



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CINTIA DOS SANTOS ALVES

**EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE MICROALGAS E OBTENÇÃO  
DE ÉSTERES METÁLICOS VISANDO A PRODUÇÃO  
DE BIODIESEL**

---

Londrina  
2017

CINTIA DOS SANTOS ALVES

**EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE MICROALGAS E OBTENÇÃO  
DE ÉSTERES METÍLICOS VISANDO A PRODUÇÃO  
DE BIODIESEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioenergia como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioenergia, Área de concentração em Biocombustíveis.

Orientadora: Prof. Dra. Carmen Luisa Barbosa Guedes.

Coorientador: Prof. Dr. Helder Rodrigues da Silva.

Londrina  
2017

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos  
da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação- na-Publicação (CIP)**

A474e Alves, Cintia dos Santos.

Extração do óleo de microalgas e obtenção de ésteres metílicos visando a produção de biodiesel /  
Cintia dos Santos Alves. - Londrina, 2017.  
78 f.

Orientador: Carmen Luisa Barbosa Guedes.

Coorientador: Helder Rodrigues da Silva.

Dissertação (Mestrado em Bioenergia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências  
Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Biodiesel - Tese. 2. Microalga - Tese. 3. Extração - Tese. 4. Ésteres - Tese. I. Guedes, Carmen  
Luisa Barbosa. II. Silva, Helder Rodrigues da. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de  
Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Bioenergia. IV. Título.

CDU 662.755

CINTIA DOS SANTOS ALVES

**EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE MICROALGAS E OBTENÇÃO  
DE ÉSTERES METÍLICOS VISANDO A PRODUÇÃO  
DE BIODIESEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioenergia como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioenergia, Área de concentração em Biocombustíveis.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dra. Carmen Luisa Barbosa Guedes  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dra. Diva de Souza Andrade  
Instituto Agrônômico do Paraná - IAPAR

---

Dr. Paulo Rogério Pinto Rodrigues  
Universidade Estadual do Centro Oeste -  
UNICENTRO

Londrina, 31 de outubro de 2017.

A minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

Antes de qualquer coisa agradeço a Deus pelo dom da vida, por ter me capacitado em meios a tantos momentos de dificuldades e pela oportunidade concedida em realizar minha pós-graduação.

Agradeço a Universidade Estadual de Londrina (UEL) pelas oportunidades.

Aos funcionários e professores do Programa de Pós-graduação em Bioenergia (PPGB).

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Araucária pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) e Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) pelo fornecimento da biomassa de microalga para a realização deste trabalho.

Gostaria de deixar registrado minha imensa gratidão e carinho a Ana Cláudia Saladini, pois sem me conhecer abriu as portas da sua casa e pude ver como seu coração é lindo e generoso, com toda sua delicadeza me ajudou a ampliar meus horizontes.

Em especial, a minha mãe Laura e meu irmão César pelo amor incondicionalmente, pela força, por não ter desistido de mim e nem das situações percorrida no caminho. Sem vocês com certeza não iria ter conseguido.

Aos amigos do laboratório Jonathan Baumi, Carol Milani, Larissa Dorta, Bruna, Talita, Daiane, Eloá, Ana, Vanessa, Louise, Andres, Fabio, Dalila, obrigada pelo carinho e muitos momentos de alegria.

A Daiane pela amizade e apoio durante as etapas de realização deste trabalho.

A Dra. Carmen Luísa Barbosa Guedes, pela honra e oportunidade de realizar este trabalho sob a sua orientação, por toda sua receptividade, carinho, amizade e empenho e atenção prestada. Tenho muita gratidão por tudo o que aprendi.

Ao Dr. Helder Rodrigues da Silva, pela amizade, pela paciência em vários momentos, pelo seu apoio, pelo seu incentivo e sua orientação, e por todos ensinamentos para a realização deste trabalho.

A Dra. Cristiane Carneiro por toda ajuda, amizade e paciência. Você foi essencial para minha formação.

Aos amigos dos churrascos e descontração e confraternização Guilherme, Raí, Anathan, Francino e o melhor churrasqueiro Batista “meu papi”.

Ao companheirismo dos alunos do Mestrado em Bioenergia Eliane, Kelly, Elisangela, Gabriela, Udimara, Jessica, Mariana, Lucas e Maria Catalina e ressaltar o melhor momento do mestrado a viagem a Foz do Iguaçu.

Ao Lucas Maroubo, Guilherme Colusse e Maria Catalina, vocês são sensacionais, obrigada pelo companheirismo, intensos momentos de desabafo diversão e carinho.

Em especial a Mariana Fontana pela força, ânimo, alegria e companheirismo. Agradeço por tudo que passamos, pois foi um divisor de águas em nossas vidas, uma experiência extraordinária.

Em especial a Caroline Rocha, forte e destemida. Você é um anjo que entrou em minha vida, quantos momentos de força você me deu, quanta coisa aprendi com você. Menina guerreira e iluminada gratidão pelo seu carinho e de toda sua família.

Em especial a minha amiga Jessica Barbieri minha companheira desde a graduação. Quantos momentos difíceis e de muitos risos passamos, obrigado por todos esses anos de parceria e lealdade.

As minhas parceiras e irmãs do apartamento 101 Ana Paula e Mirella, sou muito grata a vocês por entrarem em minha vida e agregar o Barnabé, deixaram mais alegre, leve e mais gostosa com suas comidas. Me fazem lembrar como é bom ter um ombro amigo. Fizeram parte do momento final de renovação para minha alma.

A todos que contribuíram de forma direta e indireta com essa conquista importante em minha vida, recebam de coração o meu muito obrigada!

"Felizes são os que não viram,  
e mesmo assim creram".

João 20-29.

ALVES, Cintia dos Santos. **Extração do óleo de microalgas e obtenção de ésteres metílicos visando a produção de biodiesel**. 2017. 78f. Dissertação (Mestrado em Bioenergia). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

A biomassa de microalga tem sido destaque em diferentes temas em pesquisas científicas, devido as suas diversas aplicações biotecnológicas e principalmente para produção de biocombustíveis. A biomassa de microalgas tem se mostrado atrativa para produção de biodiesel pois as microalgas podem acumular altas concentrações de lipídeos em suas células. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da extração de lipídeos da biomassa de microalga *Neochloris oleoabundans* e *Scenedesmus* sp. e analisar a produção de ésteres metílicos a partir do óleo da microalga *N. oleoabundans*. Os teores de umidade obtidos para as biomassas das microalgas após o processo de liofilização foram de 20% para a *N. oleoabundans* e 9% para a *Scenedesmus* sp. O método de extração a frio por gravimetria utilizando como solventes clorofórmio/metanol/água na proporção 1:1:0,6 foi mais eficiente na extração do lipídeo 15,96% para a *N. oleoabundans* e 14,24% para a *Scenedesmus* sp. A extração com aquecimento (Soxhlet) foi o método que obteve menor teor de lipídeo, independente do solvente utilizado. O método de espectrofluorimetria por fluorescência foi mais eficiente, pois detectou maiores teores de lipídeos presente na biomassa de microalga quando comparado com método tradicional gravimétrico, pois detectou a quantificação de lipídeos neutros em ambas espécies de microalgas, resultando em teor de lipídeos de 24,99% para *N. oleoabundans* e de 25,05% para *Scenedesmus* sp. O teor de ésteres metílicos a partir do óleo da biomassa de microalga *N. oleoabundans* foi de 40%, para aumentar o rendimento de ésteres é necessário realizar um tratamento de degomagem, para retirar impurezas nesse processo para aumentar a taxa de conversão dos ésteres metílicos.

**Palavras-chave:** *Neochloris oleoabundans*. *Scenedesmus* sp. Lipídeo. Quantificação.

ALVES, Cintia dos Santos. **Extraction of the oil of microalgae and obtaining of methyl esters for the production of biodiesel.** 2017. 78f. Dissertação (Mestrado em Bioenergia). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

### ABSTRACT

The microalgae biomass has been highlighted in different themes in scientific research, due to its diverse biotechnological applications and mainly for the production of biofuels. Microalgae biomass has been shown to be attractive for biodiesel production since microalgae can accumulate high concentrations of lipids in their cells. In this sense, this work had as objective to evaluate the efficiency of the lipid extraction of the microalgae biomass *Neochloris oleoabundans* and *Scenedesmus* sp. and to analyze the production of methyl esters from the oil of the microalga *N. oleoabundans*. The moisture contents obtained for the biomass of microalgae after lyophilization were 20% for *N. oleoabundans* and 9% for *Scenedesmus* sp. The method of cold extraction by gravimetry using 1: 1: 0.6 chloroform/methanol/water was more efficient in extracting the lipid 15.96% for *N. oleoabundans* and 14.24% for *Scenedesmus* sp. The extraction with heating (Soxhlet) was the method that obtained lower lipid content, independent of the solvent used. The fluorescence spectrofluorimetry method was more efficient, since it detected higher levels of lipids present in the microalgae biomass when compared to the traditional gravimetric method, since it detected the quantification of neutral lipids in both species of microalgae, resulting in a lipid content of 24.99 % for *N. oleoabundans* and 25.05% for *Scenedesmus* sp. The content of methyl esters from the oil of the *N. oleoabundans* microalgae biomass was 40%. In order to increase the yield of esters, a degumming treatment is necessary to remove impurities in that process to increase the conversion rate of the methyl esters.

**Key words:** *Neochloris oleoabundans*. *Scenedesmus* sp. Lipid. Quantification.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> -	Reação de transesterificação.....	21
<b>Figura 2</b> -	Etapas do processo de hidroesterificação.....	22
<b>Figura 3</b> -	Reação de esterificação.....	23
<b>Figura 4</b> -	Estrutura dos ácidos graxos.....	30
<b>Figura 5</b> -	Diagrama de fases clorofórmio-metanol-água (%) a 20°C.....	36
<b>Figura 6</b> -	Primeira etapa de extração de lipídeos a frio.....	40
<b>Figura 7</b> -	Segunda etapa de extração de lipídeos a frio, reextração.....	40
<b>Figura 8</b> -	Extração de lipídeos a frio utilizando ultrassom.....	42
<b>Figura 9</b> -	Sistema de reação de refluxo para obtenção do biodiesel. O condensador de bolas (a) foi acoplado à entrada central do balão de fundo redondo (e). No condensador de bolas foi inserida uma mangueira para o resfriamento da reação (b), em uma das entradas laterais foi inserido o termômetro de mercúrio de junta esmerilhada (c), e em outra foi inserido uma válvula de segurança para evitar o aumento da pressão do sistema contendo sílica (d), a manta aquecedora (f) foi mantida em 60°C durante 40 min. ....	49
<b>Figura 10</b> -	Processo de extração.....	53
<b>Figura 11</b> -	Fração lipídica no processo de extração.....	54
<b>Figura 12</b> -	Processo de extração de lipídeos no aparelho soxhlet. O sifão permite o refluxo contínuo do solvente e o cartucho de celulose com a biomassa de microalga (b) acoplado ao balão volumétrico (c). No balão volumétrico fica o solvente e no condensador ocorre o refluxo de água. O balão volumétrico é aquecido com uma manta (d) de modo que o solvente entre em ebulição. O vapor condensa e goteja no cartucho solubilizando os lipídeos. Quando o reservatório enche e atinge a altura do sifão ele transborda levando o solvente e o extrato para o balão. ....	59
<b>Figura 13</b> -	Média do teor de lipídeos na biomassa de microalga pelos métodos de extração.....	61
<b>Figura 14</b> -	Intensidade de fluorescência em intervalos de tempo (minutos).....	63

<b>Figura 15</b> - Curva de calibração a partir do extrato lipídico da microalga <i>N. oleoabundans</i> .....	64
<b>Figura 16</b> - Curva de calibração a partir do extrato lipídico de microalga <i>Scenedesmus</i> sp.....	64
<b>Figura 17</b> - Curva de calibração da biomassa de microalga <i>N. oleoabundans</i> e <i>Scenedesmus</i> sp. ....	65
<b>Figura 18</b> - Separação dos ésteres metílicos .....	67

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1-</b>	Perfil de ácidos graxos (%) da microalga <i>N. oleoabundans</i> .....	31
<b>Tabela 2-</b>	Perfil de ácidos graxos (%) da microalga <i>Scenedesmus</i> sp.....	32
<b>Tabela 3-</b>	Teor de lipídeo da biomassa de microalgas utilizando extração a frio (%).....	54
<b>Tabela 4-</b>	Teor de umidade da biomassa de microalgas utilizando o método Karl Fischer e gravimetria (%).....	56
<b>Tabela 5-</b>	Teor de lipídeo em biomassa de microalga seca a partir da extração a frio (%).....	57
<b>Tabela 6-</b>	Teor lipídico na biomassa de microalga utilizando aparelho Soxhlet (%).....	59
<b>Tabela 7-</b>	Teor lipídico obtido na extração utilizando como solventes em biomassa seca (%).....	60
<b>Tabela 8-</b>	Quantificação de lipídeo do extrato e da biomassa de microalga (%).....	66
<b>Tabela 9-</b>	Análises físico-química do óleo de microalga <i>Neochloris oleoabundans</i> .....	66

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1	OBJETIVOS .....	14
1.1.1	Objetivo geral .....	14
1.1.2	Objetivos específicos.....	14
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>16</b>
2.1	BIODIESEL .....	16
2.1.1	Biodiesel de óleo de microalgas .....	19
2.1.2	Processos de obtenção de biodiesel .....	20
2.1.2.1	Transesterificação .....	20
2.1.2.2	Hidroesterificação.....	21
2.2	RAZÃO MOLAR ESTEQUIOMÉTRICA .....	23
2.3	CATALISADORES .....	24
2.4	MICROALGAS .....	25
2.4.1	<i>Neochloris oleoabundans</i> .....	27
2.4.2	<i>Scenedesmus</i> sp. ....	28
2.5	COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA .....	29
2.5.1	Lipídeos .....	29
2.6	RUPTURA DA PAREDE CELULAR .....	32
2.7	EXTRAÇÃO DA BIOMASSA DE MICROALGAS COM SOLVENTES ORGÂNICOS .....	34
2.7.1	Método com aquecimento .....	34
2.7.2	Métodos a frio.....	35
2.7.2.1	Folch et al (1957).....	35
2.7.2.2	Bligh & dyer .....	35
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>38</b>
3.1	MATERIAIS .....	38
3.2	CULTIVO DA BIOMASSA DE MICROALGAS .....	38
3.3	MÉTODOS .....	38
3.3.1	Extração do óleo.....	38
3.3.1.1	Extração de lipídeos utilizando mistura de solventes a frio .....	39

3.3.1.2	Extração de lipídeos com mistura de solventes a frio e uso de ultrassom.....	41
3.3.1.3	Mistura de solventes com aquecimento .....	42
3.3.2	Teor de lipídeos.....	43
3.3.2.1	Método gravimétrico .....	43
3.3.2.2	Método por espectroscopia de fluorescência .....	43
3.3.3	Determinação do teor de umidade na biomassa de microalga.....	45
3.3.3.1	Determinação do teor de umidade em aparelho titulador volumétrico .....	45
3.3.3.2	Determinação do teor de umidade pelo método gravimétrico .....	45
3.4	OBTENÇÃO DE ÓLEO DE MICROALGA PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL .....	45
3.4.1	Análises físico-químicas do óleo de microalga <i>N. oleoabundans</i> .....	46
3.4.1.1	Determinação do índice de acidez .....	46
3.4.1.2	Determinação do índice de saponificação.....	47
3.4.1.3	Determinação do teor de umidade .....	48
3.5	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ÉSTERES.....	48
3.5.1	Análise em cromatografia em camada delgada .....	49
3.5.2	Análise em cromatografia em fase gasosa.....	50
3.5.2.1	Preparação do padrão interno .....	50
3.5.2.2	Preparação da amostra .....	51
<b>4</b>	<b>RESULTADO E DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
4.1	EXTRAÇÃO DO ÓLEO COM MISTURA DE SOLVENTES A FRIO .....	52
4.2	EXTRAÇÃO DO ÓLEO COM MÉTODO DE AQUECIMENTO .....	58
4.3	MÉTODO POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	62
4.3.1	Quantificação lipídica da biomassa de microalga.....	65
4.4	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO.....	66
4.5	PRODUÇÃO DE ÉSTERES A PARTIR DO ÓLEO DE MICROALGAS .....	67
4.5.1	Cromatografia em camada delgada .....	68
4.5.2	Cromatografia em fase gasosa .....	68
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>70</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>71</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado um país privilegiado para a exploração da biomassa vegetal para fins energéticos, pois possui uma vasta extensão territorial, recursos hídricos e elevada temperatura em grande parte do território facilitando o desenvolvimento de práticas agrícolas de culturas. De acordo com este cenário o governo federal criou o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) com a finalidade de incentivar as fontes naturais de energia. O (PNPB) tem o objetivo de implantar de forma sustentável, tanto técnica como economicamente para a produção e uso do Biodiesel. Com a visão holística para inclusão social e desenvolvimento regional com a geração de emprego e renda. As principais diretrizes do PNPB é implantar um programa sustentável, promovendo inclusão social, garantindo preços competitivos no mercado nacional com qualidade, suprimento produzido do biodiesel a partir de diferentes fontes oleaginosas e em regiões do Brasil (BRASIL, 2005).

As matérias-primas potenciais para a produção de biodiesel, são bastante diversificadas dependendo da região. O biodiesel pode ser produzido a partir do óleo das culturas oleaginosas, como: algodão, amendoim, canola, girassol, milho, mamona, nabo forrageiro, palma, pinhão manso e microalgas. As gorduras animais e óleos residuais também podem ser utilizados como matéria-prima em sua produção (MELLO. F et al., 2007).

A biomassa de microalga tem sido destaque em pesquisas científicas pois possuem diversas aplicações biotecnológicas que podem ser utilizados em compostos para indústria farmacêuticas, alimentação de peixes e humana, e principalmente para produção de biocombustíveis como o bioetanol e biodiesel (LOURENÇO, 2006). Calcula-se que existam mais de 50.000 espécies de microalgas, porém aproximadamente 30.000 espécies foram estudadas (RICHMOND, 2004). O teor lipídico na biomassa de microalgas pode variar entre 1 e 70%, muitas espécies possuem maior potencial para o acúmulo de lipídeos. Desta forma otimizar os fatores que influenciam na produtividade e no teor de lipídeos como a temperatura, controle da concentração de nitrogênio, salinidade, intensidade luminosa, concentração de CO<sub>2</sub> e os procedimentos de colheita favorecem o sistema de produção de microalgas.

A grande adversidade esta na eficiência da extração do óleo da biomassa de microalga, vários métodos tem sido testados como por exemplo, uso de solventes orgânicos, extração supercrítica, extração por soxhlet entre outros.

As microalgas possuem uma capacidade de produzir 30 vezes a quantidade de óleo por unidade de área quando comparadas as plantas oleaginosas. Desta forma as microalgas tem grande potencial para a produção de biocombustíveis (SHEEHAN et al., 1998). Com base neste potencial e nesta perspectiva da biomassa, diversos programas de pesquisa estão em desenvolvimento, em vários países, buscando identificar espécies mais produtivas e de mais fácil cultivo para o desenvolvimento da tecnologia de produção para larga escala, identificando e desenvolvendo processos mais eficientes e barato para colheita e extração óleo das microalgas, e explorando o máximo da biomassa das microalgas (SHEEHAN et al., 1998).

