

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**CULTIVO E EXTRAÇÃO DE ÓLEO DAS MICROALGAS**  
*Scenedesmus* sp. E *Spirulina* sp. PARA A SÍNTESE DE  
ÉSTERES VISANDO À PRODUÇÃO DE BIODIESEL

**Tatiana Rodrigues da Silva Baumgärtner**

Tese de Doutorado, submetida à  
Universidade Estadual de Maringá  
como parte integrante dos requisitos  
para a obtenção do grau de Doutor  
em Engenharia Química, na área de  
concentração de Desenvolvimento de  
Processos.

**Maringá - PR - Brasil**

**Novembro de 2011**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**CULTIVO E EXTRAÇÃO DE ÓLEO DAS MICROALGAS**  
***Scenedesmus* sp. E *Spirulina* sp. PARA A SÍNTESE DE**  
**ÉSTERES VISANDO À PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

Tatiana Rodrigues da Silva Baumgärtner  
Engenheira Química, UNIOESTE, 2005.  
Mestre em Engenharia Química, M. Sc., UEM, 2007.  
Orientadores: Prof. Dr. Pedro Augusto Arroyo.  
Prof<sup>a</sup>. Gisella Maria Zanin

Tese de Doutorado, submetida à  
Universidade Estadual de Maringá  
como parte integrante dos requisitos  
para a obtenção do grau de Doutor  
em Engenharia Química, na área de  
concentração de Desenvolvimento  
de Processos.

Maringá - PR - Brasil  
Novembro de 2011

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

B384c Baumgartner, Tatiana Rodrigues da Silva  
Cultivo e extração de óleo das microalgas  
*Scenedesmus* sp. e *Spirulina* sp. para a síntese de  
ésteres visando à produção de biodiesel. / Tatiana  
Rodrigues da Silva Baumgartner. -- Maringá, 2011.  
124 f.: il., color., figs., fotos, tabs.

Orientadores: Prof. Dr. Pedro Augusto Arroyo,  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gisella Maria Zanin.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de  
Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de  
Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Química.

1. Biodiesel. 2. Microalgas. 3.  
Transesterificação. 4. Esterificação *in situ*. 5.  
Caracterização do biodiesel. I. Arroyo, Pedro  
Augusto, orient. II. Zanin, Gisella Maria, co-  
orientadora. III. Universidade Estadual de Maringá,  
Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia  
Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia  
Química. IV. Título.

665.3 CDD 21.ed.

AHS-000603

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão final da Tese de Doutorado apresentada por Tatiana Rodrigues da Silva Baumgärtner perante a Comissão Julgadora do Curso de Doutorado em Engenharia Química em 30 de Novembro de 2011.

**COMISSÃO JULGADORA**


  
Prof. Dr. Pedro Augusto Arroyo  
Orientador

  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gisella Maria Zanin  
Coorientadora

  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adriana Ferla de Oliveira  
Membro

  
Prof. Dr. Nyamien Yahaut Sebastien  
Membro

  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Camila da Silva  
Membro

  
Prof. Dr. Nehemias Curvelo Pereira  
Membro

*À MINHA FAMÍLIA,  
Amor Incondicional*

## AGRADECIMENTOS

*À Deus por ter colocado em minha vida pessoas que me ensinaram a crescer como estudante, pesquisadora, amiga, filha, mulher e mãe, especialmente:*

*Ao Pedro Arroyo, pela orientação, conhecimento e pelas grandes contribuições prestadas. Que nesta caminhada de sete anos, me ensinou muito mais do que esta escrito nos livros, compartilhando muitas de suas experiências de vida;*

*À Gisella, pela orientação, compartilhando sua sabedoria e delicadeza;*

*Ao Sebastien, que dividiu seus conhecimentos, disponibilizou seu laboratório, esteve sempre à disposição. Que forneceu as cepas das microalgas sem a qual não seria possível a realização deste trabalho;*

*Ao DEQ/PEQ pela oportunidade de ter frequentado o programa;*

*Aos Professores do DEQ pela assistência em diversas ocasiões, em especial a Professora Onélia, por disponibilizar o fotobiorreator;*

*Aos Técnicos e funcionários do DEQ que me auxiliaram neste trabalho, em especial ao Fernando, Donizete, Valmir, Lauro e Elenice;*

