados variaram de 33 a 47,6%. O cultivo das três espécies empregou o meio f/2 de Guillard, sem sílica. Houve aeração e iluminação constantes durante todo o período de crescimento das células até a sua colheita, e não houve adição de dióxido de carbono gasoso ou por outra fonte, sendo o dióxido de carbono utilizado para a fotossíntese somente o absorvido do meio ambiente no laboratório.

4.4 Comparação dos perfis de ácidos graxos – outras espécies/meios de cultivo

A tabela 4.9 mostra a composição em ácidos graxos para diferentes espécies do gênero *Chlorella*, comparando os resultados deste trabalho com o de outros autores.

Tabela 4.9- Composição em ácidos graxos de diferentes espécies de *Chlorella*.

Ácidos graxos	¹ <i>Chlorella minutissima</i>	² <i>Chlorella minutissima</i>	³ <i>Chlorella sp</i>	⁴ <i>Chlorellas p</i>	⁵ <i>Chlorella salina</i>
Saturados					
C6:0	-	-	0,12	-	-
C8:0	-	-	8,22	-	-
C10:0	-	-	3,90	-	-
C12:0	0,19	0,16	17,69	-	-
C14:0	0,52	0,95	6,25	2,22	-
C15:0	0,13	0,21	0,31	-	-
C16:0	32,37	57,1	20,69	18,42	22,3
C17:0	0,23	0,15	0,23	-	-
C18:0	3,75	5,92	1,04	1,73	8,53
C20:0	4,02	3,31	0,41	-	-
C22:0	0,31	0,34	0,48	-	-
C24:0	0,36	0,23	0,72	-	-
Total	41,87	68,38	60,06	22,37	30,83
Monoinsaturados					
C16:1	3,71	2,55	4,17	-	3,92
C18:1 (ω-9)	8,3	26,30	27,17	11,11	14,89
C20:1	0,08	0,35	0,27	0,17	1,6
Total	12,1	29,2	31,61	11,28	20,41
Poli-insaturados					
C16:3	-	-	-	13,46	-
C18:2 (ω-6)	22,15	1,89	3,93	24,70	11,58
C18:3 Trans	1,22	-	-	-	-
C18:3 (ω-3)	22,6	0,22	4,33	28,19	30,85
C20:5	0,11	-	-	-	-
Total	46,04	2,11	8,26	66,35	42,43
Referência	Este trabalho	LOURES, (2016)	AMARAL et al., (2015)	PRATOOMYOT ; SRIVILAS; NOIRAKSAR, (2005)	TALEBI et al., (2013)

Meios de cultivo: ¹ f/2 sem adição de CO₂, ² f/2 com 2% CO₂, ³ f/2 com 5% CO₂, ⁴ f/2 sem adição de CO₂, ⁵ Moh 202, empregando bicarbonato de sódio como fonte de carbono.

De forma geral, observa-se que a *Chlorella minutissima* cultivada de acordo com as condições do presente trabalho apresentou um teor de ácido palmítico (C16:0) superior em relação aos encontrados por outros autores relacionados na tabela 4.9, exceto em comparação à microalga cultivada por Loures (2016). Contudo, observa-se que o total de ácidos monoinsaturados deste trabalho foi bem menor quando comparado à maioria dos autores, porém, foi similar à composição de Pratoomyot; Srivilas e Noiraksar (2005).

Por outro lado, o total de ácidos graxos poli-insaturados, sobretudo quando se observa as porcentagens de ácido linoleico e α -linolênico, é bastante significativo, em comparação com os encontrados pelos demais autores, assemelhando-se bastante à composição de Pratoomyot; Srivilas e Noiraksar (2005), que também empregaram o meio f/2 sem adição de dióxido de carbono.

A espécie *Chlorella salina* foi cultivada sob o meio Moh 202, empregando bicarbonato de sódio como fonte de carbono (TALEBI et al., 2013), as demais espécies do gênero foram cultivadas sob o meio f/2, contudo, excetuando-se este trabalho e o de Pratoomyot e colaboradores, os demais autores adicionaram CO₂ gasoso durante o cultivo em diferentes proporções, cujo teor variou de 2 a 5% (AMARAL et al., 2015; LOURES, 2016).

Tsuzuki e colaboradores cultivaram a espécie *Chlorella vulgaris* sob duas condições distintas, injeção de ar (baixo teor de CO₂) e ar enriquecido com 2% de CO₂ (alto teor de CO₂) e verificaram que o grau de insaturação dos ácidos graxos foi maior nas células cultivadas somente sob ar, enquanto que houve a formação de mais ácidos graxos saturados sob as células cultivadas com 2% de CO₂. Adicionalmente, foi observado que quando as células foram transferidas do meio sob baixo CO₂ para a condição de CO₂ elevado, a quantidade total de ácidos graxos saturados (palmítico, esteárico e oleico) aumentou significativamente (TSUZUKI et al., 1990).

Esta constatação está em acordo com o presente trabalho, que evidenciou a síntese de maior quantidade de ácidos graxos poli-insaturados e não injetou CO₂ gasoso ao meio de cultivo, ao passo que os outros autores, que cultivaram sob atmosfera contendo 2% e 5% de CO₂ obtiveram menos ácidos graxos poli-insaturados e insaturados. A adição de bicarbonato de sódio como fonte de carbono, em substituição ao dióxido de carbono, de acordo com Talebi et al., (2013) favoreceu a formação do ácido α -linolênico (C18:3), em quantidade similar a encontrada no presente trabalho, porém, trata-se de uma outra espécie do gênero em um meio de cultivo diferente.