Portanto a crescente necessidade de diminuir a poluição ambiental estimula o estudo de alternativas para substituição dos poluentes buscando energias renováveis para os setor industrial e de transporte. Sendo assim é necessário buscar o desenvolvimento e domínio da tecnologia e métodos mais eficientes de extração de óleo da biomassa microalga é de extrema importância por ser uma fonte em potencial para a produção de biocombustível (LOURENÇO, 2006).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a eficiência da extração de lipídeos da biomassa de microalga *Neochloris oleoabundans* e *Scenedesmus* sp. e analisar a produção de ésteres metílicos a partir do óleo da microalga *Neochloris oleoabundans*.

### 1.1.2 Objetivos específicos

Comparar diferentes métodos para a determinação de umidade na

biomassa de microalga, pelo método gravimétrico e aparelho titulador volumétrico.

Extrair a fração oleosa das espécies de microalgas *Neochloris oleoabundans* e *Scenedesmus* sp. utilizando diferentes métodos para rompimento da parede celular.

Avaliar a influência do método de extração de solventes no método a frio e método utilizando aquecimento.

Quantificar o teor de lipídeos das microalgas *Neochloris oleoabundans* e *Scenedesmus* sp. por método gravimétrico e espectroscopia por fluorescência.

Determinar as principais características físico-químicas do óleo da microalga *Neochloris oleoabundans* e avaliar o rendimento e conversão do óleo para obtenção de ésteres metílicos, visando à produção de biodiesel.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 BIODIESEL

O biodiesel é um biocombustível derivado de biomassa renovável para uso de motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamentação, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcialmente ou totalmente o combustível de origem fóssil (BRASIL, 2012).

Essa definição é ampla e possibilita a produção do biodiesel de diversas formas, uma vez que a conversão dos triglicerídeos em ésteres pode ocorrer por diversas rotas químicas: via transesterificação, pirólise e hidroesterificação. Entretanto, o processo mais comum para a produção de biodiesel, é a transesterificação (PARENTE, 2003).

Os primeiros estudos do biodiesel brasileiro foi conduzido pelo engenheiro químico Dr. Expedito José de Sá Parente, depositado sua patente em 1980 (ISOLANI. K; TONIN. J, 2013). Em 1980 foi criado a resolução nº 7 do Conselho Nacional de Energia, que estabeleceu o Plano de Produção de Óleos Vegetais para Fins Energéticos (PRO-ÓLEO), um programa governamental em âmbito nacional de incentivo ao uso de biocombustíveis, que esperava estabelecer a mistura de 30% de óleos vegetais. Porém, após a queda do preço do petróleo no mercado internacional, tornou-se questionável o plantio destas culturas para fins energéticos (PARENTE, 2003).

Sendo assim em 1998 foram retomados os projetos para o uso de biodiesel, em função da redução mundial de emissão de CO<sub>2</sub> devido a assinatura do protocolo de Kyoto, ocorrido em 1997. O Brasil assinou o acordo e se comprometeu em reduzir suas emissões em 5% até 2012 e também ocorreu o interesse em reduzir a dependência de petróleo e de outros combustíveis fósseis, não somente ao apelo ambiental, mas também a importância estratégica em diversificar a matriz energética brasileira (PARENTE, 2003).

Em 2004 o governo criou o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) e direcionou à Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) a responsabilidade de regular e fiscalizar as atividades relativas à produção, controlando a qualidade do produto, e distribuir, revender e

comercializar o biodiesel e a mistura óleo diesel-biodiesel (PARENTE, 2003).

O Governo Federal apoiou a crescente demanda por combustíveis de fontes renováveis e no potencial brasileiro para atender algumas necessidades, gerando empregos e renda na agricultura familiar e contribuindo para a economia e meio ambiente (PARENTE, 2003).

Em 13 de janeiro de 2005, Lei 11.097 o governo deu início a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira com o objetivo de inserir o biodiesel na matriz energética brasileira, criando o marco regulatório, sendo renovável, de inclusão social e de preservação ambiental (BRASIL, 2005).

A regulamentação da ANP nº. 14, de 11/05/2012, define o biodiesel como um “combustível composto de alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, produzido a partir de transesterificação ou esterificação de materiais graxos de gorduras de origem vegetal ou animal e que atenda as especificações contida no Regulamento Técnico nº. 4/2012” (BRASIL, 2012). Esta definição é semelhante à utilizada pela American Society of testing and materials (ASTM) e pela União Europeia (EN).

O regulamento técnico padroniza as análises que devem ser realizadas para garantir a qualidade do biodiesel nacional, segundo normas da ABNT, ASTM ou EN/ISSO. Dentre as análises para assegurar a qualidade do biodiesel se destaca as análises de acidez, ponto de fulgor, número de cetano, ponto de entupimento e viscosidade cinemática. Os valores permitidos são específicos em cada país, conforme apresentado no quadro 1.

**Quadro 1- Especificações do Biodiesel**

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	LIMITE	MÉTODO		
			ABNT NBR	ASTM D	EN/ISSO
Aspecto	-	LII (1) (2)	-	-	-
Massa específica a 20° C	kg/m <sup>3</sup>	850 a 900	7148 14065	1298 4052	EN ISO 3675 EN ISO 12185
Viscosidade Cinemática a 40°C	mm <sup>2</sup> /s	3,0 a 6,0	10441	445	EN ISO 3104

Teor de água, máx.	mg/kg	200,0 (3)	-	6304	EN ISO 12937
Contaminação Total, máx. (13)	mg/kg	24	15995	-	EN12662 (5)
<b><i>(Nota)</i></b>					
Ponto de fulgor, mín. (4)	°C	100,0	14598	93	EN ISO 3679
Teor de éster, mín	% massa	96,5	15764	-	EN 14103 (5)
Cinzas sulfatadas, máx. (6)	% massa	0,020	6294	874	EN ISO 3987
Enxofre total, máx.	mg/kg	10	15867	5453	EN ISO 20846 EN ISO 20884
Sódio + Potássio, máx.	mg/kg	5	15554 15555 15553 15556	-	EN 14108 (5) EN 14109 (5) EN 14538 (5)
Cálcio + Magnésio, máx.	mg/kg	5	15553 15556	-	EN 14538 (5)
Fósforo, máx. (7)	mg/kg	10	15553	4951	EN 14107 (5) EN 16294 (5)
Corrosividade ao cobre, 3h a 50 °C, máx. (6)	-	1	14359	130	EN ISO 2160
Número Cetano (6)	-	Anotar	-	613 6890 (8)	EN ISO 5165
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	(9)	14747	6371	EN 116
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50	14448 -	664 -	EN 14104 (5)
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02	15771 15908 (5) -	6584 (5) -	EN 14105 (5) EN 14106 (5)
Glicerol total, máx. (10)	% massa	0,25	15344 15908 (5)	6584 (5) -	EN 14105 (5)

Monoacilglicerol, máx.	% massa	0,7	15342 (5) 15344 15908 (5)	6584 (5)	EN 14105 (5)
Diacilglicerol, máx.	% massa	0,20	15342 (5) 15344 15908 (5)	6584 (5)	EN 14105 (5)
Triacilglicerol, máx.	% massa	0,20	15342 (5) 15344 15908 (5)	6584 (5)	EN 14105 (5)
Metanol e/ou Etanol, máx.	% massa	0,20	15343	-	EN 14110 (5)
Índice de lodo	g/100g	Anotar	-	-	EN 14111 (5)
Estabilidade à oxidação a 110°C, mín. (11)	h	6 (12)	-	-	EN 14112 (5) EN 15751 (5)

**Fonte:** ANP (2014).

### 2.1.1 Biodiesel de óleo de microalgas

A produção de biodiesel utilizando a biomassa de microalgas pode ser realizada por várias metodologias. Alguns aspectos influenciam diretamente na reação como o tempo reacional, tipo de catalisador, a razão molar álcool:óleo, a temperatura da reação, pureza dos reagentes e a quantidade de ácidos graxos livres presente na biomassa de microalga (CHISTI, 2007).

A rota para obtenção dos ésteres pode ocorrer em duas etapas, a primeira etapa com a extração do óleo de microalgas com o solvente orgânico, seguindo de um catalisador ácido, básico ou uma enzima (LI et al., 2007).

Outra rota alternativa para produção de biodiesel pode ser realizada por conversão em alta pressão e alta temperatura na ausência de um catalisador (HUANG et al., 2011; PATIL et al., 2011). Além disso pode ser utilizado método com altas concentrações de ácido sulfúrico, pois a umidade da biomassa é um fator limitante para a eficiência de conversão (JOHNSON; WEN, 2009; EHIMEN et al., 2010).

A rota convencional de produção de biodiesel pela biomassa de microalga é a partir da esterificação/transesterificação *in situ* (direta), esse processo tem sido utilizado com sucesso para produzir biodiesel, pois o biodiesel por extrações com solvente não são eficientes. Desta forma o processo de produção é simplificado, os resultados de transesterificação direta melhora os rendimentos em ésteres alquílicos, quando comparados a uma extração convencional. A esterificação e/ou transesterificação *in situ* é a conversão de ésteres alquílicos a partir de ácidos graxos livres e triglicerídeos presentes em um material biológico. A reação química envolve a adição de um álcool, um catalisador, e um material lipídico, podendo utilizar pressões atmosféricas e altas temperaturas (LEWIS et al., 2000).

Segundo Ehimen et al., (2010) a reação de esterificação *in situ* com *Chlorella* sp, utilizando 28% em massa de óleo, usando catalisador ácido sulfúrico foram alcançados com mais de 90% de conversão máxima teórica. As reações utilizando um período de até 8 horas foram obtidos maiores rendimentos com a temperatura de 60°C quando empregada acima dessa temperatura, incluindo pelo menos 4 mL de metanol por grama biomassa de microalga na razão molar de álcool: óleo de 1:5, e razão molar entre o óleo na biomassa e o catalisador deverá ser de 1:1.

De acordo com Johnson e Wen (2009) obtiveram um resultado eficiente com a esterificação *in situ* de células liofilizadas de microalga *Schizochytrium limacinum*, foi aumentado significamente pela adição de um solvente orgânico, a reação de esterificação a 90°C, por 40 min, usando metanol (7,4 mL/g de microalga), o rendimento dos ésteres foi de apenas 13% do total de materiais extraíveis com metanol e clorofórmio. Porém quando uma porção de 4 mL do metanol foi trocada por clorofórmio o rendimento em ésteres foi 10 a 20% maior.

## 2.1.2 Processos de obtenção de biodiesel

### 2.1.2.1 Transesterificação

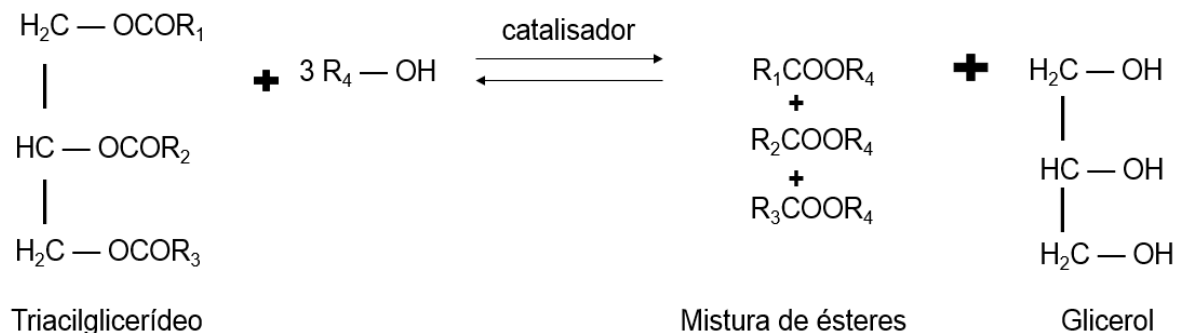
O processo mais comum de obtenção de biodiesel é a transesterificação de óleos vegetais e gorduras animais. O procedimento envolve a reação de um triglicerídeo com álcool de cadeia curta na presença de um

catalisador, dando origem a ésteres de ácidos graxos constituindo o biodiesel (PARENTE, 2003).

Segundo Mata, Martins e Caetano (2010), o mecanismo da reação inclui três passos reversíveis em série, na qual os triglicerídeos são convertidos em diglicerídeos, que por sua vez são convertidos em monoglicerídeos, assim estes monoglicerídeos são transformados em ésteres (biodiesel) e glicerol (produto).

A umidade do óleo deve conter teores baixíssimos para evitar a formação de sabões diminuindo a eficiência de conversão. A matéria-prima deve estar dentro dos parâmetros de qualidade de acidez e umidade, devendo obrigatoriamente analisar anteriormente o óleo para a reação para se obter um resultado satisfatório. A reação completa para transesterificação de óleos e gorduras é apresentada na figura 1 onde são necessários três mols de álcool para cada mol de triglicerídeos.

**Figura 1-** Reação de transesterificação



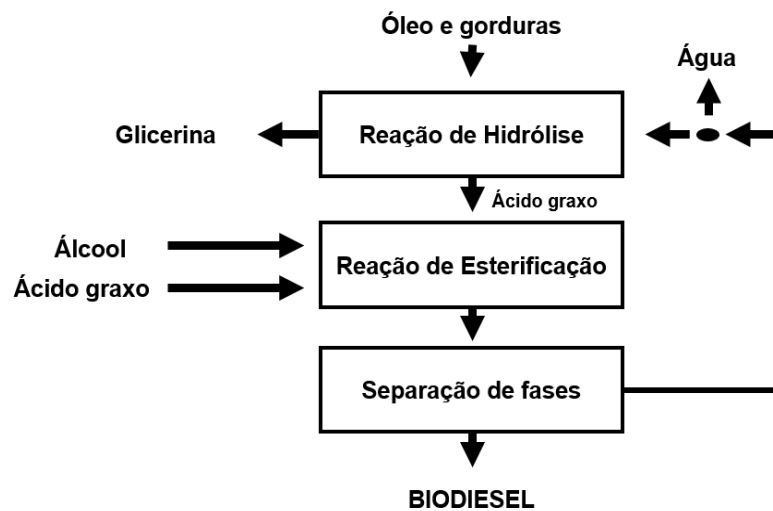
**Fonte:** RIVALDI et al., 2009

#### 2.1.2.2 Hidroesterificação

Recentemente vem sendo estudado o processo de hidroesterificação, o qual permite a utilização de qualquer matéria prima, independentemente do grau de acidez, da quantidade de umidade, podendo incluir matérias graxas residuais do processamento de óleos. Porém deve-se verificar a

quantidade de água presente, pois grandes quantidades pode levar a formação de sabões afetando o rendimento da matéria-prima, dificultando a separação do biodiesel e da glicerina (TAPANES et al., 2013). Existem ainda outros processos novos para produção de biodiesel, como por exemplo a transesterificação supercrítica, transesterificação enzimática, e esterificação de borras ácidas e craqueamento térmico. A hidroesterificação ocorre em duas etapas, a primeira etapa de hidrólise, seguida da etapa de esterificação conforme a figura 2.

**Figura 2-** Etapas do processo de hidroesterificação



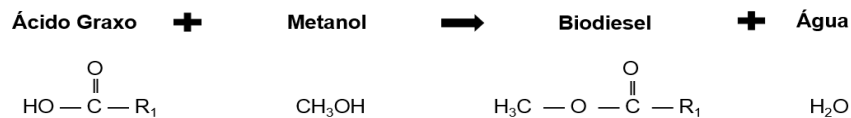
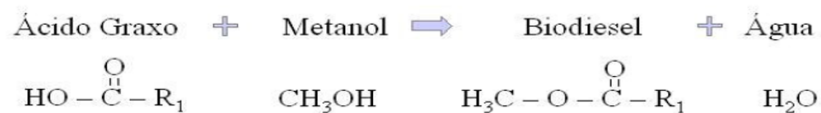
Fonte: TAPANES et., al (2013).

O processo de hidrólise consiste em uma reação química entre o óleo ou a gordura com a água, gerando ácidos graxos e glicerina. Seja qual for o grau de acidez e da umidade da matéria-prima o produto final da hidrólise contém acidez superior a 99%. Esse processo nessa reação obtém-se uma glicerina mais pura que a glicerina oriunda da glicerina obtida a partir da reação de transesterificação, pois essa glicerina possui um teor significativo de álcool, teor de sais e outras impurezas que se encontram contido na glicerina.

A segunda etapa (figura 3) da hidroesterificação ocorre após a hidrólise, onde a glicerina é removida e os ácidos graxos obtidos são esterificados pelo um álcool, que neutralizando a acidez. Deste modo o biodiesel é adquirido com elevada pureza, sem a necessidade de etapas de lavagem. Outro subproduto obtido

na reação é a água, retornando para o processo de hidrólise.

**Figura 3-** Reação de esterificação



**Fonte:** TAPANES et., al (2013)

## 2.2 RAZÃO MOLAR ESTEQUIOMÉTRICA

Os álcoois mais utilizados na transesterificação são o metanol e o etanol, não apenas por seu baixo custo, mas também por suas vantagens físico-químicas de cadeias mais curtas e alta polaridade. O metanol é mais utilizado por ser mais reativo, necessitando menor temperatura e menor tempo reacional. Entretanto, a rota etílica tem sido bastante estudada, pela menor toxicidade do etanol, em relação ao metanol e por ser oriunda de energia renovável, o que torna o ciclo produtivo do biodiesel ambientalmente menos agressivo.

A razão molar estequiométrica de álcool e óleo na transesterificação é de 3:1. Porém de acordo com Ramos et al. (2011), um excesso de álcool 6:1 pode ser utilizado a fim de maximizar a produção de ésteres graxos. De modo a relação entre a entrada de massa de matéria-prima e a produção em massa de biodiesel é cerca de 1:1, ou seja, teoricamente 1 quilograma de óleo resulta aproximadamente em 1 quilograma de biodiesel (MATA et al., 2010). Esse valor teórico é analisado levando em conta apenas a estequiometria da reação, um estudo sobre o equilíbrio químico da reação proporcionaria um resultado da máxima conversão que é possível

ser obtida no processo.

### 2.3 CATALISADORES

Conceitualmente o catalisador é uma substância que reduz a energia de ativação de uma reação química, aumentando sua velocidade de reação, porém não é consumido durante o processo. Os catalisadores podem ser ácidos, bases orgânicas, enzimas (lípsases) e entre outros (RAMOS et al., 2003).

Os principais catalisadores frequentemente utilizados nos processos de produção de biodiesel são os compostos de caráter alcalino. Na reação básica por exemplo, os catalisadores hidróxido de potássio (KOH), hidróxido de sódio (NaOH), e metóxido de sódio (NaOCH<sub>3</sub>). Entretanto, as metodologias que utilizam hidróxido de potássio e sódio são mais usados devido ao custo relativamente menor, quando comparado com metóxido de sódio. O índice de acidez do óleo é o que determina a concentração do catalisador, deste modo também pode ser usado a esterificação do óleo em meio ácido (RAMOS et al., 2003).

A reação de transesterificação com catalise básica de óleos vegetais ocorre mais rapidamente que a reação catalisada por ácido, proporcionando alta conversão, em menos tempo em temperaturas baixas. Esse tipo de reação básica pode ocorrer quando o óleo apresentar baixa umidade e baixo índice de acidez. Os catalisadores básicos são aplicados quando o índice de acidez do óleo estiver abaixo de 3% (m/m) (MA; HANNA, 1999). O álcool e triacilglicerídeos empregados na reação básica devem ocorrer na ausência de água, pois a água causa a reação de saponificação, diminuindo o rendimento e levando a produção de sabão (FREEDMAN et al., 1986; ZHANG et al., 2003; DEMIRBAS, 2005).