*Ao CNPq pela concessão da bolsa e dos recursos financeiros para a realização deste trabalho;*

*Aos amigos do Laboratório de Catálise Heterogênea e Biodiesel (LCHBio), Aline, Gisele, Alexandre, Artur, Aroldo, Eduardo, Leonardo, Luiz, Rafael, Julio, Camila, Guilherme, Marco, Taysa, Elias, Silvio e Pedro. Pela companhia, companheirismo, pelas horas de descontração tornando a rotina diária de trabalho mais agradável. Em especial ao Jorge Burak, pelo grande auxílio prestado nestes anos juntos, pelas ideias inovadoras, pela força, garra e determinação que me ajudaram a perseverar nesta empreita;*

*À Marta Estavas, amiga do coração, que me ensinou e ajudou a cuidar das nossas filhas “as microalgas”, e tornou meus dias em Toledo mais agradáveis;*

*À todos os meus amigos (as), que sabendo do grande desafio, sempre me incentivaram com carinho e dedicação.*

*À minha família que tanto amo: meu pai Olivio, minha mãe Vanilde, meu irmão Everson e minha princesa Heloiza, que não mediram esforços para me ajudar, sendo essenciais nesta etapa de minha vida;*

*Ao Dirceu, pelo amor, dedicação, apoio, sempre me incentivando nas horas mais difíceis. Não existem palavras que expressem o quanto estou grata pela sua companhia, ajuda e conselhos. Sendo um dos grandes responsáveis por eu poder estar escrevendo estes agradecimentos, sinal que estamos vencendo mais esta etapa, te amo;*

*Ao meu filho, Rodrigo, luz no meu caminho, seu sorriso e abraços são a minha fonte inspiradora, amor sem igual.*

**CULTIVO E EXTRAÇÃO DE ÓLEO DAS MICROALGAS *Scenedesmus* sp. E *Spirulina* sp. PARA A SÍNTESE DE ÉSTERES VISANDO A PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

**AUTORA: TATIANA RODRIGUES DA SILVA BAUMGÄRTNER**

**ORIENTADORES: Dr. PEDRO AUGUSTO ARROYO**

**Dr<sup>a</sup>. GISELLA MARIA ZANIN**

Tese de Doutorado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual de Maringá; Av. Colombo, 5790, Bloco E-46, Sala 09; CEP 87020-900 – Maringá-PR-Brasil, defendida em 30 de Novembro de 2011.

**RESUMO**

Dentro de um segmento mundial pela busca por fontes renováveis de energia, os biocombustíveis surgem como uma alternativa viável aos combustíveis de origem fóssil, sendo o biodiesel um sucessor promissor ao diesel. A busca por novas matérias-primas para a produção de biodiesel tem obtido elevado destaque durante os últimos anos, sendo as microalgas consideradas potencialmente úteis para esse processo. Esses microorganismos fotossintéticos utilizam energia solar associada com água e gás carbônico para produzir biomassa, capaz de ser transformada em energias disponíveis, como na forma de biodiesel. Desta forma, o trabalho teve como objetivo estudar o cultivo de microalgas dos gêneros *Scenedesmus* sp. e *Spirulina* sp., a extração do óleo desta biomassa e a produção de ésteres etílicos e metílicos, visando à produção de biodiesel, pela reação *in situ* da biomassa e pela reação de transesterificação/esterificação ácida do óleo. A partir dos resultados obtidos com a extração, observou-se que as características dos solventes podem favorecer a extração de um ou outro componente da biomassa. O perfil de ácidos graxos do óleo da microalga *Scenedesmus* sp apresentou uma maior proporção de ácidos graxos de cadeia longa do que a microalga *Spirulina* sp, sendo que o óleo obtidos para as duas microalgas apresentaram alta acidez, de 4,9 para a *Scenedesmus* sp. e 14,3 *Spirulina* sp. Na produção de ésteres, tanto para a microalga *Scenedesmus* sp. como para a *Spirulina* sp, as análises de variância fatorial revelaram