A influência do efeito da intensidade de luz e do dióxido de carbono sobre os lipídios e a composição em ácidos graxos também foi estudada por Cuellar-Bermudez et al., (2015). Estes autores variaram o fornecimento de CO₂ de 1 a 5% e verificaram que a cianobactéria *Synechocystis sp.* PCC6803 apresentou os teores mais elevados de ácidos graxos saturados, dentre eles os ácidos palmítico, palmitoléico e oleico (C16:0, C16:1 e C18:1) quando cultivada sob atmosfera contendo 3% de CO₂, enquanto os ácidos graxos poli-insaturados (essenciais) formaram-se em maior quantidade sob condições opostas, isto é, baixo teor de CO₂ no meio (CUELLAR-BERMUDEZ et al., 2015). Nestas condições, o pH do meio aumentou proporcionalmente, uma clara resposta de atividade fotossintética, que favoreceu a formação de ácidos graxos saturados e monoinsaturados. Tais resultados demonstram que alterações na composição em ácidos graxos são realmente dependentes da concentração de dióxido de carbono durante o cultivo.

A tabela 4.10 demonstra a composição em ácidos graxos para a espécie *Dunaliella salina*, comparando este trabalho com os de diferentes autores.

Tabela 4.10- Comparação da composição em ácidos graxos da espécie *Dunaliella salina* entre diferentes autores.

Ácido graxo	<i>Dunaliella salina</i> ¹	<i>Dunaliella salina</i> ²	<i>Dunaliella salina</i> ³	<i>Dunaliella salina</i> ⁴
Saturado				
C8:0	-	-	3,69	-
C10:0	-	-	2,43	-
C12:0	0,10	-	6,87	-
C14:0	0,43	-	2,77	0,75
C15:0	0,08	-	4,44	-
C16:0	28,73	18,82	9,82	26,76
C17:0	0,17	-	-	-
C18:0	3,52	8,02	3,07	-
C20:0	3,65	-	1,67	-
C22:0	0,20	-	-	-
C24:0	0,21	-	-	-
Total	37,10	26,84	34,76	27,51
Monoinsaturado				
C16:1	3,08	1,38	14,73	1,44
C18:1 (ω-9)	12,06	23,26	8,01	6,70
C20:1	0,08	3,47	-	-
C22:1	-	-	9,44	-
Total	15,23	28,11	32,18	8,14
Poli-insaturado				
C18:2 (ω-6)	30,02	10,42	4,85	19,46
C18:3 Trans	1,61	-	-	-
C18:3 (ω-3)	15,99	33,53	12,85	44,49
C20:5	0,06	-	-	-
C22:6	-	-	15,36	-
Total	47,67	43,95	33,06	63,95
Referência	Este trabalho	TALEBI et al., (2013)	FAKHRY; MAGHRABY, (2013)	SANTHANAM et al; (2012)

Meios de cultivo: ¹ f/2 sem adição de CO₂, ² Moh 202, empregando bicarbonato de sódio como fonte de carbono, ³ Mueller Hinton (MH), ⁴ Conway com adição de sulfato de amônio, fosfato e ureia na proporção 10:1:1.

Conforme a tabela 4.10, a espécie *Dunaliella salina* cultivada para este trabalho apresentou um teor de ácido palmítico (C16:0) superior aos demais perfis. O teor de ácido oleico localizou-se dentro da média em relação aos dos demais trabalhos e, no grupo dos ácidos graxos poli-insaturados, o teor de ácido linoleico (C18:2) foi bastante significativo. Os totais de ácidos saturados e ácidos poli-insaturados foram significativos em comparação aos dos demais autores.

Os diferentes autores cultivaram a espécie *Dunaliella salina* empregando meios de cultivo diferentes do utilizado no presente trabalho (f/2). O meio Moh 202, utilizado por Talebi e colaboradores, contém em sua composição nitrato de potássio, fosfato de potássio, cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, cloreto de sódio, bicarbonato de sódio e vitaminas B1 e B12, sendo que uma quantidade adicional de cloreto de sódio foi adicionada para um melhor desenvolvimento desta espécie de microalga, devido à sua boa adaptação a meios contendo elevada salinidade (TALEBI et al., 2013). Há diferenças significativas entre este meio e o f/2, que emprega outra composição de sais, dentre estes: cloreto férrico, cloreto de manganês, molibdato de sódio, cloreto de cobalto, sulfato de cobre e vitamina B7, não utilizada no meio Moh 202 (conforme referenciado na tabela 3.1).

O meio de cultivo Mueller Hinton (MH), utilizado por Fakhry e colaboradores, contém em sua composição extrato de carne, hidrolisado ácido de caseína, amido e agar (agente solidificante) (FAKHRY; MAGHRABY, 2013).

O meio de cultivo Conway é bastante semelhante em sua composição ao meio f/2; as diferenças estão nas quantidades de alguns sais e outros compostos diversos, visto que o meio Conway utiliza cloreto de zinco, molibdato de amônio e ácido bórico e não utiliza a vitamina B7, somente B1 e B12 (LANANAN et al., 2013).

De acordo com Talebi et al., (2013), o meio de cultivo utilizado favoreceu a síntese de um elevado teor de lipídios pela microalga *Dunaliella salina*, em comparação com outras linhagens que foram cultivadas pelos autores empregando o mesmo meio, por exemplo, do gênero *Chlorella*. Contudo, a maioria das espécies cultivadas apresentaram um pico para os ácidos palmítico (C16:0), ácido oleico (C18:1) e ácido linolênico (C18:3), segundo esses autores.

Fakhry e colaboradores especificaram a composição em ácidos graxos para a espécie *Dunaliella salina* em dois grupos, ácidos saturados e ácidos insaturados. Desta forma, concluíram que o meio de cultivo empregado (MH) favoreceu a formação de ácidos insaturados (65,24%) em comparação com os saturados (34,76%). Segundo esses autores,

os perfis de ácidos graxos das linhagens são fortemente influenciadas pelas condições de cultivo, temperatura e iluminação (FAKHRY; MAGHRABY, 2013).