Os catalisadores mais utilizados na esterificação ácida são: ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), ácido clorídrico (HCl). A maneira correta de iniciar a reação é dissolver o catalisador no álcool e em seguida transferir para o reator com o óleo. A catalise ácida possibilita altos rendimentos em ésteres alquílicos, porém essas reações são mais lentas. As características dessa reação é que são usadas temperaturas elevadas, geralmente a 100°C, no período de 3 horas, para atingir um maior percentual de conversão (MA; HANNA, 1999; FUKUDA et al., 2009).

## 2.4 MICROALGAS

O termo microalga compreende dois grupos de organismos de diferentes estrutura celular: procariontes e eucariontes e dividem-se em vários subgrupos: *Chlorophyta* (algas verdes); *Phaeophytas* (algas pardas/marrons), *Rhodophyta* (algas vermelhas) e as *Cyanophyta* (algas azuis) (TORTORA et al., 2000; RAVEN et al., 2001).

As células das microalgas procariontes são mais simples, a característica mais distinta da célula procarionte é a ausência de membrana que reveste o material genético. Ou seja, o material genético não está envolvido na membrana do núcleo, deste modo o material fica disperso no citoplasma. Além disso não possui presença de organelas membranosas e estruturas como mitocôndrias, retículos endoplasmáticos, complexo golgi, vacúolos, citoesqueleto e conjunto de filamentos protéicos para formação de rede na célula. A célula possui ribossomos onde acontece a síntese das proteínas. Pode-se citar como microalga procariontes as algas azuis, cloroxibactérias, cianobactérias ou cianófitas (TORTORA et al., 2000).

As microalgas eucariontes são mais complexas quando comparadas às procariontes. A principal diferença está na presença do núcleo, onde o material é envolvido por uma membrana. A célula se destaca por possuir vários compartimentos diferentes separados pelas membranas. Dentre eles podemos citar as organelas membranosas, como o retículo endoplasmático, mitocôndria, cloroplastos e complexo golgi. Essas células também possuem citoesqueleto, portanto, realizam endocitose e exocitose. Pode-se citar as células eucariontes as microalgas verdes ou clorófitas (TORTORA et al., 2000; BARSANTI et al., 2008).

As *Rhodophytas* são um grupo de organismos que apresentam grande diversidade, aproximadamente 6.000 espécies, sendo diferenciadas dos outros grupos por algumas características. As principais características são os pigmentos de clorofila a, clorofila d, carotenoides e ficobilinas. A ficobilinas é um pigmento onde se dá a origem ao seu tom característico avermelhado. A parede celular das *Rhodophyta*, assim como das *Phaeophyta* e *Chlorophyta*, têm como componente principal a celulose (RAVEN et al., 2001). A celulose está presente na parede celular das *Rhodophyta* e se encontra envolvida por um material amorfo e

mucilaginoso, que é responsável pela resistência, flexibilidade e textura. Esse material contém como principais componentes o alginato, ágar, e carragenina (RAVEN et al., 2007).

Aproximadamente são conhecidas 1.500 espécies do grupo das algas *Phaeophytas*, predominam os mares e regiões temperadas frias e polares. Nos mares tropicais, as algas pardas apresentam um número reduzido de espécies, porém acumulam grande quantidade de biomassa. Em algumas regiões as algas *phaeophytas* formam imensas massas flutuantes (RAVEN et al., 2007).

A *Cyanophyceae* (cianofíceas) as algas azuis, algas verdes azuladas e, mais atualmente denominadas de cianobactérias, O termo cianobactérias é comumente utilizado, pois as características celulares são mais parecidas com as células procarióticas das bactérias do que com as células eucarióticas. Segundo Lee (2008) as cianobactérias apresentam três tipos de caminhos metabólicos: O quimioheterotróficos facultativos, ou seja, organismos que são capazes de se desenvolver na ausência completa de luz utilizando apenas um substrato orgânico como fonte de carbono. E na presença de luz são capazes de se desenvolver de forma fotoautotrófica. O segundo são os fotoautotróficos obrigatórios, esses organismos se desenvolvem somente na presença de luminosidade utilizando, principalmente, o CO<sub>2</sub> como fonte de carbono. E por fim o terceiro fotoheterotróficos, que são os organismos que dependem dos compostos orgânicos para fonte de carbono e luminosidade para o desenvolvimento e não se desenvolvem em ambientes afóticos.

A divisão *Chlorophyta* incluem as microalgas verdes (clorófitas), estão presentes em ambientes marinhos, mas a maioria encontra-se em águas continentais (água doce). Os talos das microalgas verdes podem ser filamentosos, foliáceos (parenquimatosos), cenocíticos ou crostosos. A parede celular da maioria das clorófitas são formadas por celulose e polissacarídeos não celulósicos. Os pigmentos encontrados são clorofila a e b, carotenos e xantofilas. A reserva é o amido onde fica armazenada dentro dos cloroplastos (RAVEN et al., 2007).

A grande maioria das espécies de microalgas com a finalidade para produção de lipídeos, proteínas, pigmentos e bioenergia (biogás, bioetanol e biodiesel) está inserido nos reinos Eubacteria e Eucarya especificamente dentro dos grupos cianófitas e clorófitas (LEE, 2011).

Quando se refere a nutrição as microalgas podem ser fotoautotróficas, heterotróficas ou mixotróficas. As microalgas fotoautotróficas dependem da fotossíntese e desta forma utilizam as fontes de energia a luz solar e dióxido de carbono para produzir carboidratos e trifosfato de adenosina (ATP). Microalgas heterotróficas utilizam compostos orgânicos produzidos pelas fontes externas para realizar as suas necessidades energéticas. Sendo assim a microalga heterotrófica depende de uma fonte externa para obter sua própria energia. As clorófitas e cianófitas obtêm o carbono do ambiente externo pelas substâncias dissolvidas ou de outras células como por exemplo as bactérias. A nutrição ocorre por heterotrofia facultativa e fototrofia obrigatória ou heterotrófica (ANDRADE; FILHO, 2014).

Microalgas mixotróficas apresentam fotoautotrofia e heterotrofia. Algumas espécies mixotróficas podem obter energia pela fotossíntese ou podem produzir por fontes de carbono disponível no meio. Organismos heterotróficos se adaptam facilmente em locais onde o fator de luz é limitado, a presença de microalgas fotoautotróficas e heterotróficas no mesmo habitat pode ser vantajosa, pois as autotróficas podem produzir nutrientes essenciais as microalgas heterotróficas (ANDRADE; FILHO, 2014).

As características de crescimento das microalgas são influenciados por fatores biológicos, físicos e químicos. Os fatores biológicos incluem taxas metabólicas da espécie cultivada, a influência de organismos contaminantes e fatores físico-químicos como temperatura, luz, salinidade e disponibilidade de nutrientes (TOMASELLI; RICHMOND, 2004).

#### 2.4.1 *Neochloris oleoabundans*

A espécie de microalga *N. oleoabundans* pertence à classe *Chlorophyceae* e família *Chlorococcaceae* encontrada em água doce. O teor de lipídeos é entre 35 a 65% possuindo assim um alto potencial para produção de biodiesel (GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009). Segundo Archibald (1973) atualmente existe 19 espécies do gênero *Neochloris*, porém 15 espécies morfologicamente são reconhecidas taxonomicamente.

A morfologia deste gênero são células vegetativas com cloroplastos esféricos e ocos, contendo pelo menos um pirenoide. A formação de zoóporos sem paredes e com dois flagelos do mesmo tamanho. São divididos em dois grupos: uninucleados e multinucleados. A diferença na morfologia e formação de grânulos e também na espessura da parede celular. Os tamanhos das células pode variar de acordo com a fase de crescimento, entre 2 a 5  $\mu\text{m}$ . A espessura da parede celular é entre 0,5 e 0,1  $\mu\text{m}$ . O posicionamento do núcleo nos zoóporos pode ser anterior, médio ou posterior. Na fase estacionária seu tamanho pode atingir até 25  $\mu\text{m}$  e a parede celular a 1  $\mu\text{m}$ . A espécie pode produzir vacúolos oleaginosos em células , e uninucleada na parede celular sendo mais espessa em um polo do que no outro (ATKINSON et al., 1972).

Esta microalga é tolerante a alto índice de alcalinidade, tolerância e salinidade, produzindo alto teor de lipídeos em sua biomassa mesmo sob condições mixotróficas de crescimento (BALDISSEROTTO et al., 2014).

#### 2.4.2 *Scenedesmus* sp.

A microalga *Scenedesmus* sp. pertence a família *Scenedesmaceae*, Ordem *Chlorococcales*, Classe *Chlorophyceae* e divisão *Chlorophyta* (LEE, 2008). Possui clorofila a e b, xantofilas (luteína e prasinoxantina) e os carotenóides  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . O produto fotossintético de armazenamento é o amido, composto de amilose e amilopectina formado dentro do cloroplasto (REYNOLDS. C, 2006). A parede celular da Família *Scenedesmaceae* é constituída por uma camada interna de celulose e uma ou várias de esporopolenina onde a mais externa pode apresentar ornamentações ou estruturas diversas (ATKINSON et al., 1972).

Estas microalgas são comumente encontradas no plâncton de água doce de rios, lagos e lagoas. O formato das células são elipsoidais, colônias planas e suas células se agrupam em número de 4 e 8, ou em alguns casos mais raros são de 16 ou 32 células (BICUDO; MENEZES, 2005). O teor de lipídeos pode ser entre 19,6 a 21,1% dependendo das condições nutricionais do meio (BECKER, 1994; HODAIFA et al., 2008).

Atualmente existem 13 gêneros de *Scenedesmaceae* que estão

morfologicamente e filogeneticamente bem definidos. Vários outros gêneros dessa família, como todo o grupo de crucigenioides, ainda estão sendo revisados (KRIENITZ; BOCK, 2012). No Brasil o gênero apresenta uma ampla distribuição em diversos ambientes aquáticos continentais (RAMOS. G et al., 2015).

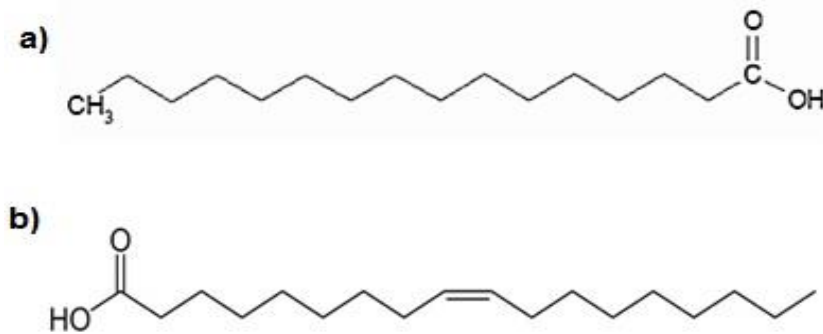
Segundo Bicudo e Menezes (2006) a microalga *Scenedesmus* pode ser encontrada em todos os locais principalmente nos eutróficos, com característica presente de um cloroplastídeo. Grande parte do gênero *Scenedesmus* foi reclassificada e inserida no gênero *Desmodesmus* pois apresentou uma importante característica, o espinho no cenóbio extremo.

É uma das mais importantes microalgas para a produção de biocombustíveis, devido a capacidade de crescer em diferentes tipos de águas residuais aliada a produção de biomassa, e teores de carboidratos e lipídeos (MATA et al., 2010).

## 2.5 COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA

### 2.5.1 Lipídeos

A biomassa de microalgas contém três componentes principais: carboidratos, proteínas e lipídeos. A matéria-prima utilizada para a produção de biodiesel deve ser rica em ácidos graxos (PEREIRA et al., 2012). A molécula de ácidos graxos é constituída por um grupo de ácido carboxílico ligado a uma extremidade de uma cadeia de hidrocarbonetos hidrofóbicos. Os ácidos graxos são componentes das moléculas de lipídeos, podendo ser neutros ou polares. Ácidos graxos saturados não possuem ligação dupla, e os ácidos graxos insaturados possuem pelo menos uma ligação dupla. A figura 4 (a) representa a estrutura dos ácidos graxos ácido palmítico e a figura (b) apresenta a estrutura do ácido oleico.

**Figura 4-** Estrutura dos ácidos graxos

**Fonte:** ROSE; CONNOLLYA, 1999.

Os lipídeos são moléculas biológicas solúveis em solvente orgânico. Suas moléculas são constituídas basicamente de átomos de hidrogênio e carbono, com menor quantidade de outros elementos como oxigênio, nitrogênio e fósforo. Os lipídeos podem ser classificados em duas categorias: lipídeos polares e neutros (DEMIRBAS, 2005; HALIM et al., 2012). Os lipídeos polares são ligados por forças eletrostáticas e pontes de hidrogênio, utilizando solventes polares capazes de quebrar as ligações e liberá-las, tais como fosfolipídeo e glicolipídeos (HAWTHORNE, 1988). Os lipídeos neutros são utilizados principalmente nas células de microalgas como armazenamento de energia, pois os lipídeos polares ficam entorno da membrana celular formando uma bicamada. Os acilglicerídeos consistem em ácidos graxos ligados a uma estrutura de glicerol sendo classificada de acordo com o número de ácidos graxos: triacilglicerídeo (TG), diacilglicerídeo (DG) e monoacilglicerídeos. Eles são ligados covalentemente e podem ser extraídos dos tecidos por solventes apolares.

A conversão do biodiesel ocorre com os lipídeos neutros. Existem alguns tipos de lipídeos neutros que não possuem ácidos graxos como hidrocarbonetos, esteróis, cetonas, pigmentos (carotenoides) e a clorofila. Essas frações lipídicas são solúveis em solventes orgânicos, mas não se convertem em biodiesel. O termo "óleo" é geralmente utilizado para referir-se a qualquer fração lipídica, onde visualmente se forma um líquido (HALIM et al., 2012; FRANCO et al., 2013).

O solvente utilizado na extração é um fator decisivo, pois a técnica de extração é importante para a avaliação do rendimento do óleo. É inviável a utilização de um único solvente para a extração dos lipídeos, porque os lipídeos possuem uma grande faixa de hidrofobicidade (FRANCO et al., 2013).

O perfil dos ácidos graxos extraídos de uma determinada espécie é afetado diretamente pelo ciclo de vida de microalgas, as condições de cultura, como a composição do meio, a temperatura, a intensidade de iluminação, fotoperíodo, e taxa de crescimento (GUZMÁN et al., 2010). Os ácidos graxos de microalgas variam de 12 a 22 carbonos, podendo ser saturado ou insaturado. Porém o número das ligações duplas nas cadeias de ácidos graxos não excede seis, e quase todos os ácidos graxos insaturados são isômeros *cis* (MEDINA et al., 1998). Quando os acilgliceróis apresentam menor grau de insaturação do que outras frações de lipídeos (ou seja, lipídeos polares), irão produzir ácidos graxos com maior estabilidade à oxidação (HALIM et al., 2012). Na tabela 1 é representado os principais perfis de ácidos graxos da microalga *N. oleoabundans* de acordo com autores da literatura.

**Tabela 1-** Perfil de ácidos graxos (%) da microalga *N. oleoabundans*

Ácidos graxos	Nomenclatura	GOUVEIA et al., 2009	SUN et al., 2014	TORNABENE et al., 1983	POPOVICH et al., (2012)
<b>C12:0</b>	Ácido láurico		0,30		0,12
<b>C14:0</b>	Ácido mirístico	0,43	1,14	1,6	0,89
<b>C16:0</b>	Ácido palmítico	19,35	19,48	15	19,40
<b>C16:1</b>	Ácido palmitoléico	1,85	3,90	3,5	0,94
<b>C18:0</b>	Ácido esteárico	0,98	3,35	11,0	5,75
<b>C18:1</b>	Ácido oleico	20,29	24,58	36,0	43,33
<b>C18:2</b>	Ácido linoleico	12,99	13,03	7,4	16,8
<b>C18:3</b>	Ácido linolênico	17,43	12,37		0,04
<b>C18:4</b>	Ácido estearidônico	2,10			
<b>C20:0</b>	Ácido araquídico			2,1	0,22

Na tabela 2 é apresentado os principais perfis de ácidos graxos da microalga *Scenedesmus* sp. de acordo com autores da literatura.

**Tabela 2-** Perfil de ácidos graxos (%) da microalga *Scenedesmus* sp.

Ácidos graxos	Nomenclatura	HALIM et al., 2012	JENA et al., 2012	CHEN et al., 2012	BALDEV et., al (2015)
<b>C12:0</b>	Ácido láurico	0,57			
<b>C14:0</b>	Ácido mirístico	5,33	0,7		
<b>C15:0</b>	Ácido pentadecanóico		0,3		0,20
<b>C16:0</b>	Ácido palmítico	38,12	30,3	18,42	0,61
<b>C16:1</b>	Ácido palmitoléico	3,92	6,5	2,31	
<b>C17:0</b>	Ácido margárico		2,6		
<b>C18:0</b>	Ácido esteárico	1,50	1,2	3,43	2,59
<b>C18:1</b>	Ácido oleico	26,45	17,5	49,64	11,60
<b>C18:2</b>	Ácido linoleico	7,26	21,1	11,30	34,23
<b>C18:3</b>	Ácido linolênico	6,10	9,2	8,26	10,37
<b>C20:0</b>	Ácido araquídico	4,04	0,1		0,76
<b>C22:0</b>	Ácido behênico	1,41	0,6		8,25
<b>C24:0</b>	Ácido lignocérico	1,61	0,3		

## 2.6 RUPTURA DA PAREDE CELULAR

Para a extração dos lipídeos é necessário o rompimento da parede celular da membrana plasmática, realizando a liberação dos lipídeos. Vários métodos podem ser aplicados dependendo da parede celular das microalgas e da natureza do produto a ser obtido (CRAVOTTO et al., 2008).

Os métodos mais utilizados para o rompimento das células são os não mecânicos, pois os métodos mecânicos podem desnaturar enzimas e proteínas presentes nas células. A extração por ação mecânica pode-se utilizar: moinhos de bolas, homogeneizadores, ultrassom, autoclaves ou secagem por nebulização. A extração pode ocorrer também por ação não mecânica, utilizando método de congelamento, liofilização, utilização de solventes orgânicos, choque osmótico ou

reações de ácidos, bases ou enzimas (AMARO et al., 2011).

A homogeneização celular envolve a passagem forçada do fluido através de um orifício, criando uma rápida mudança da pressão, levando a um elevado cisalhamento, causando a ruptura celular das microalgas. O nível de ruptura dos homogenizadores depende da pressão aplicada, da resistência da parede celular e do tamanho das células, alguns organismos são mais resistentes, possuindo parede celular mais espessa. A eficiência deste procedimento depende da dimensão das partículas, da agitação aplicada, do tempo do material no sistema, e das dimensões do equipamento (GREENWELL et al., 2010).

A técnica de rompimento da parede celular permite um melhor envolvimento do solvente no interior da célula, deste modo à agitação por ultrassom se destaca como uma das técnicas mais utilizadas (LEE et al., 2010; HALIM et al., 2012). No método por micro-ondas, as células são rompidas, pois a exposição a ondas nestas frequências provocam movimentação das moléculas pela migração dos íons, O aquecimento intracelular faz com que o vapor de água rompa as células (CRAVOTTO et al., 2008).