que houve interação entre os quatro fatores ( $p < 0,05$ ): temperatura, tempo, álcool e solvente. As interações que levaram, em média, aos rendimentos mais altos para a microalga *Scenedesmus* sp. foram: etanol e clorofórmio ( $T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ); metanol e clorofórmio ( $T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ); etanol e hexano ( $T=60$  e  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Já as reações com a *Spirulina* sp. as interações que levaram, em média, aos rendimentos mais altos. foram: etanol e clorofórmio ( $T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e etanol e hexano ( $T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Houve uma grande diferença nas reações de transesterificação/esterificação *in situ* entre as duas microalgas analisadas, possivelmente devido às diferenças na estrutura celular das microalgas. Nas reações de transesterificação/esterificação ácida do óleo de microalga obteve-se um rendimento teórico de ésteres de 10 a 15 vezes menor quando comparado com a reação *in situ*. A reação *in situ* apresentou-se mais vantajosa devido a redução de custos relacionados ao tempo de reação e ao uso de solventes quando comparada ao processo de extração e/ou purificação do óleo, sendo evidenciados na reação *in situ* elevados rendimentos em ésteres.

**CULTURE AND EXTRACTION OF OIL FROM MICROALGAE *Scenedesmus* sp. AND *Spirulina* sp. FOR THE SYNTHESIS OF ESTERS AIMED BIODIESEL PRODUCTION**

**AUTHOR: TATIANA RODRIGUES DA SILVA BAUMGÄRTNER**

**SUPERVISORS: Dr. PEDRO AUGUSTO ARROYO**

**Dr<sup>a</sup>. GISELLA MARIA ZANIN**

Doctor Thesis; Chemical Engineering Post-Graduation Program; State University of Maringá; 5790 Colombo Av., B. E-46-09; Zip Code 87020-900 – Maringá-PR-Brasil, presented on 30<sup>th</sup>, November, 2011.

**ABSTRACT**

Within a global segment by search for renewable energy, biofuels emerged as a viable alternative to fossil fuels, biodiesel is a promising successor to diesel. The search for new raw materials for biodiesel production has gained high profile in recent years, the microalgae are considered potentially useful for this process. These photosynthetic microorganisms use solar energy associated with water and carbon dioxide to produce biomass that can be transformed into available energy, such as biodiesel. Thus, the thesis aimed to study the cultivation of microalgae of the genus *Scenedesmus* sp. and *Spirulina* sp., the oil extraction and the production of methylic and ethylic esters seeking at biodiesel production, by *in situ* reaction and by acid transesterification/esterification reaction of oil. From the results obtained with the extraction, it was observed that the solvent features may favor one or another biomass component. The fatty acid of oil profile from microalgae *Scenedesmus* sp. showed higher proportion of long chain fatty acid than the microalgae *Spirulina* sp., both with high acidity, 4,9 from *Scenedesmus* sp. and 14,3 from *Spirulina* sp. In the production of esters for both the microalgae *Scenedesmus* sp. as for *Spirulina* sp., factorial analyzes of variance, revealed that there was an interaction between the four factors ( $p < 0.05$ ): temperature, time, alcohol and solvent. The interactions that led on average to higher incomes for microalgae *Scenedesmus* sp. were chloroform and ethanol ( $T = 60$  °C),

methanol and chloroform (T=60 °C) and ethanol and hexane (T=60 and 90 °C). The reactions with *Spirulina* sp., interactions that led, on average, at higher yields were chloroform and ethanol (T=60 °C) and ethanol and hexane (T=45 °C). There was difference in transesterification/esterification reactions in situ between the two microalgae examined, possibly due to differences in the cellular structure of microalgae. In acid transesterification/esterification reactions of microalgae oil was obtained a theoretical yield of ester 10 to 15 times lower when compared with the reaction in situ. The reaction in situ had to be more advantageous due to reduced costs related to reaction time and the use of solvents when compared to the extraction process and/or purification of the oil, being evidenced in the reaction in situ esters in high yields.