O meio de cultivo (Conway) empregado por Santhanam et al., (2012) foi escolhido por estes autores que o avaliaram como o mais adequado ao cultivo desta espécie, visando alcançar a maior densidade celular e produtividade em biomassa. Como resultado, a espécie *Dunaliella salina* apresentou em sua composição em ácidos graxos elevada porcentagem de ácidos graxos poli-insaturados, em especial os ácidos linoleico (C18:2) e α -linolênico (C18:3).

O efeito do meio de cultivo Conway e do meio de cultivo f/2 sobre o crescimento de diferentes espécies de microalgas foi estudado por Josuh e colaboradores, que constataram que a reprodução das células ocorreu por um período mais prolongado sob efeito do meio de cultivo f/2 (LANANAN et al., 2013).

De acordo com os dados da tabela 4.10, pela comparação da composição em ácidos graxos do presente trabalho (sob meio f/2) com o de Santhanam et al., (2012) , meio de cultivo Conway, observa-se uma similaridade nas quantidades de ácido palmítico (C16:0) sintetizadas, um total de ácidos graxos monoinsaturados menor que os ácidos saturados e poli-insaturados e uma inversão quanto aos teores de ácidos linoleico e α -linolênico, ou seja, o meio f/2 favoreceu a síntese de uma maior quantidade de ácido linoleico, enquanto que o meio Conway favoreceu maior quantidade de ácido α -linolênico.

A tabela 4.11 descreve a composição em ácidos graxos para a terceira espécie estudada, *Nannochloropsis gaditana*, em comparação com outras espécies do gênero.

Tabela 4.11- Comparação entre diferentes espécies do gênero *Nannochloropsis* quanto à composição em ácidos graxos.

Ácido graxo	<i>N. gaditana</i> ¹	<i>N. gaditana</i> ²	<i>N. oceanica</i> ³	<i>N.sp</i> ⁴
Saturado				
C12:0	0,20	-	1,2	-
C14:0	0,69	2,7	16,9	5,4
C15:0	0,11	-	-	-
C16:0	35,40	39,2	17,2	21,6
C17:0	0,18	-	-	-
C18:0	5,47	3,1	1,8	0,2
C20:0	2,78	-	-	-
C22:0	0,17	-	-	-
C24:0	0,20	-	-	-
Total	45,20	45,0	37,10	27,2
Monoinsaturado				
C16:1	3,44	24,1	18,2	23,0
C18:1 (ω-9)	18,26	14,2	4,1	1,2
C20:1	0,09	-	0,5	-
Total	21,79	38,3	22,8	24,2
Poli-insaturado				
C18:2 (ω-6)	19,71	4,7	9,7	2,9
C18:3 Trans	0,64	-	-	-
C18:3 (ω-3)	12,58	1,6	0,5	-
C20:5	0,08	4,7	23,4	43,2
Total	33,01	11,0	33,6	46,1
Referência	Este trabalho	MA et al., (2016)	PATIL et al., (2007)	HULATT et al., (2017)

Meios de cultivo: ¹ f/2 sem adição de CO₂, ² BG11, em água do mar, com adição de 2% CO₂, ³ Z8, em água do mar, com adição de CO₂ mantendo pH entre 7,5 – 8,0, ⁴ f/2 com adição de 1% de CO₂, pH alcalino.

De acordo com a tabela 4.11, observa-se que a espécie *Nannochloropsis gaditana* cultivada de acordo com o meio f/2 sintetizou quantidade de ácidos saturados similar à espécie cultivada por Feng Chen e colaboradores, que utilizaram o meio e cultivo BG11 com adição de 2% de dióxido de carbono ao meio. O total em ácidos graxos saturados

superou os das outras espécies do gênero, *Nannochloropsis oceanica* e *Nannochloropsis sp* (HULATT et al., 2017; MA et al., 2016; PATIL et al., 2007).

Quanto aos ácidos monoinsaturados, houve maior concentração quando se empregou o meio de cultivo BG11 com pH controlado e adição de 2% de CO₂, observando-se que sob o meio f/2, a linhagem sintetizou maior quantidade de ácido oleico (C18:1), enquanto que sob o meio BG11 houve diminuição significativa de ácido oleico e, por outro lado, aumento significativo da síntese de ácido palmitoléico (C16:1). Sob o meio f/2, houve aumento significativo de ácidos poli-insaturados na composição relacionada à *Nannochloropsis gaditana*, em comparação às demais linhagens.

De forma geral o meio de cultivo BG11 assemelha-se ao meio f/2, as principais diferenças estão nas proporções de alguns sais, além de não serem utilizadas vitaminas do complexo B. O meio Z8 que foi empregado por Patil et al., (2007) no cultivo da espécie *N. oceanica* é bastante utilizado para o cultivo de cianobactérias e contém uma composição mais diversificada de sais minerais (STAUB et al., 1961).

Para os cultivos relacionados às espécies do gênero *Nannochloropsis* observou-se a influência dos diferentes meios de cultivo, bem como da intensidade da luz sobre a composição em ácidos graxos. Conforme diversos autores, o perfil em ácidos graxos pode ser influenciado por diversos fatores, dentre os quais a intensidade da luz, a quantidade de horas de cultivo sob iluminação e o pH do meio (HULATT et al., 2017). Com o aumento da intensidade luminosa, observou-se a diminuição de ácidos graxos poli-insaturados, acompanhado do aumento dos ácidos palmítico (C16:0) e palmitoléico (C16:1) (HULATT et al., 2017; MA et al., 2016).