A agitação promovida utilizando o micro-ondas torna-se mais eficiente devido a sua ação na água da mistura contida no interior das células, ocasionando agitação intra e inter moleculares, gerando calor tanto de fora para dentro e quanto de dentro para fora, rompendo a célula e liberando as moléculas do citoplasma, das organelas e da parede celular. É um método fácil e rápido, e com pouco consumo de energia (PRABAKARAN; RAVINDRAN, 2011).

A técnica de choque osmótico consiste na redução da pressão osmótica, causando a ruptura da parede células das microalgas em solução, liberando componentes como lipídeos e proteínas (DEMIRBAS, 2005; PEREIRA et al., 2012; FRANCO et al., 2013).

A extração por fluido supercrítico pode extrair quase 100% dos lipídeos, mas necessita de um aparelho especial e fechado para a aplicação de pressão. Neste método, o CO<sub>2</sub> é liquefeito sob pressão e aquecido até seu ponto supercrítico, neste estado, este fluido líquido se desenvolve como um excelente solvente para extração do óleo das microalgas (FRANCO et al., 2013).

## 2.7 EXTRAÇÃO DA BIOMASSA DE MICROALGAS COM SOLVENTES ORGÂNICOS

Dentre os métodos não mecânicos para obtenção de lipídeos por biomassa de microalgas o que mais se utiliza é a extração com solventes. Os solventes frequentemente utilizados são: benzeno, clorofórmio, éter etílico, n-hexano, metanol, etanol, mistura de hexano-etanol, clorofórmio e metanol (RICHMOND, 2004).

De acordo com Halim et al.,(2012) os solventes apresentam riscos de explosão, o benzeno é um produto carcinogênio, A desvantagem em usar solventes para extração de lipídeos são os perigos existentes no seu manuseio e também aumentam o impacto ambiental. O etanol é um solvente socioambiental, capacitado em extrair alguns componentes como: aminoácidos, açúcares, sais, proteínas e pigmentos e para obtenção da biomassa lipídica sendo indesejado para a extração. A composição da fração lipídica extraída pode sofrer alterações de acordo com a polaridade do solvente polares, como o etanol e metanol, lipídeos apolares como triacilglicerídeos devem ser extraídos com solventes apolares, como o hexano, ou de média polaridade, como o clorofórmio (MATA et al., 2010). É necessário levar em conta os solventes mais baratos, e menos voláteis, com baixa toxicidade e imiscíveis em água (FRANCO et al., 2013; ESPINOSA. L et al., 2014).

### 2.7.1 Método com aquecimento

O método de Soxhlet (1879), é a técnica mais antiga para a extração de lipídeos, é uma das principais metodologias empregadas como referência de eficiência de extração.

O aparelho para a extração de lipídeos foi desenvolvido por Franz von Soxhlet em 1879, onde notou-se a importância do grau de trituração da amostra quanto a duração e eficiência em seu processo. O aparelho utilizado é o Soxhlet, pois é muito eficiente proporcionando vantagens em relação a outros métodos, pois o solvente permanece em constante contato com a amostra, sendo assim o solvente sempre está se renovando (SOXHLET, 1879). O método é constituído pelo

tratamento sucessivo da amostra imersa ao solvente puro, geralmente utilizado éter de petróleo, éter etílico ou n-hexano. A sifonagem ocorre com a condensação do solvente aquecido dentro de um balão acoplado a aparelhagem (SOXHLET, 1879).

Outras vantagens do método de soxhlet é em relação a temperatura do sistema, pois é mantida sempre alta, com o calor no processo de evaporação é constante, sendo uma metodologia simples, possibilitando a formação de uma miscela intracelular. As principais desvantagens são apresentadas no decorrer da extração, pois é utilizado grandes quantidades de solventes utilizado, onde não é somente um alto custo, mas também é nocivo à saúde, gerando a natureza um impacto ambiental. Para amostras mais sensíveis e termolábeis deve-se levar em consideração que um longo período de extração pode causar decomposição térmica, devido ao grande volume de solvente usado (SOXHLET, 1879).

## 2.7.2 Métodos a frio

### 2.7.2.1 Folch et al (1957)

O método de Folch et al., (1957), é conhecido como o método mais antigo de extração a frio, utilizando uma mistura de solventes clorofórmio e metanol, na proporção 2:1 utilizando tecidos de cérebro. Dentre os trabalhos realizados de extração a frio e temperatura ambiente diversos trabalhos foram publicados a partir do método de Folch et al., (1957), para obtenção de um extrato de boa qualidade, para que a fração lipídica não fosse afetada, para obtenção de um bom rendimento da extração, porém os solventes contém um alto grau de toxidez.

### 2.7.2.2 Bligh & dyer

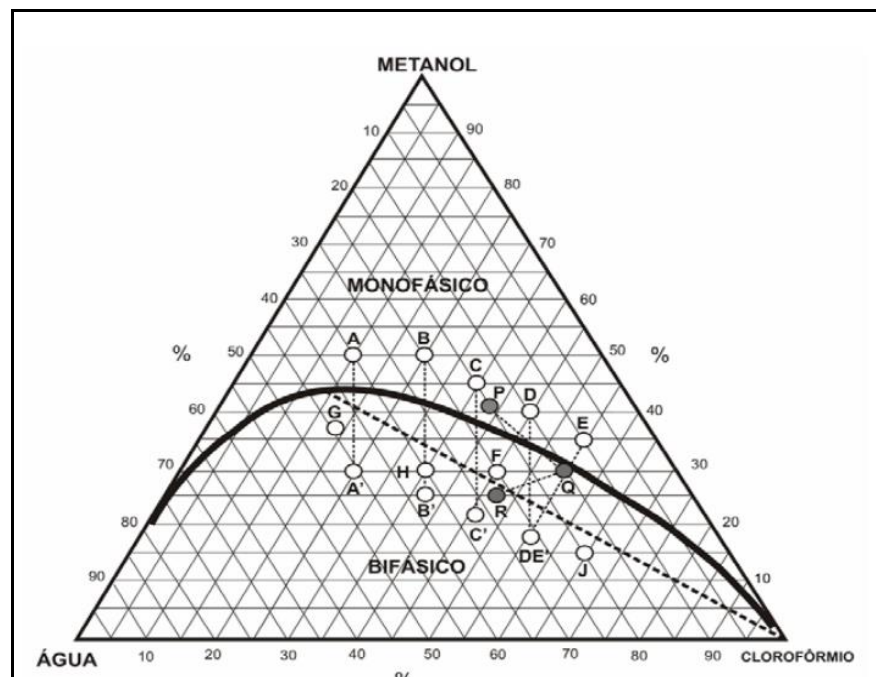
O método Bligh; Dyer (1959) é uma versão simplificada do método tradicional de Folch et al., (1957). O método utilizou músculo de peixe, descrevendo procedimentos onde materiais biológicos como lipídeos podem ser extraídos e purificados. É uma extração versátil e efetiva, superando o fator de oxidação indesejada influenciando a qualidade final da fração lipídica. O método é vantajoso,

pois relaciona uma mistura binária de clorofórmio e metanol, com capacidade de extrair os lipídeos polares com eficiência, a escolha do método de extração influencia significativamente no resultado final.

A insolubilidade dos lipídeos em água torna possível sua separação das proteínas, carboidratos e da água nos tecidos, pois os lipídeos tem grande faixa de relatividade de hidrofobicidade, concluindo que é inviável a utilização de um único solvente universal para a extração dos lipídeos. Os lipídeos neutros são ligados covalentemente e podem ser extraídos dos tecidos por solventes apolares, entretanto os lipídeos polares estão ligados por forças eletrostáticas e pontes de hidrogênio, sendo assim requerem solventes polares capazes de quebrar tais ligações e liberá-los (BLIGH; DYER, 1959).

O método é uma formação de um sistema bifásico a partir de proporções de solventes adicionados durante o processo de extração. A formação desse sistema bifásico está baseada na teoria liquido-liquido de três componentes, clorofórmio, metanol e água. A determinação das solubilidades de cada componente pode ser avaliada por um diagrama ternário de solubilidade de dois líquidos parcialmente miscíveis entre si (clorofórmio e água), com terceiro solvente (metanol) conforme a figura 5.

**Figura 5-** Diagrama de fases clorofórmio-metanol-água (%) a 20°C.



**Fonte:** BLIGH; DYER (1959)

Para uma maior eficiência da extração é importante que o clorofórmio deve ser adicionado antes da água e cada adição deve ser seguida por agitação, deste modo ocorre uma rápida separação das fases e em um bom rendimento lipídico (BLIGH; DYER, 1959).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 MATERIAIS

A biomassa de microalga utilizada foi a espécie *N. oleoabundans* (UTEX 1185) fornecida pelo Instituto Agronômico do Paraná - IAPAR, Sede Londrina, e a *Scenedesmus* sp. foi fornecida pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, Campus Curitiba, Sede Ecoville.

O óleo bruto da microalga *N. oleoabundans* (UTEX 1185) foi fornecido pelo Instituto Agronômico do Paraná- IAPAR, Sede Londrina.

#### 3.2 CULTIVO DA BIOMASSA DE MICROALGAS

A microalga *N. oleoabundans* (UTEX1185) foi cultivada no Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), no período de 15 dias em junho de 2014, em tanque aberto no interior da casa de vegetação de vidro utilizando bombas submersivas. O meio de cultivo foi a solução nutritiva proposta por Furlani et al. (1999), inoculado a (10% v/v) utilizando 200 litros do inóculo em 2000 litros com solução nutritiva em pH 9 (SILVA, 2016).

A microalga *Scenedesmus* sp. foi cultivada pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), a partir de 22 de maio de 2014. O cultivo foi realizado em fotobiorreatores de placas planas com 512 L de capacidade, o meio de cultivo utilizado foi o Chu com condições naturais de luz e temperatura sendo suplementado com as emissões da queima do carvão vegetal do estabelecimento da churrascaria (CAVALCANTI, 2015).

#### 3.3 MÉTODOS

##### 3.3.1 Extração do óleo

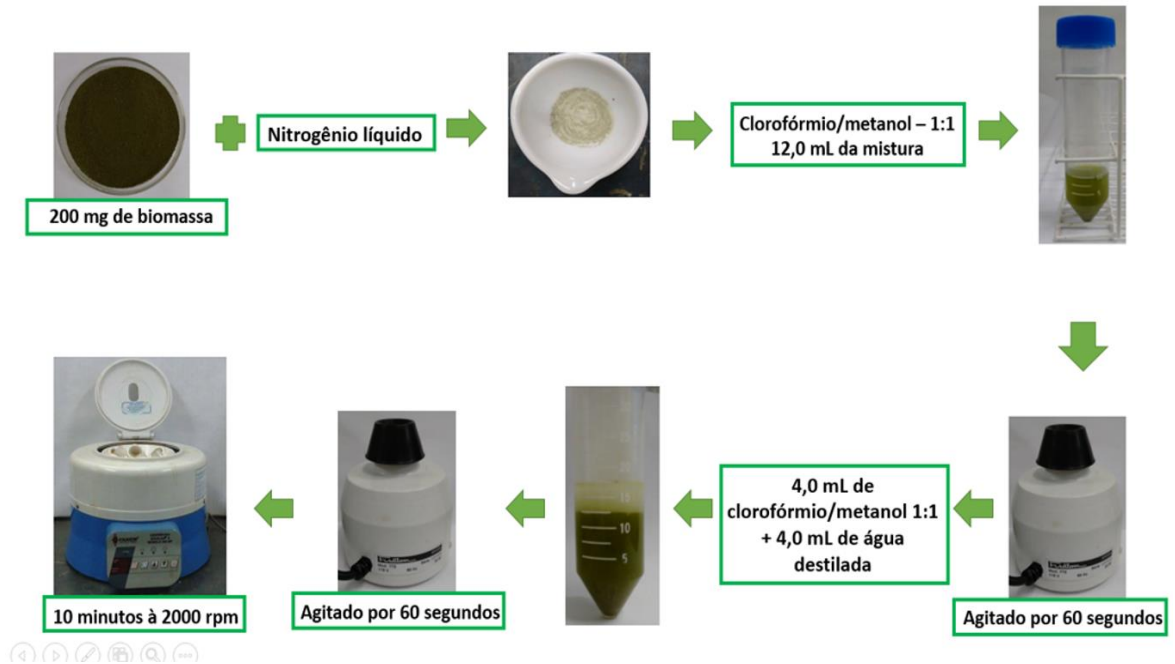
A extração de lipídeos a partir da biomassa de microalgas foi realizada com misturas de solventes, a frio e com aquecimento.

### 3.3.1.1 Extração de lipídeos utilizando mistura de solventes a frio

De acordo com o método Bligh & Dyer otimizado (RYCKEBOSCH et al., 2012), foram pesados 0,200 g da biomassa em uma balança analítica (precisão: 0,001g, OHAUS) e maceradas com nitrogênio líquido em um cadinho de porcelana, em seguida foram transferidas para um tubo falcon de 50 mL. Aos tubos contendo a biomassa foram transferidos 12 mL de uma mistura clorofórmio/metanol 1:1 (v/v), e agitado durante 1 minuto em um vortex (FISATOM). Posteriormente foram adicionados mais 4,0 mL da mistura de solventes clorofórmio/metanol 1:1 (v/v) e 4,0 mL de água destilada. O tubo foi agitado em vortex durante mais 1 minuto e posteriormente centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos. A fase aquosa foi removida e descartada com o auxílio de uma pipeta de pasteur. O tubo foi novamente levado a centrífuga (FANEM) a 2000 rpm durante 10 minutos e então a fase solvente foi retirada e transferida para outro tubo falcon. A biomassa depositada no fundo do tubo falcon foi utilizada para uma reextração.

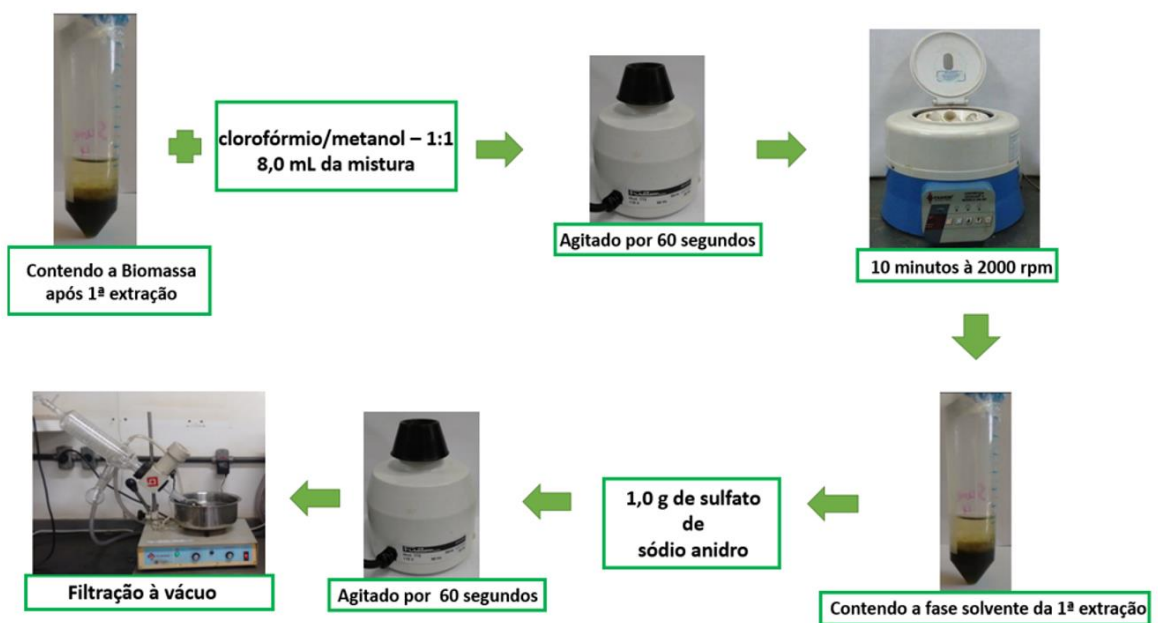
A reextração foi adicionado ao tubo contendo a biomassa foram adicionados 8,0 mL da mistura de solventes (clorofórmio e metanol) na proporção 1:1 (v/v), em seguida agitado em vortex por 1 minuto, logo após centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos. A fase solvente foi retirada e transferida para o tubo contendo a solução da primeira extração. Ao tubo contendo as duas extrações foi adicionado 1,0 g de sulfato de sódio anidro e agitado em vortex durante 30 segundos para a retirada da umidade (água) restante na fração lipídica/solvente. Em seguida, esta solução foi filtrada a vácuo utilizando papel filtro número 1. O extrato filtrado foi transferido para um balão de fundo redondo previamente tarado, onde foi acoplado ao rota evaporador para evaporação completa do solvente utilizando somente o vácuo sem aquecimento. A figura 6 representa a primeira etapa de extração de lipídeos a frio

**Figura 6-** Primeira etapa de extração de lipídeos a frio



A figura 7 representa a segunda etapa de reextração de lipídeos a frio.

**Figura 7-** Segunda etapa de extração de lipídeos a frio, reextração



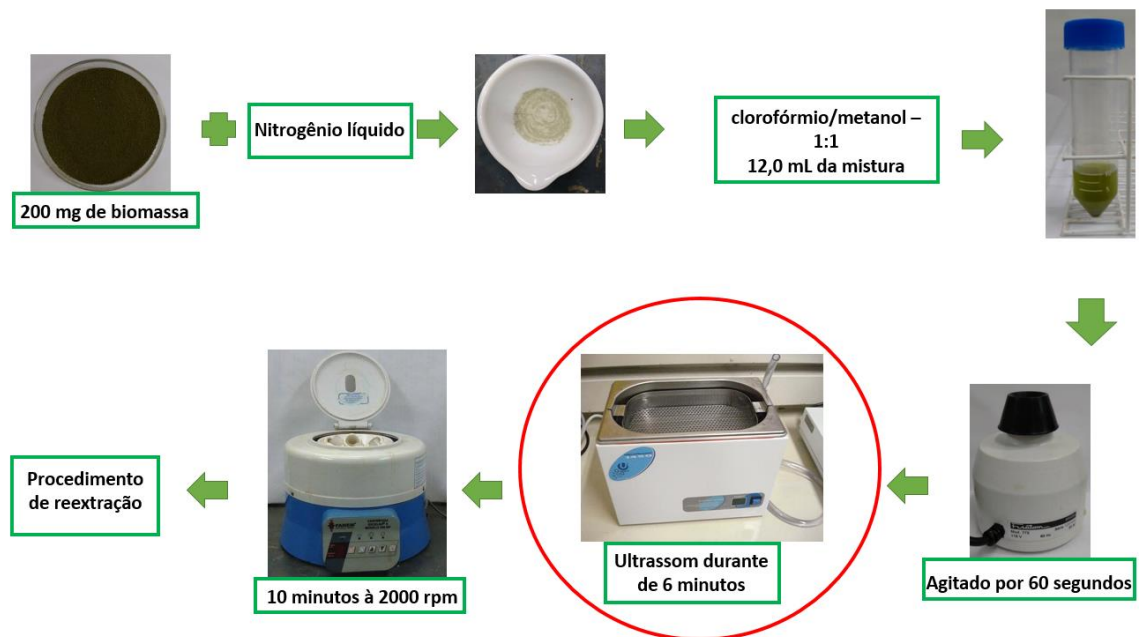
### 3.3.1.2 Extração de lipídeos com mistura de solventes a frio e uso de ultrassom

A extração de lipídeos utilizando agitação por ultrassom foi realizada de acordo com o método Bligh & Dyer otimizado (RYCKBOSCH, 2012), pois segundo Mubarak (2015) obteve uma maior eficiência na extração utilizando agitação por ultrassom.