## ÍNDICE

<b>CAPÍTULO I . INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>CAPÍTULO II. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>06</b>
II.1. Biodiesel.....	06
II.2. Matérias-primas para a Produção de Biodiesel.....	10
II.3. Microalgas.....	13
II.3.1. Cultivo de Microalgas.....	14
II.3.2. Meios de Cultura e Fontes Nutricionais.....	16
II.3.3. Fotobiorreatores.....	19
II.3.4. <i>Scenedesmus</i> sp.....	22
II.3.5. <i>Spirulina</i> sp.....	23
II.4. Óleo nas Microalgas.....	24
II.5. Extração de Óleo.....	26
II.6. Produção de Ésteres.....	27
II.6.1. Álcool.....	29
II.6.2. Catalisadores.....	30
<b>CAPÍTULO III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>36</b>
III.1. Variação na Composição dos Nutrientes.....	36
III.2. Recuperação da Biomassa e Secagem.....	41
III.3. Extração do Óleo em Microalgas.....	42
III.4. Ácidos Graxos no Óleo de Microalgas.....	46
III.5. Biodiesel de Óleo Microalgal.....	48
III.5.1. Transesterificação/Esterificação ácida.....	48
III.5.2. Reações <i>in situ</i> .....	52
<b>CAPÍTULO IV. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
IV.1. Cultivo de Microalgas.....	55
IV.1.1. Meios de Cultivo.....	55
IV.1.2. Cinética de Crescimento.....	59
IV.1.3. Condições de Cultivo de Biomassa.....	60
IV.2. Recuperação e Secagem da Biomassa.....	61
IV.3. Extração do Óleo.....	61
IV.3.1. Métodos.....	62

IV.4. Caracterização do Óleo.....	63
IV.4.1. Determinação do Índice de Acidez.....	63
IV.4.2. Determinação do Perfil de Ácidos Graxos do Óleo.....	64
IV.4.3. Determinação da Massa Molar do Óleo.....	65
IV.5. Produção de Ésteres.....	66
IV.5.1. Reação <i>in situ</i> .....	66
IV.5.1. Reação Transesterificação/Esterificação Ácida.....	67
IV.6. Análises Cromatográficas.....	68
IV.6.1. Quantificação dos Produtos de Reação.....	69
<b>CAPÍTULO V. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>72</b>
V.1. Cultivo das Microalgas.....	72
V.1.1. Cultivo de Microalgas dos Gêneros <i>Scenedesmus</i> sp. e <i>Spirulina</i> sp. em Escala de Bancada e Avaliação dos Parâmetros de Cultivo.....	72
V.1.2. Condições de Cultivo.....	79
V.2. Recuperação e Secagem da Biomassa.....	82
V.3. Extração do Óleo.....	83
V.4. Caracterização do Óleo Extraído.....	89
V.4.1. Perfil dos Ácidos Graxos no Óleo das Microalgas.....	89
V.4.2. Acidez e Massa Molar.....	97
V.5. Produção de Ésteres a Partir de Microalgas.....	97
V.5.1. Reação <i>in situ</i> .....	98
V.5.2. Reação de Esterificação do Óleo de Microalgas.....	107
<b>CAPÍTULO VI. CONCLUSÕES.....</b>	<b>109</b>
<b>CAPÍTULO VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>111</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Zoneamento agroecológico potencial de matérias-primas no Brasil.....	11
<b>Figura 2</b> – Matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel. ....	11
<b>Figura 3</b> – Monitoramento da concentração de biomassa com diferentes concentrações de CO <sub>2</sub> (a <sub>1</sub> e a <sub>2</sub> : <i>Spirulina</i> sp com 6 e 12% de CO <sub>2</sub> ; b <sub>1</sub> e b <sub>2</sub> : <i>S. obliquus</i> com 6 e 12% de CO <sub>2</sub> , respectivamente).....	18
<b>Figura 4</b> – Diferentes configurações de fotobiorreatores .....	20
<b>Figura 5</b> – Fotobiorretor: A) lâmpadas de halogênio de 1.000W; B) ventiladores; C) compressor de ar do sistema de agitação do meio (BBA); D) tanque do fotobiorretor; E) mangueiras do sistema de termostatização do cultivo; e F) sistema BBA.....	21
<b>Figura 6</b> – Colônia de <i>Scenedesmus</i> sp.....	22
<b>Figura 7</b> – Alga <i>Spirulina</i> sp.....	23
<b>Figura 8</b> - Extrator de Soxhlet.....	27
<b>Figura 9</b> – Reação global transesterificação de triacilglicerol.....	28
<b>Figura 10</b> – Etapas da reação de transesterificação.....	28
<b>Figura 11</b> – Etapas do mecanismo da reação de transesterificação com álcool. ....	32
<b>Figura 12</b> – Reação de saponificação, em que: R': cadeia carbônica do ácido graxo e R: grupo alquila do álcool.....	33
<b>Figura 13</b> – Etapas do mecanismo da reação de transesterificação ácida com álcool, onde: R': cadeia carbônica do ácido graxo e R: grupo alquila do álcool.....	33
<b>Figura 14</b> – Efeito da temperatura de secagem da biomassa da microalga <i>C. vulgaris</i> , no conteúdo de lipídios. ....	42
<b>Figura 15</b> – Exemplo de moléculas presentes nos lipídios totais.....	44