4.5 Composição em ácidos graxos e biodiesel

Conforme diversos autores, a qualidade do biodiesel pode ser determinada principalmente pela composição de ácidos graxos acumulada na biomassa microalgal, sendo determinada fortemente pela proporção entre ácidos graxos saturados e insaturados. Isso se deve ao fato de que os ácidos graxos saturados são mais resistentes à degradação e à oxidação (KNOTHE, 2014; TALEBI et al., 2013). A composição em ácidos graxos é influenciada pelas condições climáticas e principalmente pelo meio de cultivo, mas depende também do potencial de cada linhagem de microalga (VERDUZCO et al; 2012; RAMOS et al., 2009).

Dentre as diversas as propriedades para a produção de biodiesel de qualidade, destacam-se: número de cetano, índice de iodo, estabilidade à oxidação e ponto de entupimento de filtro a frio.

A tabela 4.12 sintetiza os resultados preditos para essas propriedades, com base na composição em ácidos graxos das três linhagens de microalgas, empregando-se o software Biodiesel Analyser versão 2.2 (TALEBI; TABATABAEI; CHISTI, 2014). Os resultados foram comparados com as especificações vigentes.

Tabela 4.12-Propriedades preditas para o biodiesel com base na composição em ácidos graxos das três espécies de microalgas marinhas

Propriedades	<i>C. minutissima</i>	<i>D. salina</i>	<i>N. gaditana</i>	Limites	Ref.
CN ¹	47,64	48,11	52,63	45 - 51	EN ISO 5165
IV ²	113,2	112,12	90,06	Máx. 120	EN 14111
PEFF ³	15,9	11,8	14,0	5 - 19	EN 116
EO ⁴	5,2	5,2	6,2	Mín. 8	EN 14112

¹Número de Cetano (adimensional), ² Índice de Iodo, em g Iodo/100 g amostra, ³ Ponto de entupimento de filtro a frio, em °C, ⁴ Estabilidade à oxidação, em horas.

Fonte: Próprio autor.

De acordo com a tabela 4.12, o biodiesel das três microalgas possui um número de cetano dentro dos limites especificados. A norma europeia estabelece que o número de cetano deve ser de no mínimo 51 (STANSELL; GRAY; SYM, 2012). De acordo com a legislação brasileira, valores a partir de 45 são aceitos (ANP, 2014), assegurando que não ocorram problemas no processo de injeção e auto ignição do combustível. Consequentemente, números de cetano de acordo com essas especificações, garantem uma boa performance de início a frio e um funcionamento suave do motor (VERDUZCO et al; 2012; TALEBI et al., 2013). Talebi et al., (2013) pesquisaram o número de cetano para o biodiesel microalgal de diversas espécies e encontraram valores variando entre 43,77 para *Dunaliella sp* até 62,33 para *Amphora sp*.

O índice de iodo é outro parâmetro chave para o estabelecimento da qualidade dos biocombustíveis, visto que limita os ácidos graxos insaturados, que podem gerar a polimerização dos triacilgliceróis, levando à formação de depósitos ou deterioração do lubrificante no motor. De acordo com os valores preditos encontrados para o biodiesel das

três microalgas, todas atendem à especificação, pois seus índices encontram-se abaixo de 120 g de iodo por 100g de amostra (RÓS, 2012).

A terceira propriedade que se destaca é o ponto de entupimento de filtro a frio. Quando submetido a baixas temperaturas, o combustível pode formar ceras, sedimentando-se entupindo os filtros. Quanto a isto, os ésteres de ácido esteárico e palmítico são os primeiros a precipitar e causar entupimento, portanto, elevadas quantidades desses constituintes são desfavoráveis (RÓS, 2012). Cada país estabelece os limites de temperatura; em função das condições climáticas. O biodiesel das três espécies de microalgas atendeu às especificações quanto a este parâmetro (ANP, 2014).

Quanto à estabilidade à oxidação, que é mensurada em horas, observa-se que o mínimo de 8 horas é o limite estabelecido. Neste particular, de acordo com a tabela 4.12, os valores preditos para o biodiesel não atendem ao parâmetro, contudo, há a possibilidade de adição de substâncias antioxidantes, tais como o alfa-tocoferol, que prolongam a estabilidade oxidativa (RÓS, 2012; RAMOS et al., 2009). Outra alternativa para prolongar a estabilidade consiste em cuidar das condições ambientais de armazenamento, tais como temperatura e umidade no local.

De forma geral, a espécie *Nannochloropsis gaditana* destacou-se melhor quanto ao atendimento às propriedades relacionadas na tabela 4.12, embora as outras duas espécies também tenham atendido à maioria dos limites especificados.

As diferentes propriedades do biodiesel devem ser analisadas de forma conjunta, com o objetivo de uma avaliação final mais assertiva de sua qualidade.

De acordo com a composição em ácidos graxos e seu impacto relacionado às propriedades do biodiesel, diversos autores registram que os ácidos monoinsaturados, palmitoléico (C16:1) e oleico (C18:1) são mais favoráveis à produção de biodiesel (HULATT et al., 2017; RAMOS et al., 2009). Contudo, as proporções dos demais ácidos (monoinsaturados e poli-insaturados) devem ser consideradas.

A espécie *Chlorella minutissima* foi anteriormente estudada por Loures (2016) e confirmada como promissora alternativa na produção de biodiesel, bem como, diversos outros autores ressaltam suas características como fonte de lipídios e perfil em ácidos graxos e propriedades adequadas a uma ótima produção.

As espécies *Dunaliella salina* e *Nannochloropsis gaditana* também são consideradas fontes produtoras de biodiesel por vários autores (HULATT et al., 2017; LIU;

SONG; QIU, 2017b; MA et al., 2014). Os resultados demonstrados por outros autores estão em sintonia com os encontrados no presente trabalho.