A massa equivalente a 0,200 g da biomassa de microalgas foi maceradas com nitrogênio líquido em um cadinho de porcelana, em seguida foi transferida para um tubo Falcon de 50 mL, e adicionados 12 mL da mistura clorofórmio/metanol 1:1 (v/v) e durante 1 minuto no agitador e homogenizador do tipo vortex. Logo após a amostra foi agitada por ultrassom (UNIQUE) em frequência de 25 kHz durante 6 minutos. Em seguida foi novamente homogeneizado e a amostra foi centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos.

Para a reextração ao tubo contendo a biomassa foram adicionados 8,0 mL da mistura de solventes (clorofórmio e metanol) na proporção 1:1 (v/v), em seguida agitado em vortex por 1 minuto, logo após centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos. A fase solvente foi retirada e transferida para o tubo contendo a solução da primeira extração. Ao tubo contendo as duas extrações foi adicionado 1,0 g de sulfato de sódio anidro e agitado em vortex durante 30 segundos para a retirada da umidade (água) restante na fração lipídica/solvente. Em seguida, esta solução foi filtrada a vácuo utilizando papel filtro número 1. O extrato filtrado foi transferido para um balão de fundo redondo previamente tarado, onde foi acoplado ao rota evaporador para evaporação completa do solvente utilizando somente o vácuo sem aquecimento. A figura 8 representa a extração de lipídeos a frio utilizando ultrassom.

**Figura 8-** Extração de lipídeos a frio utilizando ultrassom



### 3.3.1.3 Mistura de solventes com aquecimento

A extração foi realizada de acordo com o método SOXHLET (1879), utilizando como solvente o hexano e a mistura clorofórmio/metanol 1:1 (v/v). A massa equivalente a 1,0 g da biomassa de microalga foi colocada em um cartucho de celulose e inserido no extrator Soxhlet com 150 mL de hexano ou a mistura de clorofórmio/metanol na temperatura de 60°C até peso constante. Após o período da extração dos lipídeos o restante do solvente ainda presente no balão foi evaporado em estufa a 60°C até peso constante. Em seguida foi transferido para dessecador contendo sílica gel. As extrações foram realizadas em duplicata, assim foi calculado o desvio padrão da média.

### 3.3.2 Teor de lipídeos

#### 3.3.2.1 Método gravimétrico

Para determinação do teor lipídico extraído foi utilizado o método gravimétrico. Os extratos foram transferidos para balões de fundo redondo previamente lavado, seco e determinado e levado ao rotaevaporador, no qual o solvente foi evaporado sob vácuo, a temperatura de 30°C. Posterior à evaporação os balões foram transferidos para um dessecador com sílica gel durante duas horas e em seguida foram pesados. O cálculo para a determinação do rendimento foi determinado conforme a equação 1.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Massa do extrato (g)}}{\text{Massa da biomassa inicial (g)}} \times 100\% \quad \text{Equação 1}$$

As extrações foram realizadas em triplicata e assim foi calculado o desvio padrão da média.

#### 3.3.2.2 Método por espectroscopia de fluorescência

As análises de quantificação de lipídeos neutros e polares foram adaptada pelo método descrito pelos autores Alonzo;Mayzaud (1999). As soluções foram analisadas por espectroscopia de fluorescência em Espectrofluorímetro SHIMADZU-R5301PC no modo de emissão com comprimento de onda de excitação em 540 nm e varredura de emissão de 550 a 700 nm. Foram calculadas as áreas integradas dos espectros utilizando o software Personal Fluorescence RF530-PC versão 1.40, com o mesmo intervalo de 550 a 700 nm. Foram avaliadas tempo de reações da intensidade de fluorêscencia do Nile red nos tempos de: 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 minutos.

Para o preparo do corante Nile red primeiramente foram pesados

equivalente a massa de 2,5 mg do corante e transferidos para um balão volumétrico de 50 mL, completando o volume com acetona.

O padrão comercial de trioleína foi pipetado  $27,8 \mu\text{L mL}^{-1}$  e transferido para o balão de 50 mL, completando o volume com acetona. A partir dessa solução estoque foi pipetado 1 mL e transferido para um balão de 10 mL, completando com acetona o seu volume. A curva padrão de trioleína foi realizada na faixa de concentração de 0,010 a  $0,025 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Foi realizado a quantificação lipídica a partir do extrato lipídico, onde foi realizado uma diluição em acetona no balão volumétrico de 50 mL. Em seguida a partir dessa solução estoque foram pipetados 1 mL e transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, completando seu volume. Posteriormente foram pipetados 1 mL a partir dessa solução, e transferidos para o balão volumétrico de 10 mL, completando seu volume com acetona.

Para leitura no espectrofluorímetro (marca Shimadzu, modelo RF-5301PC) foram realizadas amostras em balões volumétricos de 5 mL. No balão volumétrico foram adicionados  $12,5 \mu\text{L mL}^{-1}$  da amostra final diluída, e  $18,5 \mu\text{L mL}^{-1}$  de Nile red e em seguida foi completado o volume com acetona.

Para a quantificação da biomassa de microalgas foram pesados 8 mg da biomassa de microalga e transferido para um balão de 100 mL, completando o volume com água destilada. Foi verificado no espectrofotômetro (marca Pró-análise, modelo V-1200) a densidade óptica e fixado o valor da amostra de 0,06 abs em 670 nm.

Verificado a absorvância foi pesado 8 mg da microalga e transferida para um balão de 100 mL completando com acetona. Em seguida foi realizada a leitura de absorvância no espectrofotômetro.

Para a leitura no espectrofluorímetro foi realizada amostras no balão volumétrico de 5 mL. No balão volumétrico foram adicionados 1 mL da amostra da biomassa de microalga, acrescentando  $19 \mu\text{L mL}^{-1}$  de Nile red e em seguida foi completado o volume com acetona.

### 3.3.3 Determinação do teor de umidade na biomassa de microalga

#### 3.3.3.1 Determinação do teor de umidade em aparelho titulador volumétrico

Para análise do teor de umidade na biomassa de microalga foi utilizado o aparelho titulador volumétrico, marca SI Analytics, modelo TitroLine® 7500 KF. A massa equivalente a 2,0 g foi pesada no frasco de vidro e inserido no aparelho titulador volumétrico. Em seguida foi iniciado a titulação no equipamento. O procedimento foi realizado em triplicata e os resultados das amostras foram calculados em porcentagem.

#### 3.3.3.2 Determinação do teor de umidade pelo método gravimétrico

De acordo com o método de análise de umidade e matérias voláteis do Instituto Adolfo Lutz (MDQ-283), foram pesados 2,0 g de biomassa em balança analítica e em seguida foram adicionadas em cadinhos de porcelana (lavados e calcinados antes do uso), e colocados em estufa para a secagem em temperatura de 110°C até peso constante. As amostras foram resfriadas no dessecador com sílica gel até a temperatura ambiente, posteriormente foram pesadas. A massa seca (MS) da amostra foi obtida pela equação 2:

$$MS (\%) = 1 - \frac{\text{Massa final da amostra após secagem (g)}}{\text{Massa inicial da amostra úmida (g)}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

### 3.4 OBTENÇÃO DE ÓLEO DE MICROALGA PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

A microalga *N. oleoabundans* pertence a coleção de microalgas do Instituto Agrônomo do Paraná. A microalga foi cultivada em tanques abertos por 9 dias. A colheita foi realizada por floculação utilizando floculante TANFLOC SL (polímero orgânico-catiônico). Posteriormente a biomassa úmida foi colhida e seca em estufa ventilada a 60°C (SILVA, 2016).

A extração e obtenção do óleo de microalga foi realizada de acordo com (Instituto Adolfo Lutz, 2008), utilizando o solvente n-Hexano em dois aparelhos de extrator Soxhlet com capacidade de 1 L. Para a remoção do solvente e ocorrer a separação do óleo foi realizada pelo rotaevaporador.

### 3.4.1 Análises físico-químicas do óleo de microalga *N. oleoabundans*

Para a caracterização do óleo foi determinado o índice de acidez, índice de saponificação e teor de umidade.

#### 3.4.1.1 Determinação do índice de acidez

O índice de acidez foi determinado pelo método AOCS Ca 5a-40. O índice de acidez define o estado de conservação do óleo, pela quantidade de mg de hidróxido de sódio necessário para neutralizar os ácidos graxos livres em um grama de amostra.

Em um Erlenmeyer, foram dissolvidos 0,200 g de amostra de óleo da microalga em 5 mL de álcool etílico, na presença de fenolftaleína como indicador. Após agitação, a amostra foi titulada com soluções alcólicas de NaOH 0,1 N. O volume gasto na titulação foi usado para calcular o índice de acidez. A determinação foi realizada em triplicata para cada amostra. O índice de acidez foi calculado pela equação 3.

$$1A = \frac{V \times N \times 28,2}{M} \quad \text{Equação 3}$$

Onde,

1A= é o índice de acidez, expresso em miligrama de hidróxido de sódio por grama;

V = volume gasto na titulação, expresso em mL

N = Normalidade exata da solução de hidróxido de sódio;

M = massa da amostra, expressa em (g);  
 28,2 = fator de correção

#### 3.4.1.2 Determinação do índice de saponificação

Para determinação do índice de saponificação das amostras de óleo de microalga, foi utilizado o método ABNT NBR 10448: 2012. O índice de saponificação é definido como a massa em mg de hidróxido de potássio (KOH), necessário para saponificar um grama da amostra.

Foram pesados 0,500 g da amostra em um erlenmeyer e adicionado 25 mL de solução etanólica de hidróxido de potássio 0,5 N. Em seguida a solução foi aquecida até ebulição por 60 minutos utilizando-se um condensador de refluxo. A solução foi titulada com ácido clorídrico 0,5 N padronizado, na presença de fenolftaleína como indicador. A titulação em branco foi realizada seguindo as mesmas condições anteriores. O cálculo para determinação do índice de saponificação foi realizado utilizando a equação 4.

$$IS: ((56,1 \times (V_0 - V_1)) \times N_e) / m$$

Equação 4

Onde,

IS= é o índice de saponificação;

$V_0$ = é o volume da solução e ácido clorídrico gasto na prova em branco, expresso em mililitros (mL);

$V_1$ = é o volume da solução de ácido clorídrico gasto com a amostra, expresso em mililitros (mL);

$N_e$ = é a normalidade exata do ácido clorídrico;

m= é a amostra, expressa em (g);

#### 3.4.1.3 Determinação do teor de umidade

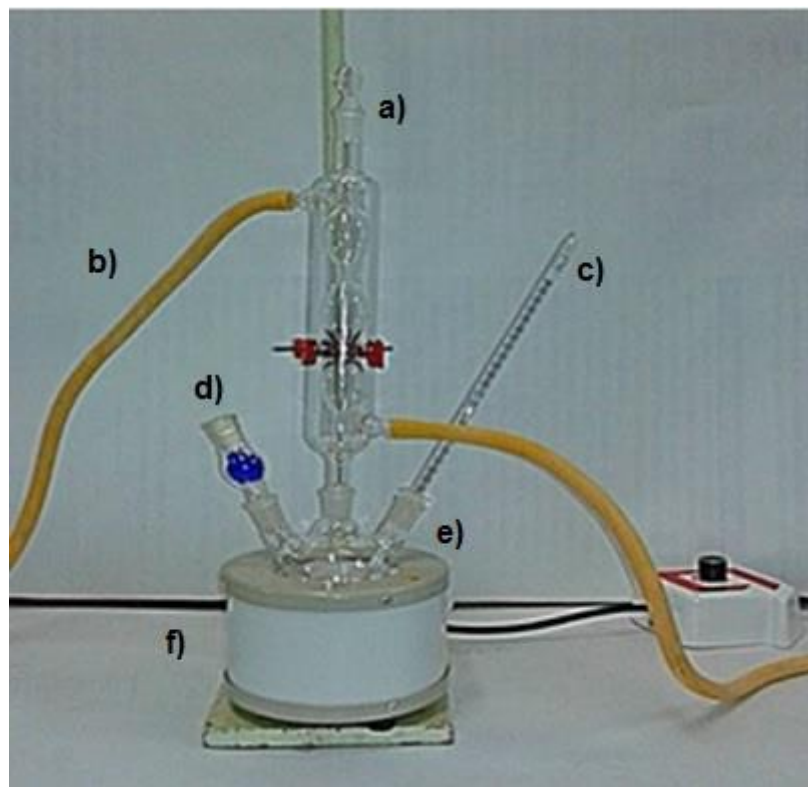
Para análise do teor de umidade no óleo de microalga foi utilizado o aparelho titulador volumétrico, marca SI Analytics, modelo TitroLine® 7500 KF.

Em um frasco de vidro foi pesado a massa equivalente a 2,0 g de óleo da microalga *N. oleoabundans* e adicionada ao aparelho titulador volumétrico. Após a retirada do óleo do frasco de vidro foi verificado a diferença do frasco e inserida o valor da massa no equipamento e iniciado a titulação no equipamento. O procedimento foi realizado em triplicata e os resultados das amostras foram calculados em porcentagem.

#### 3.5 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ÉSTERES

Foi realizado o ensaio para obtenção de ésteres alquílicos, a partir do óleo de microalga *N. oleoabundans*, utilizando a metodologia adaptada descrita por Johnson e Wen (2009). Primeiramente foram pesados 570 mg de óleo de microalga e adicionadas em um balão de fundo redondo de três bocas. Em seguida foi adicionado 3,4 mL de álcool metílico, 4,0 mL de clorofórmio e 0,6 mL de ácido sulfúrico. A figura 9 representa o sistema para reação de refluxo para obtenção do biodiesel.

**Figura 9-** Sistema de reação de refluxo para obtenção do biodiesel. O condensador de bolas (a) foi acoplado à entrada central do balão de fundo redondo (e). No condensador de bolas foi inserida uma mangueira para o resfriamento da reação (b), em uma das entradas laterais foi inserido o termômetro de mercúrio de junta esmerilhada (c), e em outra foi inserido uma válvula de segurança para evitar o aumento da pressão do sistema contendo sílica (d), a manta aquecedora (f) foi mantida em 60°C durante 40 min.



Após o término da reação, as amostras foram resfriadas até atingirem temperatura ambiente e em seguida foram adicionados 2 mL de água destilada. Após a decantação a fase inferior foi retirada denominada biodiesel foi encaminhada para análise.

### 3.5.1 Análise em cromatografia em camada delgada

A técnica de cromatografia em camada delgada consiste na separação dos componentes de uma mistura através do deslocamento sobre uma

camada delgada (adsorvente) sobre uma superfície plana (fase estacionária – sólida) (COLLINS et al., 2006). A conversão do biodiesel foi analisada qualitativamente por cromatografia em camada delgada utilizando placas cromatográficas ALUGRAM Xtra SIL G/UV254 da marca (Macherey-Nagel) com fase móvel hexano/metanol (0,97;0,03) (v/v). Após a eluição a placa cromatográfica foi revelada com vapor de iodo. Os resultados foram calculados pela equação 5 a seguir, pelo Fator de retenção ( $R_f$ ), representa a razão entre a distância percorrida pela substância em questão ( $d_s$ ) e a distância percorrida pela fase móvel ( $d_m$ ) (PAVIA et al., 2010).

$$R_f = \frac{d_s}{d_m}$$

Equação 5

### 3.5.2 Análise em cromatografia em fase gasosa

As análises cromatográficas foram realizadas de acordo com a norma EN 14103- Determinação de teor de ésteres.

O cromatógrafo utilizado foi o Shimadzu 2010 GC plus, com volume de injeção de 1  $\mu$ L no modo de injeção split, utilizando coluna Rtx-Wax (30m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m), a eluição utilizou gás de arraste Hélio na temperatura do volume de injeção a 250°C. O padrão interno utilizado na amostra foi o heptadecanoato de metila.

#### 3.5.2.1 Preparação do padrão interno

Primeiramente foi pesado 500 mg de heptadecanoato de metila em um balão volumétrico de 50 mL e em seguida completado com heptano para obter solução de 10 mg/mL de concentração.

### 3.5.2.2 Preparação da amostra

Foi pesado 250 mg do óleo de microalga em um balão de 10 mL e adicionado 5 mL de heptadecanoato de metila.

## 4 RESULTADO E DISCUSSÃO

A quantificação do lipídeo total é de grande importância para a indústria de biodiesel, pois a identificação de uma espécie de microalga com maior produtividade resultará em maior conversão de biodiesel. Portanto, o método de extração de lipídeos da biomassa de microalga deve ser o mais eficiente e seletivo.

No item a seguir são apresentados os resultados e discussões obtidos para a extração do lipídeo total das duas espécies de microalgas estudadas.

### 4.1 EXTRAÇÃO DO ÓLEO COM MISTURA DE SOLVENTES A FRIO

O método de extração por solvente de Bligh-Dyer e otimizado por Ryckbosch (2012) quando comparado ao método Soxhlet (1879) foi o método que obteve maiores teores de lipídeo extraído, utilizando uma proporção clorofórmio, metanol e água de 1:1:0,6(v/v/v).

Segundo Ryckbosch et al., (2012) obteve resultados eficiente empregando a presença de água com a mistura de solventes orgânicos, e o processo de reextração permitindo um maior contato intracelular para a retirada mais eficiente do lipídeo. Os teores de lipídeos por Ryckbosch et al., (2012) foi de 96% e por (KAIWAN-ARPORN et al., 2012) foi de 18,58%.

A mistura dos solventes na extração se deve ao conceito da química, de “semelhante dissolve semelhante”, pois é o princípio básico no processo de extração de lipídeos. Para extração dos lipídeos podem ser usados solventes polares e não-polares. Os solvente polares podem ser utilizados como o metanol, acetona, etanol e acetato de etilo, os solventes não-polares podem ser usados: hexano, benzeno, tolueno, clorofórmio, éter dietílico. Os solventes não polares atrapalham as interações hidrofóbicas entre lipídeos neutros e não-polares presentes na biomassa de microalgas (MUBARAK et al., 2015).

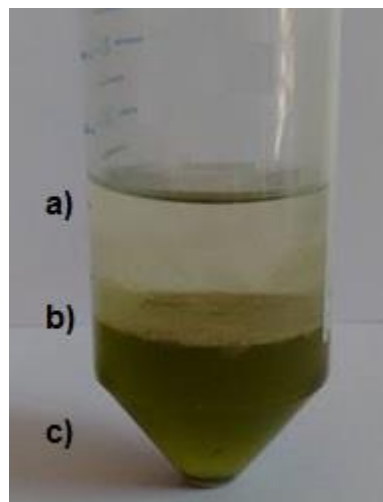
As ondas agem como um método de rompimento das células, para promover um maior contato com o solvente, os estudos utilizando extração por ultrassom e micro-ondas, buscando-se o máximo de remoção dos lipídeos. De acordo com os autores BALASUBRAMANIAN et al., (2011) realizaram comparações

de extrações utilizando hexano como solvente, com e sem irradiação de micro-ondas. O resultado de extração por micro-ondas permitiu maior recuperação dos lipídeos, gerando uma maior proporção de ácidos graxos poli-insaturados. Outra comparação foi realizada utilizando os métodos de rompimento celular, usando ultrassom, micro-ondas, moagem com nitrogênio líquido e lipase enzimática. Os resultados dos métodos de rompimento celular indicaram a moagem com nitrogênio provocando uma maior eficiência entre os métodos comparativos (FRANCO et al., 2013).

Segundo Tsukui; Rezende (2014) o método por microondas é bastante utilizado para extração de óleo de microalgas, porém o método utiliza aquecimento em alta frequência, sendo que a eficiência do método é devido ao aquecimento por microondas sendo a principal vantagem da técnica. O emprego de recipientes fechados permite o uso de temperaturas mais elevadas, acelerando o processo extrativo. Isso é devido as ondas eletromagnéticas que consistem dos componentes de campo elétrico e magnético, a irradiação do microondas é na faixa de frequência entre 0,3 a 300GHz ou seja, o uso de microondas é diferente quando comparado ao uso de ultrassom (KAPPE et al., 2009).

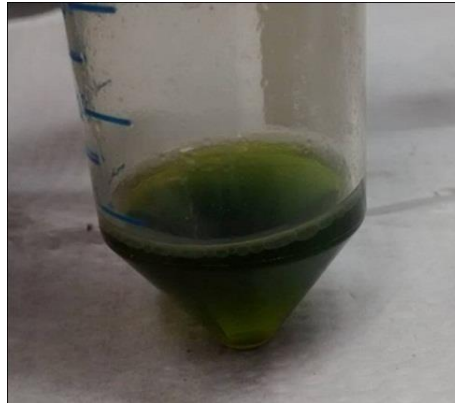
A extração lipídica em mistura de solvente clorofórmio:metanol:água na proporção 1:1:0,6 mostrou a formação de três fases. A figura 10 apresenta a fase superior composta por metanol e água, proteína e carboidratos (a), a fase intermediária (b) apresenta a biomassa de microalga e a inferior constituída de clorofórmio e lipídeos (c).

**Figura 10-** Processo de extração



A figura 11 apresenta a fração lipídica no procedimento de extração com misturas de solventes a frio.

**Figura 11-** Fração lipídica no processo de extração



O procedimento de extração foi realizado em triplicata para os dois tipos de microalgas, *N. oleoabundans* e *Scenedesmus* sp. Os resultados são apresentadas na tabela 3, a média dos teores de lipídeos para as diferentes condições de extração a frio.

**Tabela 3-** Teor de lipídeo da biomassa de microalgas utilizando extração a frio (%)

Espécie de microalga	Método de extração	Média $\pm$ desvio padrão	Coefficiente de variação
<i>Neochloris</i>	Bligh–Dyer	12,77 $\pm$ 2,54	19,89
<i>oleoabundans</i>	Bligh–Dyer/ ultrassom	3,00 $\pm$ 0,59	19,67
<i>Scenedesmus</i> sp.	Bligh–Dyer	12,82 $\pm$ 0,76	5,93
	Bligh–Dyer/ ultrassom	12,48 $\pm$ 0,65	5,21

A extração pelo método Bligh–Dyer extraiu 4,25 vezes mais do que usando o processo de desruptura celular. Já para a *Scenedesmus* sp. os teores foram de 12,82 e 12,48% com coeficiente de variação em média de 5,0%, mostrando que os dois métodos (Bligh-Dyer e ultrassom), podem ser utilizados para a extração de lipídeos para esta espécie.

Conclui-se que uma fração do lipídeo contido na *N. oleoabundans* pode estar na fase metanol/água onde é descartada após a centrifugação no

processo de extração, resultando em uma diminuição no teor de lipídeo.

Outro método muito utilizado para o rompimento da parede celular é do uso de micro-ondas, pois esse aparelho emite ondas que fazem uma vibração das moléculas para o rompimento da parede celular, porém esse método pode ocasionar um aumento muito rápido de temperatura, e conseqüentemente a degradação mais rápida dos lipídeos presente na biomassa de microalga. Sendo assim o método com o ultrassom foi escolhido onde as ondas extraem compostos com peso molecular baixo aumentando o rendimento devido a sua eficiência e demanda energética menor.

A biomassa de microalgas *N. oleoabundans* e *Scenedesmus* sp. foram fornecidas liofilizadas, mas é essencial realizar a determinação do teor de umidade na biomassa pois esse material tem grande capacidade de absorção de água. A liofilização é uma técnica que pode ser denominada de criosecação ou criodesidratação. Para a realização do procedimento é necessário congelar previamente a amostra, pois a transformação ocorre de soluções aquosas em uma mistura de duas fases em cristais de gelo e solução concentrada de amostra. Entretanto, ao aplicar liofilização, caso tenha presença de grandes cristais de gelo ocorre uma rede cristalina, resultando em uma boa estrutura porosa, facilitando a libertação de vapor de água no processo, assim como a entrada de água numa posterior reidratação.

A liofilização ocorre em duas etapas: A primeira etapa é a desidratação primária, onde ocorre a maior perda de água da amostra, e desidratação secundária, que visa retirar os resquícios de água ainda possivelmente existentes. Na desidratação primária, a água é removida por sublimação, sob vácuo e com adição de calor. Uma parte deste calor é consumido quando as moléculas passam do estado sólido para o gasoso, levando a uma diminuição temperatura da amostra congelada. A fase secundária, também pode ser denominada de dessorção, ela ocorre após todo o gelo ter sido todo eliminado. Nesta etapa a amostra é levada a temperaturas entre 20 e 60 °C, mantendo a vácuo, ocorrendo assim a evaporação dos resquícios de água ainda existentes. A vantagem dessa técnica como conservação dos componentes da amostra, facilidade de transformar em pó, facilidade de reidratar e mínima perda de atividade em materiais sensíveis ao calor. As desvantagens desta técnica, é em relação aos custos do processo, assim como o

tempo necessário para que uma amostra fique liofilizada (TERRONI. H et al., 2013)

Os teores de umidade das espécies de microalgas *N. oleoabundans* e *Scenedesmus* sp. foram determinados com a finalidade de comparação entre o método convencional, o método gravimétrico comparando com o método analítico, o Karl Fischer.

A determinação da quantidade de água pela gravimetria é um dos métodos comumente, esse método é baseado na remoção da água por temperatura, onde o aquecimento é absorvido. O período de secagem costuma levar muito tempo para o calor atingir as proporções internas da biomassa. A evaporação por longo tempo pode resultar numa remoção incompleta da água (SKOOG; HOLLER, 2005)

O uso do aparelho Karl Fischer é um método preciso, pois o sistema é automático que controla os procedimentos de operação e melhoram tanto em relação ao tempo de análise quanto a reprodutibilidade, quanto a precisão dos resultados.

Os resultados das três repetições do teor de umidade para a biomassa das microalgas foram calculados a média, desvio padrão e coeficiente de variação para ambos métodos utilizados conforme apresentado na tabela 4.

**Tabela 4-** Teor de umidade da biomassa de microalgas utilizando o método Karl Fischer e gravimetria (%)

Espécie de microalga	Método	Média $\pm$ desvio padrão	Coeficiente de variação
<i>Neochloris</i>	Karl Fischer	23,57 $\pm$ 1,36	5,77
<i>oleoabundans</i>	Gravimetria	21,87 $\pm$ 0,1	0,46
<i>Scenedesmus</i> sp.	Karl Fischer	9,96 $\pm$ 0,37	3,71
	Gravimetria	6,65 $\pm$ 0,16	0,41

Analisando os resultados da tabela 4 foi possível verificar os mesmos teores de umidade para ambos os métodos utilizados para as duas espécies de microalga. Os dados obtidos pela gravimetria exibiram um coeficiente de variação mais baixo do que o apresentado pelo método Karl Fischer, ou seja, obteve-se dados mais homogêneos para as triplicatas do experimento.

De acordo com valores obtidos em três repetições para o teor de

umidade das espécies de microalgas os teores lipídicos foram recalculados apresentados na tabela 5. Foi observado um aumento no teor de lipídeo para as duas espécies quando os resultados foram considerados em biomassa de microalga seca.

**Tabela 5-** Teor de lipídeo em biomassa de microalga seca a partir da extração a frio (%)

Espécie de microalga	Extração	Extrações			Média ± Desvio Padrão
		1º	2º	3º	
<i>Neochloris</i>	Bligh–Dyer	12,5	16,62	18,75	15,96 ± 3,17
<i>oleoabundans</i>	Bligh–Dyer/ ultrassom	3,94	2,94	4,37	3,75 ± 0,53
<i>Scenedesmus</i> sp.	Bligh–Dyer	13,27	14,89	14,56	14,24 ± 0,73
	Bligh–Dyer/ ultrassom	14,56	13,94	13,11	13,87 ± 0,35

A extração por solvente geralmente é realizada diretamente a partir da biomassa liofilizada (*in situ*), é um método rápido e eficiente que reduz ligeiramente a degradação do lipídeo. Mesmo com a biomassa liofilizada é necessário realizar a determinação do teor de umidade na biomassa. O processo de liofilização ocorre para a retirada da água por sublimação, portanto a água ligada a compostos não é retirada apenas a citoplasmática (MATA et al., 2010).

O lipídeo das microalgas é ligado nas células pela parede celular e por uma membrana celular resistente. Assim, a interrupção das células de microalgas é extremamente importante para liberar o lipídeo fora da célula para facilitar a extração. Quando ocorre a ruptura celular ocorre cisalhamento, atuando na parede celular de modo que a célula se rompa. O uso de ultrassom funciona pelas oscilações criando cavidades, que implodem com ondas de choque realize a ruptura da parede celular (WANG. D et al., 2015).

Algumas microalgas são conhecidas por ter a ultraestrutura da parede celular como estrutura trilaminar e especialmente a *Scenedesmus* sp. Ela possui três camadas muito sólidas (camada celulósica, camada média e organelas celulares). Sendo assim vários processos de pré-tratamento são utilizados para melhorar o rendimento da extração lipídica (W.-Y. CHOI et al., 2014). A parede celular da *Scenedesmus* sp. é constituída por uma camada interna de celulose e uma ou várias de esporopolenina onde a mais externa pode apresentar

ornamentações ou estruturas diversas (ATKINSON et al., 1972).

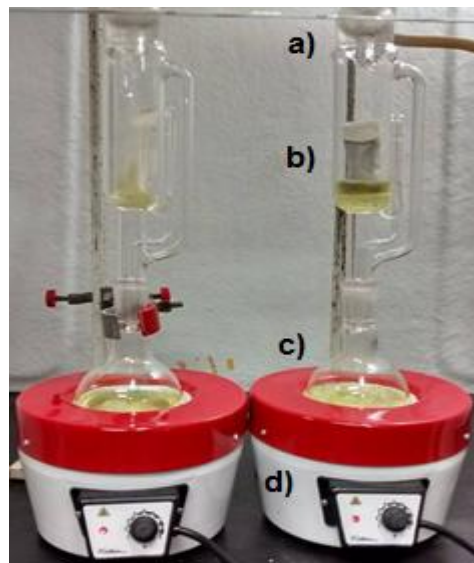
Considerando que o esqueleto da parede celular de *N. oleoabundans* é predominantemente construído por celulose e proteínas na parede celular, o tamanho da célula varia de 2 a 6  $\mu\text{m}$ . Ocorreu algumas diferenças nos mecanismos de interrupção nas células da microalga *Neochloris oleoabundans*, houve fortes agitações nas células e não apenas os lipídeos das células foram quebradas, mas também como outros componentes da microalga resultando em um resultado menor de 3,75% quando utilizado Bligh–Dyer/Sonicação.

#### 4.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO COM MÉTODO DE AQUECIMENTO

O procedimento de extração por Soxhlet usando o solvente clorofórmio/metanol e hexano na proporção de 1:1, é a mesma proporção usada na extração sem aquecimento, o método de Bligh-Dyer.

Segundo LUQUE DE CASTRO; GARCIA-AYUSO (1998), as vantagens deste método são: a amostra está sempre em contato com o solvente, havendo sua constante renovação, é uma metodologia muito simples que possibilita a extração de uma quantidade maior de óleo em relação a outros métodos, sem a necessidade de filtração da micela após o término da extração, pois a amostra esteve envolta no cartucho durante todo o procedimento. A figura 12 apresenta o processo de extração de lipídeos no aparelho soxhlet utilizando biomassa de microalgas.

**Figura 12-** Processo de extração de lipídeos no aparelho soxhlet. O sifão permite o refluxo contínuo do solvente e o cartucho de celulose com a biomassa de microalga (b) acoplado ao balão volumétrico (c). No balão volumétrico fica o solvente e no condensador ocorre o refluxo de água. O balão volumétrico é aquecido com uma manta (d) de modo que o solvente entre em ebulição. O vapor condensa e goteja no cartucho solubilizando os lipídeos. Quando o reservatório enche e atinge a altura do sifão ele transborda levando o solvente e o extrato para o balão.



Os principais fatores envolvidos na degradação do óleo durante a reação é devido a temperatura e tempo de aquecimento. A temperatura é um dos principais aspectos da qualidade. Os resultados do processo de extração com aquecimento são apresentados na tabela 6 onde foram calculados a média, desvio padrão e coeficiente de variação.

**Tabela 6-** Teor lipídico na biomassa de microalga utilizando aparelho Soxhlet (%)

Espécie de microalga	Solvente	Média $\pm$ desvio padrão	Coeficiente de variação
<i>Neochloris oleoabundans</i>	clorofórmio/metanol 1:1	1,07 $\pm$ 0,01	0,93
	hexano	0,4 $\pm$ 0,31	77,5
<i>Scenedesmus</i> sp.	clorofórmio/metanol 1:1	11,67 $\pm$ 0,49	4,2
	hexano	8,07 $\pm$ 0,18	2,23

Os valores obtidos para o teor de umidade das duas espécies de microalgas os teores lipídicos foram recalculados para o método de extração de lipídeo com aquecimento confoem a tabela 7.

**Tabela 7-** Teor lipídico obtido na extração utilizando como solventes em biomassa seca (%)

Espécie de microalga	Solvente	Extrações		Média ± Desvio Padrão
		1º	2º	
<i>Neochloris oleoabundans</i>	clorofórmio/metanol 1:1	1,33	1,35	1,34 ± 0,01
	hexano	0,24	0,78	0,51 ± 0,38
<i>Scenedesmus sp.</i>	clorofórmio/metanol 1:1	12,58	13,36	12,97 ± 0,09
	hexano	8,82	9,11	8,96 ± 0,20

Os valores obtidos nas extrações a quente, foi possível observar que a extração utilizando a mistura de clorofórmio/metanol 1:1 (v/v) é mais eficaz do que o hexano para ambas as microalgas analisadas, isto devido à diferença de polaridade de solventes. Portanto a mistura clorofórmio/metanol resulta em uma maior polaridade quando comparado ao hexano.

De acordo com Byreddy et al., (2015), uma combinação de solventes polar e apolar seria capaz de extrair um maior percentual lipídico quando comparado a um solvente individual, no entanto a eficiência da extração de lipídeos depende das espécies de algas e suas composições pré-existentes de lipídeos.

Em seu trabalho Shin et al., (2014) estudou a extração lipídica da microalga *Scenedesmus sp.* para posterior produção de biodiesel e obteve valores de 14,5% para a extração a frio, método Bligh-Dyer, e 5,9% para a extração a quente, método Soxhlet utilizando como solvente hexano, valores muito próximos dos obtidos neste trabalho, 12,97% e 8,96 respectivamente.

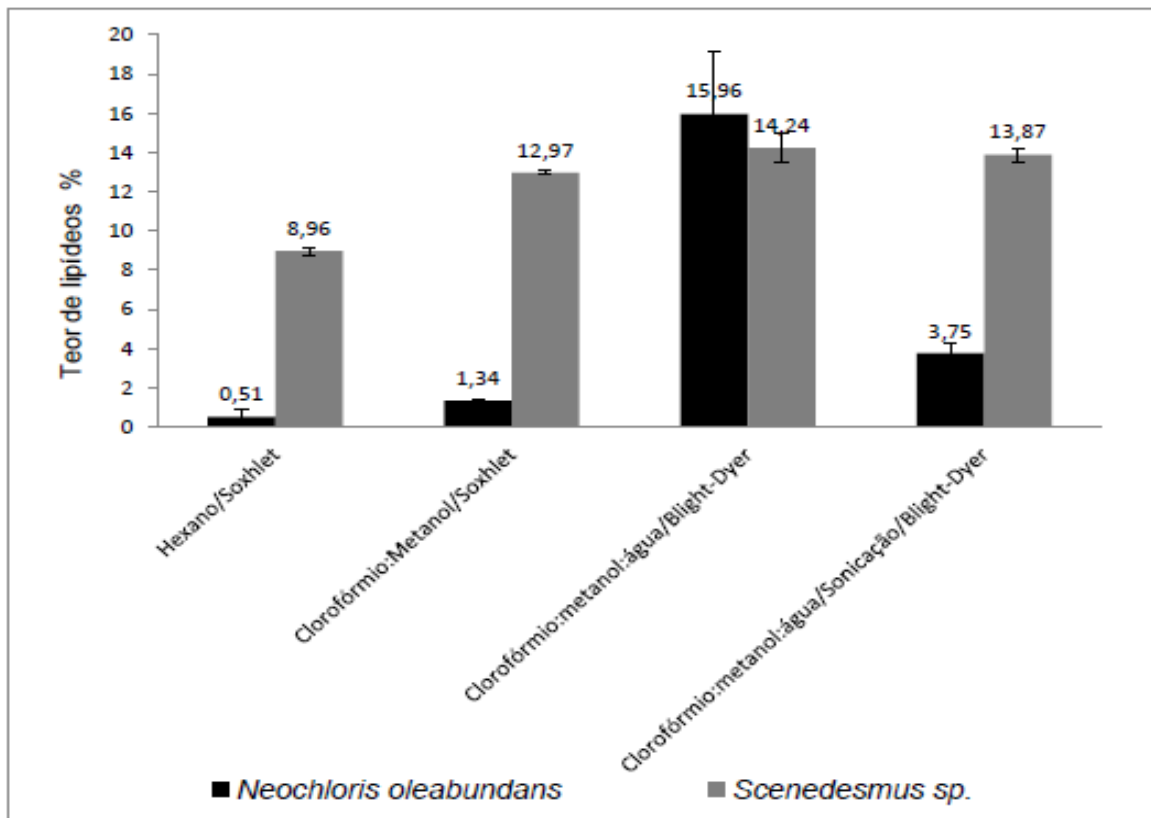
Mata et al., (2010) cita em seu artigo de revisão que a microalga *N. oleoabundans* possui uma faixa de 29,0% a 65,0% (m/m) de teor lipídico, no entanto não especifica a metodologia utilizada. Os teores de lipídeos obtidos para esta espécie no trabalho foram de 15,96% para a extração a frio (Bligh-Dyer), 3,75% para

a extração a frio (Bligh-Dyer) com método de desruptura por sonicação, 1,34% para a extração clorofórmio/metanol (1:1) a quente (Soxhlet) e 0,51% para a extração a quente (Soxhlet) utilizando hexano como solvente. Os teores de lipídeos obtidos neste trabalho foram muito abaixo do que os teores referenciados por Mata et al., (2010), esta diferença pode ser justificada não somente pelo menor desempenho da extração por soxhlet, mas também pelo armazenamento e cultivo da microalga.