4.6 Microalgas como fonte de ácidos graxos essenciais

Através da composição em ácidos graxos das três diferentes espécies estudadas no presente trabalho, verificou-se que, os perfis apresentaram um teor mais acentuado em ácidos graxos poli-insaturados, pertencentes às famílias ω -3 e ω -6 (conforme apresentado na tabela 4.8), denominados ácidos graxos essenciais, principalmente devido às condições de cultivo implementadas.

Ácidos graxos essenciais são atrativos comercialmente, devido aos amplos benefícios à saúde humana, incluindo a prevenção de problemas cardíacos, câncer, hipertensão, fibrose cística, artrite, asma e outros males relacionados ao sistema nervoso (FERREIRA, HOLZ, LISBOA, COSTA, 2017). Sua utilização não se restringe diretamente à alimentação humana, visto que podem ser adicionados a rações de peixes ou outros frutos do mar, nutrindo-os, para posterior consumo (HULATT et al., 2017).

Diferentes espécies do gênero *Chlorella*, *Dunaliella* e *Nannochloropsis* foram estudadas por diversos autores, que comprovaram sua capacidade de produzir ácidos graxos essenciais, em boa quantidade, portanto, são fontes de matéria prima dessas substâncias (HANAA EL-BAKY, FAROUK EL BAZ, 2004; PATIL et al., 2007; SOLANA; RIZZA; BERTUCCO, 2014).

O mesmo foi confirmado pelo presente trabalho, de acordo com os resultados apresentados.

5 CONCLUSÕES

Com base no trabalho experimental realizado, foi possível concluir que:

- quanto ao processo de extração de lipídios totais via solventes, dentre as quatro variáveis estudadas, a umidade da biomassa, o volume total de solventes e a proporção de solventes foram as variáveis que mais influenciaram para maximização da extração de material lipídico microalgal;
- a quarta variável, o tempo de ultrassom, não influenciou sobre o resultado, dentro do intervalo pesquisado, permitindo com isso, redução no tempo de processo.
- para as três espécies de microalgas marinhas, *Chorella minutissima*, *Dunaliella salina* e *Nannochloropsis gaditana* os melhores níveis para os fatores estudados foram: 64% de umidade, 33 mL de solventes/ grama de biomassa e proporção de clorofórmio, metanol e água igual a 5,7:3:1 (v/v).
- a extração realizada com biomassa úmida resultou em melhores rendimentos que com a biomassa desidratada, significando economia de energia durante o processo.
- as três espécies marinhas foram aptas à produção de biodiesel, o que foi comprovado pelos resultados:
 - quantificação dos ésteres de etila via RMN¹H,
 - análise da composição em ácidos graxos e
 - análise de propriedades chave para a qualidade do biodiesel: número de cetano, ponto de entupimento de filtro a frio, índice de iodo e estabilidade à oxidação;
- a espécie *Nannochloropsis gaditana* foi a que melhor atendeu aos parâmetros verificados para o biodiesel, contudo as espécies *Chlorella minutissima* e *Dunaliella salina* também revelaram-se promissoras.
- a condição de cultivo escolhida influenciou grandemente sobre a composição em ácidos graxos, sendo que um meio autotrófico, sem injeção adicional de dióxido de carbono, favoreceu a síntese de ácidos graxos poli-insaturados essenciais; o meio de cultivo f/2 mostrou-se adequado tanto para obtenção de ácidos graxos favoráveis à produção de biodiesel, como para a obtenção de ácidos graxos poli-insaturados essenciais.
- as três linhagens foram também ótimas produtoras de ácidos graxos essenciais.

RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos bons resultados alcançados no presente trabalho e com o intuito de expandir a pesquisa, recomenda-se:

- Cultivar as microalgas empregando outros meios de cultivo, diferentes do meio f/2 de Guillard;
- Testar outras formas de cultivo, tais como: cultivo em sistemas abertos (*race-way pounds*) ou em sistemas fechados de outros formatos, com crescimento heterotrófico, empregando diferentes fontes de carbono, avaliando o teor de lipídios totais resultante;
- Desenvolver o processo de extração substituindo o metanol por etanol;
- Desenvolver um processo de purificação dos óleos extraídos, isolando a clorofila e outros pigmentos dos lipídios totais;
- Mediante os cultivos realizados, quantificar carboidratos, proteínas, vitaminas e outros pigmentos;
- Testar maiores tempos de reação para as reações de conversão em biodiesel e com o emprego de outros catalisadores;
- Desenvolver processo para isolar e quantificar o glicerol formado como coproduto nas reações de transesterificação;
- Avaliar outras especificações do biodiesel, diferentes das estudadas neste trabalho, com base na composição em ácidos graxos;
- Aplicar o método de Taguchi no desenvolvimento das recomendações acima, em diferentes arranjos ortogonais, complementando-os com a metodologia de superfície de resposta.