Esta espécie *N. oleoabundans* ficou congelada durante 12 meses, e foi descongelada três vezes. O processo de descongelamento causa ruptura celular, e degradação da biomassa, fatores estes que podem ter influenciado no resultado final do teor de lipídeo. Além dos fatores que levam a conclusão de baixa conversão esta relacionados a sua composição bioquímica e a natureza de sua parede celular.

A Figura 13 mostra a comparação dos teores de lipídeos obtidos para a microalga *N. oleoabundans* e *Scenedesmus sp.* utilizando os métodos a frio (Bligh-Dyer) e a quente (Soxhlet).

**Figura 13-** Média do teor de lipídeos na biomassa de microalga pelos métodos de extração



Observou-se que o método de extração a frio clorofórmio/metanol/água 1:1:0,6 (Bligh-Dyer) obteve um maior teor de lipídeo para ambas as espécies, sendo de melhor eficiência.

As espécies *N. oleoabundans* possui uma faixa de teor de lipídeo de 29,0% – 65,0% e a espécie *Scenedesmus* sp. possui teor de lipídeo de 19,6% – 21,1% (MATA et al., 2010).

O método de extração a frio utilizando com solvente clorofórmio/metanol/água foi mais eficiente extraíndo 67,5% do teor citado na literatura, já para a espécie *N. oleoabundans* o método foi capaz de extrair 24,5% do o teor máximo citado (65,0%). No entanto a espécie *N. oleoabundans* obteve 10,77% a mais de teor lipídico extraído quando comparada à *Scenedesmus* sp., sendo assim uma espécie de melhor rendimento.

O soxhlet além de ter sido uma técnica com desempenho inferior, vale ressaltar que extrações com refluxo de solvente por muitas horas devem ser evitadas já que favorecem as reações de peroxidação e de hidrólise, podendo comprometer resultados analíticos posteriores, como a quantificação de determinados componentes lipídicos (HAWTHORNE, 1988).

#### 4.3 MÉTODO POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

A linearidade permite avaliar os resultados da curva de calibração, pois são proporcionais a concentração do analito presente na amostra. A linearidade do método foi determinada pela análise do padrão troléina em diferentes concentrações, construindo uma curva analítica. A precisão do método analítico é um parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra (ANVISA, 2003).

De acordo com os autores Bertozzini et al., (2011) o Nile red é um fluoróforo, componente que faz com que a molécula seja fluorescente. O grupo funcional da molécula absorve energia de um comprimento de onda emitindo em outro ponto de comprimento de onda maior. A quantidade de energia emitida e o seu comprimento de onda emitida depende exclusivamente do próprio corante (fluoróforo), e da composição química.

O tempo de coloração do corante Nile red foi investigado, a fim de determinar a fotodegradação da amostra. Os melhores picos foram identificados na figura 14 onde foram alcançadas a coloração em tempo ideal em 2 e 30 minutos. O corante Nile red demonstrou ineficiente a partir de 30 minutos exibindo instabilidade dos picos.

**Figura 14-** Intensidade de fluorescência em intervalos de tempo (minutos)

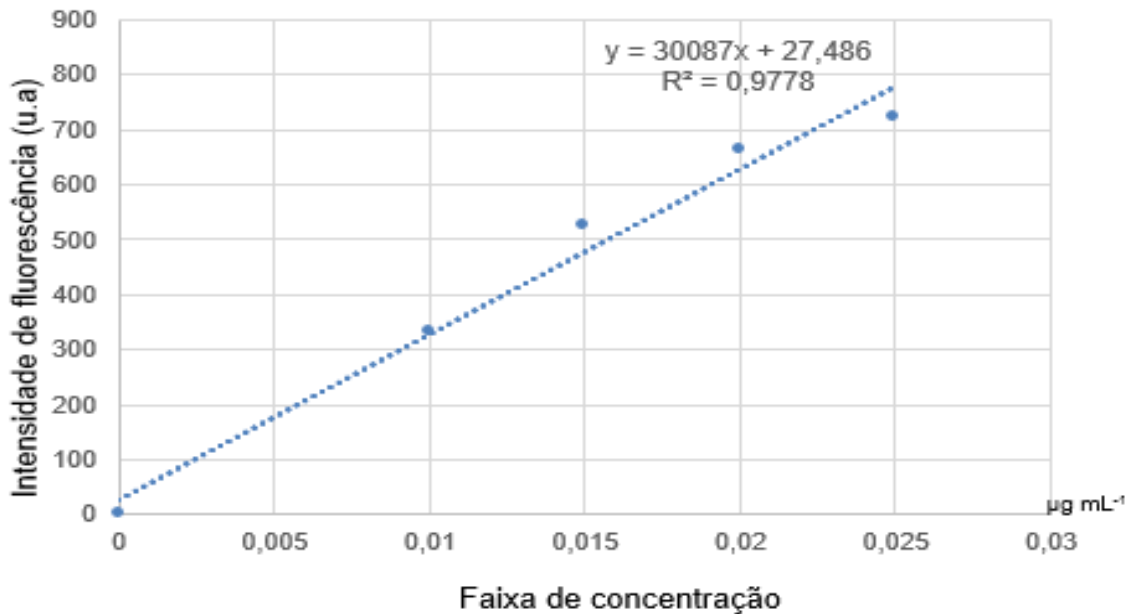


Segundo Govender et al. (2012) a intensidade de fluorescência tende a diminuir. Portanto o tempo de análise foi padronizado para 30 minutos de irradiação, para assegurar que o corante apresente uma eficiência em todas as leituras. Sendo assim, todos os dados deste trabalho foram adquiridos com 30 minutos de reação após a adição do corante. Assim como as amostras foram preparadas ao abrigo de luz, pois o corante Nile red degrada quando é exposto a luz.

A fluorescência intracelular do Nile red varia com as diferentes microalgas devido a estrutura e composição das paredes celulares espessas e rígidas (GREENSPAN. P; FOWLER. S, 1985; GAO et al., 2008; CHEN et al., 2009; COOPER et al., 2010). De acordo com os resultados obtidos o corante Nile red conseguiu introduzir na célula de microalga, pois a curva de calibração com o padrão trioleína e as amostras foram semelhantes.

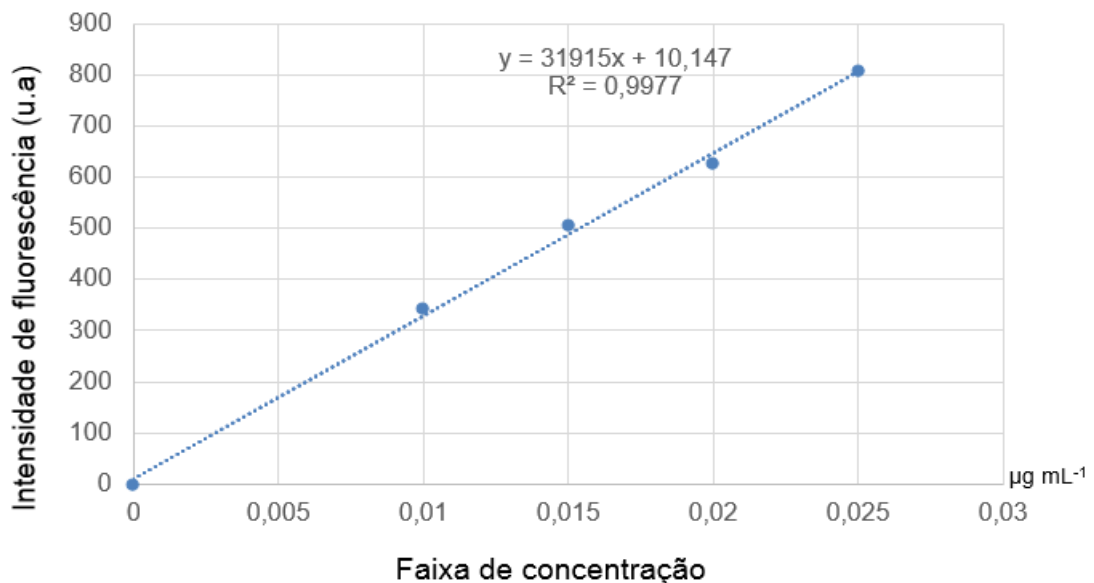
A figura 15 representa a equação da reta da microalga *N. oleoabundans* a partir do extrato lipídico.

**Figura 15-** Curva de calibração a partir do extrato lipídico da microalga *N. oleoabundans*



O eixo y corresponde a área obtida da intensidade das amostras. O eixo x corresponde a concentração da curva padrão de trioleína foi realizada na faixa de concentração de 0,010 a 0,025  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A figura 16 apresenta a equação da reta da microalga *Scenedesmus* sp. a partir do extrato lipídico.

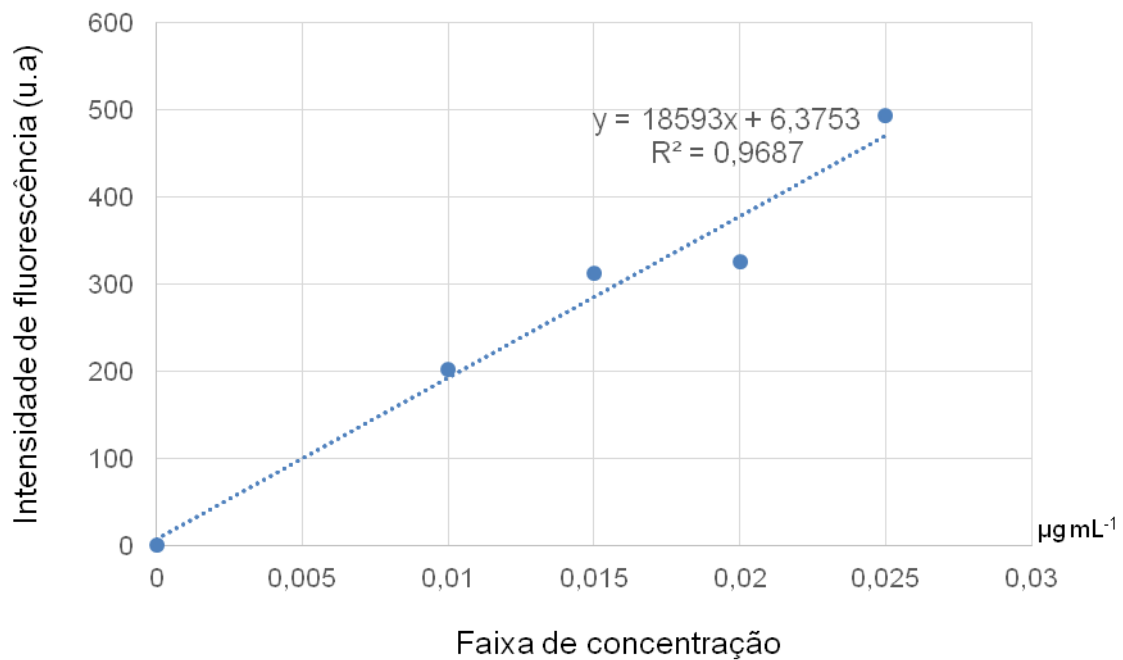
**Figura 16-** Curva de calibração a partir do extrato lipídico de microalga *Scenedesmus* sp.



#### 4.3.1 Quantificação lipídica da biomassa de microalga

A figura 17 apresenta a equação da reta da biomassa de microalga *N. oleoabundans* e *Scenedesmus* sp.

**Figura 17-** Curva de calibração da biomassa de microalga *N. oleoabundans* e *Scenedesmus* sp.



A coloração do Nile red é uma ferramenta importante para avaliar, monitorar e otimizar as condições principalmente para o crescimento de microalgas e produção de lipídeos, podendo fazer estudos de otimização rápida e de grande confiabilidade. Utilizando essa técnica a quantidade de amostra e tempo de preparação pode ser reduzida. A técnica pode ser particularmente útil quando utilizada em processos de produção de lípido de microalgas em grande escala, permitindo que alterações a estratégia de controle do processo que levam à produtividade máxima de lípidos descrito por Da Silva et al (2009).

A partir de 4 repetições os resultados adquiridos na quantificação de biomassa de microalga são apresentados na tabela 8. Foram calculados média e desvio padrão para as duas espécies de microalga. Os resultados do extrato lipídico foram 24,99% para a microalga *N. oleoabundans* e para a microalga *Scenedesmus* sp. foram 25,05%.

Os resultados da biomassa de microalga foram obtidos 36,38% para a microalga *N. oleoabundans*, e 31,31% para a microalga *Scenedesmus* sp.

**Tabela 8-** Quantificação de lipídeo do extrato e da biomassa de microalga (%)

Teor	<i>N. oleoabundans</i>	<i>Scenedesmus</i> sp.
Biomassa de microalga	36,38± 4,55	31,31± 9,8
Extrato lipídico	24,99± 0,04	25,05± 0,04

Observando os dados da tabela 8 foi possível verificar teores de lipídeos totais de 36,38% para a biomassa de microalga *N. oleoabundans* e 31,31% para a biomassa de microalga *Scenedesmus* sp., quando comparados a literatura de acordo com os autores Gouveia et al., (2009) empregando a técnica de espectroscopia de fluorescência por monitoramento em cultivo, o teor lipídico da microalga *N. oleoabundans* pode chegar até 56% de lipídeos totais. De acordo com os resultados dos autores Ren et al., (2013) a microalga *Scenedesmus* sp. apresentou 52,6% de lipídeos totais.

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO.

Na tabela 9 apresenta os resultados das análises físico-químicas do óleo de microalga *Neochloris oleoabundans*.

**Tabela 9-** Análises físico-química do óleo de microalga *Neochloris oleoabundans*

Caracterização físico-química	
Índice de acidez (mg NaOH/g)	50
Índice de saponificação (mg KOH/g)	207
Teor de umidade (%)	2

O índice de saponificação é definido como o número de mg de KOH necessário para saponificar um grama de óleo ou gordura. De acordo com (SILVA,

2016) o resultado do índice de saponificação foi de 192,1 sendo possível comparar com os resultados obtidos no trabalho. Conforme a norma da ANVISA–195 /1999 o teor é de 189 a 198 mg de KOH.

O índice de acidez obtido foi de 50 mg NaOH/g, ou seja, o óleo da biomassa de microalga possui alto índice de ácidos graxos livres. O índice de acidez encontrado revela que está acima do teor máximo permitido pela (RESOLUÇÃO RDC Nº 482, 1999).

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos óleos Vegetais Refinados os teores de umidade máximos permitidos é de 0,80%. O resultado obtido está acima do permitido (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA; Nº49, 2006).

#### 4.5 PRODUÇÃO DE ÉSTERES A PARTIR DO ÓLEO DE MICROALGAS

Para a produção de ésteres foram realizadas as reações de esterificação/transesterificação ácida do óleo de biomassa de microalga extraído por solvente, onde a parte inferior é denominada os ésteres metílicos. A figura 18 apresenta a ilustração da separação das fases dos ésteres metílicos.

**Figura 18-** Separação dos ésteres metílicos



#### 4.5.1 Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada é uma técnica simples, rápida e econômica de análise qualitativa, constituindo na separação dos componentes de uma mistura através da transferência sobre a camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana (COLLINS et al., 2006).

No monitoramento das reações utilizou-se o eluente como fase móvel hexano/metanol (0,97;0,03) (v/v). Esta mistura de solventes permitiu visualizar diferentes compostos presentes na amostra, os quais apresentaram Rf na faixa de 0,40 na amostra do óleo da biomassa de microalga. Comparando os resultados com o óleo da biomassa de microalga os autores Froehner. S; Leithold (2007) obtiveram o Rf na faixa de 0,40 com amostras de óleo vegetal. E de acordo com os autores Geris et al., (2007) obtiveram Rf na faixa de 0,67 na amostra de óleo de soja.

Para as amostras dos ésteres metílicos a mistura de solventes permitiu visualizar diferentes compostos presentes na amostra, os quais apresentaram Rf na faixa de 0,89 na amostra de biodiesel de microalga. Segundo os autores Froehner. S; Leithold (2007) e Geris et al., (2007) ambos obtiveram resultados Rf na faixa de 0,82 na amostra de biodiesel.

#### 4.5.2 Cromatografia em fase gasosa

A análise de cromatografia em fase gasosa é essencial para a validação dos métodos realizados, pois a formação dos ésteres metílicos foi confirmada pela cromatografia gasosa. Os ésteres foram avaliados para verificar a conversão em ésteres metílicos.

O teor de éster foi calculado segundo a norma EN 14103- Determinação de teor de ésteres, somando todos os picos e relacionando com o padrão interno conforme a equação 6.

$$C = \frac{(\sum A_{EI}) - A_{EI}}{A_{EI}} \times \frac{C_{EI} \times V_{EI}}{m} \times 100\%$$

Equação 6

Onde:

$\Sigma A$ = soma da área dos picos

AEI= área do heptadecanoato de etila

CEI= concentração em mg/mL de heptadecanoato de metila

VEI= volume em mL de heptadecanoato de metila

m= massa em mg da amostra

Segundo a especificação do biodiesel do Regulamento Técnico da ANP N° 45/2014 o teor mínimo de éster é de 96,5%. O rendimento em ésteres obtidos neste estudo foi de 40% apresentando baixo rendimento de acordo com especificação.

A reação de esterificação/transesterificação é influenciada pelas propriedades físico-químicas do óleo de microalga. O baixo rendimento de teor de ésteres está relacionado em não ter sido realizado um tratamento prévio da amostra do óleo da biomassa de microalga, pois o índice de acidez do óleo estava com alto grau de índice de acidez. Segundo Lôbo e Ferreira (2009) descreve sobre a importância do pré-tratamento de degomagem, pois o conteúdo de fósforo no biodiesel é proveniente dos fosfolipídeos encontrado em óleos vegetais e em gordura animais. Nesse processo também são removidas impurezas como substâncias coloidais, íons metálicos e ceras por meio desse procedimento da lavagem com o óleo aquecido com água. O procedimento da reação de esterificação/transesterificação sem o tratamento prévio da degomagem resulta na redução do rendimento da reação e conseqüentemente na produção do biodiesel.

A taxa de conversão do óleo de microalga em ésteres etílicos depende diretamente da maneira que a reação é conduzida e das condições do processo. Vários parâmetros afetam a formação de ésteres na reação como o conteúdo de água e o teor de ácidos graxos livres, onde isso tem influência no fluxo da reação de esterificação/transesterificação levando ao rendimento baixo de conversão. A transesterificação quando usada catalisadores básicos de óleos vegetais ocorre mais rapidamente que a reação utilizando catalisadores ácidos, proporcionando alta conversão em menos tempo, pois na reação básica o óleo apresenta umidade e índice de acidez baixos (MA; HANNA, 1999; DEMIRBAS, 2008).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A extração pelo método a frio foi o que apresentou maior teor de lipídeo. A biomassa de microalga *Scenedesmus* sp. utilizando solventes clorofórmio/metanol/água com o uso de ultrassom obteve um rendimento com maior teor de lipídeo. Entretanto quando utilizou a extração a frio e uso de ultrassom para a biomassa de microalga *N. oleoabundans* obteve um menor rendimento em teor de lipídeo, isso é devido a menor espessura da parede celular, pois a parede celular da biomassa de microalga *Scenedesmus* sp. é mais espessa e rígida. A extração com aquecimento utilizando aparelho soxhlet foi o método que obteve menor teor de lipídeo independente do solvente utilizado.