REFERÊNCIAS

- ÁCIDOS graxos de cadeia longa na saúde e nutrição. **Aditivos & Ingredientes**, v. 68, p. 40-48, 2010.
- ADAM, F. et al. “Solvent-free” ultrasound-assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: A green, clean and scalable process. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 457–465, 2012.
- AGILENT. GC e GC / MS Seu recurso essencial para colunas e consumíveis. **Agilent**, v. 1, p. 1–708, 2017.
- ALVES, C. T. **Transesterificação de óleos e gorduras residuais via rotas metílica e etílica utilizando o catalisador Aluminato de Zinco, em presença ou não de CO₂ supercrítico**. 2012. Tese (Doutorado em Engenharia Industrial) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.
- AMARAL, M. D. S. **Cultivo da microalga marinha Chlorella sp. como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.
- AMARAL, M. S. et al. Evaluation of the cultivation conditions of marine microalgae Chlorella sp. to be used as feedstock in ultrasound-assisted ethanolysis. **Biofuel Research Journal**, v. 2, n. 3, p. 288–294, 2015.
- ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Resolução ANP N° 45 DE 25/08/2014. **DOU 26.8.2014**, 2014.
- BAJHAIYA, A. K.; ZIEHE MOREIRA, J.; PITTMAN, J. K. Transcriptional engineering of microalgae: prospects for high-value chemicals. **Trends in Biotechnology**, v. 2, p. 1–4, 2016.
- BALASUBRAMANIAN, R. K.; YEN DOAN, T. T.; OBBARD, J. P. Factors affecting cellular lipid extraction from marine microalgae. **Chemical Engineering Journal**, v. 215–216, p. 929–936, 2013.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 389–395, 1959.
- BRASIL, B. S. A. .; SILVA, F. C. P.; SIQUEIRA, F. G. Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. **New Biotechnology**, 2016.
- BRAVO-FRITZ, C. P. et al. Multi-scenario energy-economic evaluation for a biorefinery based on microalgae biomass with application of anaerobic digestion. **Algal Research**, v. 16, p. 292–307, 2016.
- BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F. de; 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, p. 849–854, 2009.

CARDOSO, A. S. et al. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. **Revista Brasileira de Biociência**, v. 9, p. 542–549, 2011.

CHAKRABORTY, S. et al. Improvement of lipid content of *Chlorella minutissima* MCC 5 for biodiesel production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2016.

CHATSUNGNOEN, T.; CHISTI, Y. Optimization of oil extraction from *nannochloropsis* salina biomass paste. **Algal Research**, v. 15, p. 100–109, 2016.

CHEAH, W. Y. et al. Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae. **Bioresource technology**, v. 184, p. 190–201, 2015.

CHEN, C.-L. et al. Biodiesel production from wet microalgae feedstock using sequential wet extraction/transesterification and direct transesterification processes. **Bioresource Technology**, v. 194, p. 179–186, 2015.

CHIRANJEEVI, P.; MOHAN, S. V. Critical parametric influence on microalgae cultivation towards maximizing biomass growth with simultaneous lipid productivity. **Renewable Energy**, v. 98, p. 1–8, 2016.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294–306, 2007.

COHEN ZWI. **Chemicals from Microalgae**, v.1, p. 1-560, 2012.

CONVERTI, A. et al. 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, n. 6, p. 1146–1151, 2009.

CUELLAR-BERMUDEZ, S. P. et al. Effects of light intensity and carbon dioxide on lipids and fatty acids produced by *synechocystis* sp. PCC6803 during continuous flow. **Algal Research**, v. 12, p. 10–16, 2015.

D’ALESSANDRO, E. B.; ANTONIOSI FILHO, N. R. Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 832–841, 2016.

DEJOYE TANZI, C.; ABERT VIAN, M.; CHEMAT, F. New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass: a green clean and scalable process. **Bioresource Technology**, v. 134, p. 271–275, 2013.

DU, Y. et al. Opportunities for switchable solvents for lipid extraction from wet algal biomass: an energy evaluation. **Algal Research**, v. 11, p. 271–283, 2015.

EL-BAKY, H. H. A; EL-BAZ, F. H., F.K; EL-BAROTY, G. S. Production of lipids rich in omega 3 fatty acids from the halotolerant alga *dunaliella salina*. **Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 102–108, 2004.

FAKHRY, E. M.; MAGHRABY, D. M. EL. Fatty acids composition and biodiesel characterization of *dunaliella salina*. **Journal of Water Resource and Protection**, v. 2013, p. 894–899, Sept. 2013.

FERREIRA, S.P. et al. Fatty acid profile of *Chlorella* biomass obtained by fed batch heterotrophic cultivation. **International Food Research Journal**, v. 24, p. 284–291, Feb. 2017.

FERREIRA, S. P. et al. Revisão : microalgas : uma fonte alternativa na obtenção de ácidos gordos essenciais Review : microalgae : an alternative source to obtain essential fatty acids. **SCAP Sociedade de Ciências Agrárias de Portugal**, v. 36, n. 3, p. 275–287, 2013.

FE-SOLUTION, I. I. I.; EDTA-SOLUTION, H.; ZNSO, K. K. J. **Norwegian Inst Water Research**, v. 8, n. 3, p. 10–11, 1976.

FRANCO, A. L. C. et al. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 437–448, 2013.

GARCIA, C. M. **Transesterificação de óleos vegetais**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, 2006.

GAROMA, T.; JANDA, D. Investigation of the effects of microalgal cell concentration and electroporation, microwave and ultrasonication on lipid extraction efficiency. **Renewable Energy**, v. 86, p. 117–123, 2016.

GUILLARD, R. R. L., SMITH, W. H.; CHANLEY, M.H (Ed.) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: **Culture of marine invertebrate animals**. New York: Plenum. v. 1, p. 29–60, 1975.

GOUVEIA, L; A.C. OLIVEIRA. Microalgae as a raw material for biofuels production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 269-274, 2009.

HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 3, p. 709–32, jan. 2012.

HALLENBECK, P. C. et al. Building a better mousetrap II: Using design of experiments with unconfounded ions to compare the growth of different microalgae. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 90–99, 2014.

HE, Y. et al. Analysis and model delineation of marine microalgae growth and lipid accumulation in flat-plate photobioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 111, p. 108–116, 2016.

HIBBERD. **Nannochloropsis**. Disponível em:
<<https://en.wikipedia.org/wiki/Nannochloropsis>>. Acesso em: 1 set. 2016.

HUANG, G. et al. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 87, n. 1, p. 38–46, 2010.

HULATT, C. J. et al. Production of fatty acids and protein by nanochloropsis in flat-plate photobioreactors. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–17, 2017.

KANEMOTO, F. T. **Otimização do sistema de cultivo de baixo custo de *Nannochloropsis gaditana* Lubián 1982 para produção de biodiesel**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

KARAPATSI, A. et al. An experimental investigation of stichococcus sp. cultivation conditions for optimal co-production of carbohydrates, proteins and lipids following a biorefinery concept. **Biomass and Bioenergy**, v. 89, p. 123–132, 2015.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**, v. 86, n. 10, p. 1059–1070, 2005.

KNOTHE, G. Some aspects of biodiesel oxidative stability. **Fuel Processing Technology**, v. 88, n. 7, p. 669–677, 2007.

KNOTHE, G. A comprehensive evaluation of the cetane numbers of fatty acid methyl esters. **Fuel**, v. 119, n. x, p. 6–13, 2014.

KNOTHE, G.; MATHEAUS, A. C.; RYAN, T. W. Cetane numbers of branched and straight-chain fatty esters determined in an ignition quality tester. **Fuel**, v. 82, n. 8, p. 971–975, 2003.

KOLLER, M.; MUHR, A.; BRAUNEGG, G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. **Algal Research**, v. 6, n. PA, p. 52–63, 2014.

KWIETNIEWSKA, E. et al. **Microalgae**: cultivation and application of biomass as a source of energy: a review. [s.l.] Instytut Agrofizyki, 2012.

LANANAN, F. et al. Effect of Conway Medium and f/2 Medium on the growth of six genera of South China Sea marine microalgae. **Bioresource Technology**, v. 141, p. 75–82, 2013.

LEE, S. J.; YOON, B. D.; OH, H. M. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. **Biotechnology Techniques**, v. 12, n. 7, p. 553–556, 1998.

LEMÕES, J. S. **Síntese de Ésteres Graxos de *Chlorella* sp . utilizando os processos de Extração-Transesterificação e Transesterificação in situ**. 2011. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) - Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, 2011.

LI, Y. et al. A comparative study: the impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research. **Microbial cell factories**, v. 13, n. 1, p. 14, 2014.

LIU, J.; SONG, Y.; QIU, W. Oleaginous microalgae *Nannochloropsis* as a new model for biofuel production: Review & analysis. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 72, p. 154–162, Dec 2017a.

LIU, J.; SONG, Y.; QIU, W. Oleaginous microalgae *Nannochloropsis* as a new model for biofuel production: review & analysis. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 72, n. December 2016, p. 154–162, 2017b.

LIU, X. et al. A parametric study on the bending accuracy in micro W-bending using Taguchi method. **Measurement**, v. 100, p. 233–242, 2017.

LOURENÇO, S. DE O. **Cultivo de microalgas marinhas princípios e aplicações**. São Carlos SP: RIMA Editora, 2006.

LOURES, C. C. et al. Assembling of a bubble-column photobioreactor for the cultivation of a marine microalgae *Chlorella minutissima* In: SOLABIAA L. CONGRESSO LATINO AMERICANO, 4., 8-13 nov. 2015, Florianópolis - SC. **Anais...** Florianópolis, Brazil, 2015.

LOURES, C. C. A. **Otimização do processo de cultivo da microalga *Chlorella minutissima* como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel**. 2016. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - FEG UNESP, Guaratinguetá, 2016.

MA, X. N. et al. Lipid production from *Nannochloropsis*. **Marine Drugs**, v. 14, n. 4, 2016.

MA, Y. et al. Evaluation of the potential of 9 *Nannochloropsis* strains for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 503–509, 2014.

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, n. 1, p. 217–232, 2010.

MCKENNEDY, J. et al. Supercritical carbon dioxide treatment of the microalgae *Nannochloropsis oculata* for the production of fatty acid methyl esters. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 116, p. 264–270, 2016.

MESKO, F.; JACOB-LOPES, E. Biodiesel derived from microalgae: Advances and perspectives. In: **Química Nova**. [s.l: s.n.]. v. 35p. 2013–2018, 2012.

MILANO, J. et al. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 180–197, 2016.

MING REN, K. O. Cultivation of *nannochloropsis gaditana* on mixtures of nitrogen sources. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 33, n. 2, p. 551–555, 2014.

MIT. MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY. **Constructing orthogonal arrays**. Disponível em: <http://ocw.mit.edu/courses/aeronautics-and-astronautics/16-881-robust-system-design-summer-1998/lecture-notes/l8_orth_arrays.pdf>.

MUBARAK, M.; SHAIJA, A.; SUCHITHRA, T. V. A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. **Algal Research**, v. 7, p. 117–123, 2015.

NEOFOTIS, P. et al. Characterization and classification of highly productive microalgae strains discovered for biofuel and bioproduct generation. **Algal Research**, v. 15, p. 164–178, 2016.

ORIGINOIL, Inc. N. Eckelberry; M. P. Green; S. A. Fraser. **Systems and methods for extracting non-polar lipids from an aqueous algae slurry and lipids produced therefrom**. US9085745B2, 19 out. 2010. 21 jul. 2015.

PARDESHI, P. M.; MUNGRAY, A. A.; MUNGRAY, A. K. Determination of optimum conditions in forward osmosis using a combined Taguchi–neural approach. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 109, p. 215–225, 2016.

PATIL, J. A.; HONAGUNTIKAR, P. An Overview on developments in biodiesel production from algae. **International Journal of Science and Research (IJSR)**, v. 3, n. 12, p. 102–106, 2014.

PATIL, V. et al. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. **Aquaculture International**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2007.

POHNDORF, R. S. et al. Production of lipids from microalgae *Spirulina* sp.: Influence of drying, cell disruption and extraction methods. **Biomass and Bioenergy**, v. 93, p. 25–32, 2016.