A técnica de espectrofluorimetria demonstrou-se muito sensível para o monitoramento de lipídeos totais utilizando o corante Nile red. Os dados mostraram tempo mínimo de 2 minutos para coloração, mantendo sua eficiência de fluorescência de até 30 minutos, caso contrário o Nile red demonstra instabilidade. O método analítico é confiável para identificar a quantificação de lipídeos neutros em ambas espécies de microalgas *N. oleoabundans* e *Scenedesmus* sp. Houve uma correlação linear entre a intensidade de fluorescência, desta forma o método por espectroscopia de fluorescência é o melhor método de detecção de lipídeos em comparação com métodos tradicionais gravimétricos.

A produção de ésteres metílicos a partir do óleo da microalga *N. oleoabundans* apresentou baixo rendimento, para aumentar o potencial é necessário que se faça uma etapa prévia no óleo de microalga com tratamento de degomagem, para retirar impurezas nesse processo. Sendo assim possibilitando os ésteres do óleo de microalga estar nos parâmetros exigidos pela ANP e atingir maiores rendimentos na produção de biodiesel.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONZO, F. ; MAYZAUD, P. Spectrofluorometric quantification of neutral and polar lipids in zooplankton using Nile red. **Marine Chemistry**, v.67, p.289-301, 1999.

AMARO, H. M.; GUEDES, A. C. ; MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, v.88, n.10, p.3402-3410, 2011.

ANDRADE, D. S. ; FILHO, A. C. Microalgas de águas continentais: Potencialidades e desafios do cultivo, v.1. 2014. 33-34 p.

ANVISA. Anvisa agência nacional de vigilância sanitária- Resolução - RE nº 899,2003.

ARCHIBALD, P. The genus *Neochloris* Starr (Chlorophyceae Chlorococcales). **Phycologia**, v.12, p.187-193, 1973.

ATKINSON, A. W.; GUNNING, B. E. S. ; JOHN, P. L. C. Sporopollenin in the cell wall in *Chlorella* and other algae: ultrastructure, chemistry and incorporation of <sup>14</sup>C-acetate, studied in synchronous cultures. . **Planta**, v.107, p. 1--32 1972.

BALASUBRAMANIAN. S; ALLEN. J. D; KANITKAR. A ; BOLDOR. D. Oil extraction from *Scenedesmus obliquus* using a continuous microwave system – design, optimization, and quality characterization. **Bioresource Technology**, v.102, n.3, p.3396-3403, 2011.

BALDEV, E.; MUBARAKALI, D.; DHIVYA, M.; KANIMOZHI, M.; SHAKENA-FATHIMA, T.; ALHARBI, N. S.; ARUNACHALAM, C.; ALHARBI, S. ; THAJUDDIN, S. Facile and Novel Strategy for Methods of Extraction of Biofuel Grade Lipids from Microalgae- an Experimental Report. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, v.3, p.121-127, 2015.

BALDISSEROTTO, C.; GIOVANARDI, M.; FERRONI, L. ; PANCALDI, S. Growth, morphology and photosynthetic responses of *Neochloris oleoabundans* during cultivation in a mixotrophic brackish medium and subsequent starvation. **Acta Physiologiae Plantarum** v.36, n.2, p.461-472, 2014.

BARSANTI, L. ; GUALTIERI, P. *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*, Second Edition. 2006

BARSANTI, L. P.; COLTELLI , P.; EVANGELISTA, V.; FRASSANITO, A. M.; PASSARELLI, V.; VESENTINI, N. ; GUALTIERI, A. P. *The world of algae*. (Ed.). Algal toxins: nature, occurrence, effect and detection. Piza: . 2008. 1-15 p.

BECKER, E. W. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*: Cambridge University Press. 1994. 293 p.

- BERTOZZINI, E.; GALLUZZI, L.; PENNA, A. ; MAGNANI, M. Application of the standard addition method for the absolute quantification of neutral lipids in microalgae using Nile red. **Journal of Microbiological Methods**, v.87, n.1, p.17-23, 2011.
- BICUDO, C. E. M. ; MENEZES, M. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições. São Carlos. 2005. 580 p.
- BICUDO, C. E. M. ; MENEZES, M. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições. **Rima**, 2006.
- BLIGH, E. G. ; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, n.8, p.911-917, 1959.
- BRASIL. Lei nº 11.097 - Introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. Brasília 2005.
- \_\_\_\_\_. Resolução Nº 14, de 11/05/2012, ANP- Agência Nacional do Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis. Brasília: Diário Oficial da União 18/05/2012,2012.
- \_\_\_\_\_. Resolução Nº 45, de 25.8.2014. ANP- Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Brasília: Diário Oficial da União 26.8.2014,2014.
- BYREDDY, A.; GUPTA, A.; BARROW, C. ; PURI, M. Comparison of Cell Disruption Methods for Improving Lipid Extraction from Thraustochytrid Strains. **Marine Drugs**, v.13, n.8, p.5111, 2015.
- CAVALCANTI, V. F. Síntese de ésteres etílicos por transesterificação in situ em biomassa de microalgas provenientes de um sistema de tratamento de emissões atmosféricas. Curitiba/PR: Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2015. 97 p.
- CHEN, L.; LIU, T.; ZHANG, W.; CHEN, X. ; WANG, J. Biodiesel production from algae oil high in free fatty acids by two-step catalytic conversion. **Bioresource Technology**, v.111, p.208-214, 2012.
- CHEN, W.; ZHANG, C.; SONG, L.; SOMMERFELD, M. ; HU, Q. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. **Journal of Microbiological Methods**, v.77, n.1, p.41-47, 2009.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v.25, n.3, p.294-306, 2007.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. ; BONATO, P. S. Fundamentos de Cromatografia. In: (Ed.). **Capítulo III: Cromatografia em camada delgada**. Unicamp, 2006.
- COOPER, M. S.; HARDIN, W. R.; PETERSEN, T. W. ; CATTOLICO, R. A. Visualizing "green oil" in live algal cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.109, n.2, p.198-201, 2010.
- CRAVOTTO, G.; BOFFA, L.; MANTEGNA, S.; PEREGO, P.; AVOGADRO, M. ;

CINTAS, P. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.15, n.5, p.898-902, 2008.

DEMIRBAS, A. Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. **Progress in Energy and Combustion Science**, v.31, n.5–6, p.466-487, 2005.

DEMIRBAS, A. Energy sources, part a: Recovery, utilization, and environmental effects. **Energy Sources**, n.31, p.163–168, 2008.

EHIMEN, E.; A., S., Z. F ; CARRINGTON, C. G. Variables Affecting the in situ Transesterification of Microalgae Lipids. **Fuel**, v.89, p.677-684, 2010.

ESPINOSA. L; TAPANES. N, C.; ARANDA. D, A., G ; CRUZ. Y, R. As microalgas como fonte de produção de biodiesel: discussão de sua viabilidade. **ACTA Scientiae et Technicae**, v.2, n.1, 2014.

FOLCH, J.; LEES, M. ; SLOANE-STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v.226, n.1 p.497-509, 1957.

FRANCO, A. L. C.; LOBO, I. P.; CRUZ, R. S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; ALMEIDA NETO, J. A. ; MENEZES, R. S. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, v.36, p.437-448, 2013.

FREEDMAN, B.; BUTTERFIELD, R. O. ; PRYDE, E. H. Transesterification kinetics of soybean oil 1. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.63, n.10, p.1375-1380, 1986.

FROEHNER. S ; LEITHOLD, J. Transesterificação de óleos vegetais: Caracterização por cromatografia em camada Delgada e densidade. **Quima Nova**, v.30, n.Nº 8, 2007.

FUKUDA, H.; KONDO, A. ; TAMALAMPUDI, S. Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. **Biochemical Engineering Journal**, v.44, n.1, p.2-12, 2009.

GAO, C.; XIONG, W.; ZHANG, Y.; YUAN, W. ; WU, Q. Rapid quantitation of lipid in microalgae by time-domain nuclear magnetic resonance. **Journal of Microbiological Methods**, v.75, n.3, p.437-440, 2008.

GERIS, R.; SANTOS. N, A. C.; AMARAL. B, A.; MAIA. I, S.; CASTRO. V, D. ; CARVALHO. J, R., M;. Biodiesel de soja – Reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. **Química Nova**, v.30, n.Nº 5, p. 1369-1373, 2007.

GOUVEIA, L.; MARQUES, A. E.; DA SILVA, T. L. ; REIS, A. *Neochloris oleabundans* UTEX# 1185: A suitable renewable lipid source for biofuel production. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v.36, n.6, p.821-826, 2009.

GOUVEIA, L. ; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production.

**Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v.36, n.2, p.269-274, 2009.

GOVENDER, T.; RAMANNA, L.; RAWAT, I. ; BUX, F. BODIPY staining, an alternative to the Nile Red fluorescence method for the evaluation of intracellular lipids in microalgae. **Bioresource Technology**, v.114, p.507-511, 2012.

GREENSPAN. P ; FOWLER. S, D. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red **Journal of Lipid Research**, v.26, p.781-789, 1985.

GREENWELL, H. C.; LAURENS, L. M. L.; SHIELDS, R. J.; LOVITT, R. W. ; FLYNN, K. J. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. **Journal of the royal society**, v.7, p.703–726, 2010.

GUZMÁN, H. M.; DE LA JARA VALIDO, A.; DUARTE, L. C. ; PRESMANES, K. F. Estimate by means of flow cytometry of variation in composition of fatty acids from *Tetraselmis suecica* in response to culture conditions. **Aquaculture International**, v.18, n.2, p.189-199, 2010.

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.709-732, 2012.

HAWTHORNE, J. N. Techniques of Lipidology: Isolation, Analysis and Identification of Lipids (2nd Revised Edition). **Biochemical Society Transactions**, v.16, n.5, p.906-906, 1988.

HODAIFA, G.; MARTÍNEZ, M. E. ; SÁNCHEZ, S. Use of industrial wastewater from olive-oil extraction for biomass production of *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, v.99, n.5, p.1111-1117, 2008.

HUANG, H.; YUAN, X.; ZENG, G.; WANG, J.; LI, H.; ZHOU, C.; PEI, X.; YOU, Q. ; CHEN, L. Thermochemical liquefaction characteristics of microalgae in sub- and supercritical ethanol. **Fuel Processing Technology**, v.92, n.1, p.147-153, 2011.

ISOLANI, K, A. ; TONIN, J, M. Produção de biodiesel no Brasil com o advento do Selo Combustível Social e os impactos na agricultura familiar. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, v.28, p.157-171, 2013.

JENA, J.; NAYAK, M.; PANDA, H. S.; PRADHAN, N.; SARIKA, C.; PANDA, P. K.; RAO, B. V. S. K.; PRASAD, R. B. N. ; SUKLA, L. B. Microalgae of Odisha coast as a potential source for biodiesel production. **World Environment**, v.2, n.1, p.11-16, 2012.

JOHNSON, M. B. ; WEN, Z. Production of Biodiesel Fuel from the Microalga *Schizochytrium limacinum* by Direct Transesterification of Algal Biomass. **Energy & Fuels**, v.23, n.10, p.5179-5183, 2009.

KAIWAN-ARPORN, P.; HAI, P. D.; THU, N. T. ; ANNACHHATRE, A. P. Cultivation of cyanobacteria for extraction of lipids. **Biomass and Bioenergy**, v.44, p.142-149, 2012.

KAPPE, C. O.; DALLINGER, D. ; MURPHREE, S. S. Practical microwave synthesis for organic chemists. **Journal American Chemical Society**, v.131, p.7204, 2009.

KRIENITZ, L. ; BOCK, C. Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. **Hydrobiologia**, p.295–326, 2012.

LEE, D. H. Algal biodiesel economy and competition among bio-fuels. **Bioresource Technology**, v.102, n.1, p.43-49, 2011.

LEE, J.-Y.; YOO, C.; JUN, S.-Y.; AHN, C.-Y. ; OH, H.-M. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, v.101, n.1, Supplement, p.S75-S77, 2010.

LEE, R. E. Phycology. New York, USA. 2008. 547 p.

LEWIS, T.; NICHOLS, P. D. ; MCMEEKIN, T. A. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. **Journal of Microbiological Methods**, v.43, n.2, p.107-116, 2000.

LI, X.; XU, H. ; WU, Q. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v.98, n.4, p.764-771, 2007.

LÔBO, I, P. ; FERREIRA, S, L., C;. Biodiesel: Parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, v.32, n.6, p.1596-1608, 2009.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e aplicações. 2006. 606 p.

LUQUE DE CASTRO, M. D. ; GARCÍA-AYUSO, L. E. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. **Analytica Chimica Acta**, v.369, n.1–2, p.1-10, 1998.

MA, F. ; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review1. **Bioresource Technology**, v.70, n.1, p.1-15, 1999.

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.

MEDINA, A. R.; GRIMA, E. M.; GIMÉNEZ, A. G. ; GONZÁLEZ, M. J. I. Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advances**, v.16, n.3, p.517-580, 1998.

MELLO, F, O., T, M; PAULILLO, L, F. ; VIAN, C, E., F. O Biodiesel no Brasil: Panorama, perspectivas e desafios. **Informações Econômicas**, v.37, n.1, 2007.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. ; N°49. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Óleos Vegetais Refinados,2006.

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.

PARENTE, E. J. S. Biodiesel: Uma aventura tecnológica num país engraçado: Tecbio. 2003

PATIL, P. D.; GUDE, V. G.; MANNARSWAMY, A.; DENG, S.; COOKE, P.; MUNSON-MCGEE, S.; RHODES, I.; LAMMERS, P. ; NIRMALAKHANDAN, N. Optimization of direct conversion of wet algae to biodiesel under supercritical methanol conditions. **Bioresource Technology**, v.102, n.1, p.118-122, 2011.

PAVIA, D. P.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. ; VYVYAN, J. R. Introdução à Espectroscopia. São Paulo: Cengage Learning. 2010

PEREIRA, C. M. P.; HOBUSS, C. B.; MACIEL, J. V.; FERREIRA, L. R.; DEL PINO, F. B.; MESKO, M. F.; JACOB-LOPES, E. ; COLEPICOLO NETO, P. Biodiesel renovável derivado de microalgas: avanços e perspectivas tecnológicas. **Química Nova**, v.35, p.2013-2018, 2012.

POPOVICH, C. A.; DAMIANI, C. D, C.; MARTÍNEZ, A. M.; H, F.; M, G.; PANCALDI, S. ; LEONARDI, P. I. Nannochloris oleoabundans grown in enriched natural seawater for biodiesel feedstock: Evaluation of its growth and biochemical composition. **Bioresource Technology**, v.114, p.287-293, 2012.

PRABAKARAN, P. ; RAVINDRAN, A. D. A study on effective lipid extraction methods from certain fresh water microalgae. **Elixir Bio. Technology** v.39, p.4589-4591, 2011.

RAMOS, L. P.; KUCEK, K. T.; DOMINGOS, A. K. ; WILHELM, H. M. Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** v.31, p.28-37, 2003.

RAMOS, L. P.; SILVA, F. R.; MANGRICH, A. S. ; CORDEIRO, C. S. Tecnologias de Produção de Biodiesel. **Revista Virtual de Química**, v.3, n.5, p.385-405, 2011.

RAMOS, G. J., P; BICUDO, C. E., M ; MOURA, C. W., N. Scenedesmeceae (Chlorophyta, Chlorophyceae) de duas áreas do Pantanal dos Marimbus (Baiano e Remanso), Chapada Diamantina, Estado da Bahia, Brasil. **Hoehnea**, v.42, p. 549-566, 2015.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F. ; EICHHORN, S. E. Biologia vegetal. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001. 906 p.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F. ; EICHHORN, S. E. Biologia Vegetal. . Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2007. 906 p.

REN, H. Y.; LIU, B. F.; MA, C.; ZHAO, L. ; REN, N. Q. A new lipid-rich microalga Scenedesmus sp. strain R-16 isolated using Nile red staining: Effects of carbon and nitrogen sources and initial pH on the biomass and lipid production. **Biotechnology**

**Biofuels**, v.6, p.143, 2013.

RESOLUÇÃO RDC Nº 482, D. D. S. D. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Óleos e Gorduras Vegetais 1999.

REYNOLDS. C, S. Ecology of Phytoplankton. 2006

RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology: Oxford: Blackwell Sciencie. 2004

RIVALDI, J. D.; SARROUB, B. F. ; FIORILO, R., SILVA, S. S. Glicerol de Biodiesel - Estratégias Biotecnológicas para o Aproveitamento do Glicerol Gerado da Produção de Biodiesel. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.37, p.44-51, 2009.

ROSE, D. P. ; CONNOLLYA, J. M. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. **Pharmacology & Therapeutics**, v.83, n.3, p.217- 244, 1999.

RYCKEBOSCH, E.; MUYLAERT, K. ; FOUBERT, I. Optimization of an Analytical Procedure for Extraction of Lipids from Microalgae. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.89, n.2, p.189-198, 2012.

SHEEHAN, J.; DUNAHAY, T.; BENEMANN, J. ; ROESSLER, P. Look back ate the U.S Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from algae. **Close-Out Report**, p.296, 1998.

SILVA, H. R. D. Produção de microalga *Neochloris oleoabundans* em diferentes sistemasde cultivo. In: (Ed.). Londrina, 2016. p.112.

SKOOG, W. ; HOLLER, C. Fundamentos da Química Analítica. 2005. 1124 p.

SOXHLET, F. Die gewichtsanalytische bestimmung des milchfettes. **Polytechnisches Journal**, v.232, n.5, p.461-465, 1879.

SUN, X.; CAO, Y.; XU, H.; LIU, Y.; SUN, J.; QIAO, D. ; CAO, Y. Effect of nitrogen-starvation, light intensity and iron on triacylglyceride/carbohydrate production and fatty acid profile of *Neochloris oleoabundans* HK-129 by a two-stage process. **Bioresource Technology**, v.155, p.204-212, 2014.

TAPANES, N. C.; A, A. D. A. G. ; R, P. R. S. C. Y. Biodiesel no brasil: Matérias primas e tecnologias de produção. **Acta Scientiae et Technicae.**, v.1, n.1, 2013.

TERRONI. H, C.; JESUS. J, M.; ARTUZO. L, T.; VENTURA. L, V. ; SANTOS. R, F. Liofilização. **Unilago**, v.1, n.1, p.271–284 2013.

TOMASELLI, L. ; RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Victoria. 2004. 3-19 p.

TORNABENE, T. G.; HOLZER, G. L., S. ; BURRIS, N. Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.5, n.6, p.435-440, 1983.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R. ; CASE, C. L. E. Microbiologia. Porto Alegre: Artmed. 2000. 827 p.

TSUKUI, A. ; REZENDE, C. M. Extração Assistida por Micro-ondas e Química Verde. **Revista Virtual de Química**, v.6, p.1713-1725, 2014.

W.-Y. CHOI; G.-V. KIM; S.-Y. LEE ; LEEC, H.-Y. Biodiesel Production from *Scenedesmus* sp. through Optimized in situ Acidic Transesterification Process. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v.28, n.3, p.367–374, 2014.

WANG. D; LI. Y; HU. X; SU. W ; ZHONG. M. Combined Enzymatic and Mechanical Cell Disruption and Lipid Extraction of Green Alga *Neochloris oleoabundans*. **International Journal of Molecular Sciences** v.16, n. 7707-7722, 2015.

ZHANG, Y.; DUBÉ, M. A.; MCLEAN, D. D. ; KATES, M. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. **Bioresource Technology**, v.89, n.1, p.1-16, 2003.