PRAGYA, N.; PANDEY, K. K.; SAHOO, P. K. A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 24, p. 159–171, 2013.

PRATOOMYOT, J.; SRIVILAS, P.; NOIRAKSAR, T. Fatty acids composition of 10 microalgal species. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 27, n. May, p. 1179–1187, 2005.

PROCÓPIO, Z. S. D. **Avaliação da produção de biodiesel de microalga *Isochrysis galbana* via transesterificação in situ**. 2014. 93f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Tecnologias Regionais), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

RAMÍREZ-VERDUZCO, L. F.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, J. E.; JARAMILLO-JACOB, A. D. R. Predicting cetane number, kinematic viscosity, density and higher heating value of biodiesel from its fatty acid methyl ester composition. **Fuel**, v. 91, n. 1, p. 102–111, 2012.

RAMOS, M. J. et al. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 261–268, 2009.

REDDY, H. K. et al. Subcritical water extraction of lipids from wet algae for biodiesel production. **Fuel**, v. 133, p. 73–81, 2014.

RÓS, P. **Avaliação de óleos de cianobactérias como matéria-prima lipídica para síntese de biodiesel pela rota etílica**. 2012. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

RÓŠ, P. et al. Microbial oil derived from filamentous cyanobacterium trichormus sp. as feedstock to yield fatty acid ethyl esters by enzymatic synthesis. **Journal of Advances in Biology & Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 1–14, 2017.

ROY, R. K.. **Design of Experiments (DOE) Using the Taguchi Approach: 16 Steps to Product and Process Improvement**. New Jersey: John Wiley, 2001.

RYCKEBOSCH, E.; MUYLAERT, K.; FOUBERT, I. Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 2, 2012.

SALAM, K. A.; VELASQUEZ-ORTA, S. B.; HARVEY, A. P. A sustainable integrated in situ transesterification of microalgae for biodiesel production and associated co-products: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 65, p. 1179–1198, 2016.

SANTOS, R. R. et al. Comparison between several methods of total lipid extraction from *Chlorella vulgaris* biomass. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 22, p. 95–99, 2015.

SHENBAGA DEVI, A. et al. Culture and biofuel producing efficacy of marine microalgae *Dunaliella salina* and *Nannochloropsis* sp. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. III, n. 4, p. 38–44, 2012.

SILVA, C. S. P. et al. Optimization of the cultivation conditions for *Synechococcus* sp. PCC7942(cyanobacterium) to be used as feedstock for biodiesel production. **Algal Res.**, v. 3, p. 1–7, 2014.

SILVA, R. P. F. F.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; DUARTE, A. C. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 76, p. 40–51, 2016.

SKORUPSKAITE, V.; MAKAREVICIENE, V.; GUMBYTE, M. Opportunities for simultaneous oil extraction and transesterification during biodiesel fuel production from microalgae : a review. **Fuel Processing Technology**, v. 150, p. 78–87, 2016.

SMEDES, F.; ASKLAND, T. K. Revisiting the development of the Bligh and Dyer total lipid determination method. **Marine Pollution Bulletin**, v. 38, n. 3, p. 193–201, 1999.

SMEDES, F.; THOMASEN, T. K. Evaluation of the bligh and dyer lipid determination method. **Marine Pollution Bulletin**, v. 32, n. 1, p. 681–688, 1996.

SOLANA, M.; RIZZA, C. S.; BERTUCCO, A. Exploiting microalgae as a source of essential fatty acids by supercritical fluid extraction of lipids: comparison between *scenedesmus obliquus*, *chlorella protothecoides* and *nannochloropsis salina*. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, p. 311–318, 2014.

SOUZA, N. E. DE; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos: estrutura, classificação, nutrição e saúde. **Arquivos do Museu Dinâmico Interdisciplinar**, v. 2, n. 2, p. 102–107, 2012.

STANSELL, G. R.; GRAY, V. M.; SYM, S. D. Microalgal fatty acid composition: implications for biodiesel quality. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 4, p. 791–801, 2012.

TALEBI, A. F. et al. Fatty acids profiling: a selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. **Algal Research**, v. 2, n. 3, p. 258–267, 2013.

TALEBI, A. F.; TABATABAEI, M.; CHISTI, Y. A User-friendly software for predicting the properties of prospective biodiesel. **Biofuel Research Journal**, v. 2, n. 2, p. 55–57, 2014.

TSUZUKI, M. et al. Effects of CO₂ concentration during growth on fatty acid composition in microalgae. **Plant Physiology**, v. 93, n. 3, p. 851–856, 1990.

UNIPROT TAXONOMY 3081. **Chlorella minutissima**. Disponível em: <http://en.citizendium.org/wiki/Chlorella_minutissima>. Acesso em: 3 set. 2016.

VIÊGAS, C. V. **Extração e caracterização dos lipídeos da microalga chlorella pyrenoidosa visando à produção de ésteres graxos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) - Escola de Química e Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2010.

VÖLZ, M. D. de A. **Biodiesel a partir de óleos de alta acidez: desenvolvimento de um processo catalítico homogêneo**. 2009. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) - Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

WIKIWAND. **Dunaliella**. Disponível em: <<http://www.wikiwand.com/en/Dunaliella>>. Acesso em: 1 set. 2016.

YANG, H. J.; HWANG, P. J.; LEE, S. H. A study on shrinkage compensation of the SLS process by using the taguchi method. **International Journal of Machine Tools and Manufacture**, v. 42, n. 11, p. 1203–1212, 2002.

YANG, I.-S. et al. Cultivation and harvesting of microalgae in photobioreactor for biodiesel production and simultaneous nutrient removal. **Energy Conversion and Management**, v. 117, p. 54–62, 2016.