<b>Figura 16</b> – Análise da composição lipídica das microalgas Wild, <i>D. tertiolecta</i> e <i>N. Oculata</i> .....	45
<b>Figura 17</b> – Rendimento do biodiesel produzido em função da razão álcool:óleo...	49
<b>Figura 18</b> – Efeito da razão álcool:óleo na composição dos produtos da reação de transesterificação do óleo de soja .....	50
<b>Figura 19</b> – Reação <i>in situ</i> a) antes de adicionar hexano:clorofórmio e b) após separação das fases.....	67
<b>Figura 20</b> – Reação de transesterificação/esterificação do óleo de microalgas a) separação das fases e b) ésteres etílicos.....	68
<b>Figura 21</b> – Concentração da biomassa de <i>Scenedesmus</i> sp. em função do tempo de cultivo, para diferentes meios.....	73
<b>Figura 22</b> – Montagem dos experimentos para estudar a variação na concentração do meio MC no cultivo da microalga <i>Scenedesmus</i> sp.....	75
<b>Figura 23</b> – Concentração da biomassa de <i>Scenedesmus</i> sp. cultivada no meio MC, nas diluições 1:10 (azul), 1:7,5 (vermelho), 1:5 (verde), 1:2 (cor de rosa), 1:1 (preto) durante o período de cultivo.....	76
<b>Figura 24</b> – Montagem dos experimentos para estudar o cultivo das microalgas <i>Spirulina</i> sp. em meio Zarrouk.....	78
<b>Figura 25</b> - Concentração da biomassa para o cultivo de <i>Spirulina</i> sp.....	79
<b>Figura 26</b> – Cultivo das microalgas em ambiente controlado.....	79
<b>Figura 27</b> – Cultivo das microalgas. em temperatura ambiente em biorreator de maior capacidade (500 L).....	80
<b>Figura 28</b> – Cultivo das microalgas em fotobiorreator de 30 L.....	81
<b>Figura 29</b> – Recuperação da biomassa: a) Decantação após adição do flocculante; b) filtração; c) recuperação da biomassa; e d) biomassa algácea seca.....	82
<b>Figura 30</b> – Biomassa seca e triturada.....	83

<b>Figura 31</b> – Coluna recheada com carvão ativado para separação dos lipídios neutros.....	86
<b>Figura 32</b> – Extrato diluído em hexano: a) antes; e b) depois de passar pela coluna recheada com carvão ativado.....	87
<b>Figura 33</b> – Lipídios neutros.....	87
<b>Figura 34</b> – Perfil ácidos graxos, em % mássica, do óleo da microalga <i>Scenedesmus</i> sp.: a) C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C12:0 e C13:0; b) C14:0, C14:1, C15:0, C16:1, C17:0 e C17:1; e c) C:16, C18:0, C18:1, C18:2 e C18:3. Os solventes utilizados foram: H – hexano, D – diclorometano e E – éter etílico.....	92
<b>Figura 35</b> – Perfil ácidos graxos, em % mássica, do óleo da microalga <i>Spirulina</i> sp.: a) C4:0, C8:0, C10:0, C16:0 e C16:1; e b) C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C20:3 e C20:5. Os solventes utilizados foram: H – hexano, D – diclorometano e E – éter etílico.....	96
<b>Figura 36</b> – Quantidade de éster metílico/etílico obtido na reação <i>in situ</i> com <i>Scenedesmus</i> sp. em função do tempo de reação, para os solventes clorofórmio e hexano, em diferentes temperaturas.....	99
<b>Figura 37</b> – Quantidade de éster etílico produzida, por tempo de reação <i>in situ</i> , para a microalga <i>Scenedesmus</i> sp. com clorofórmio.....	102
<b>Figura 38</b> – Quantidade de éster metílico/etílico obtido na reação <i>in situ</i> com <i>Spirulina</i> sp. em função do tempo de reação, para os solventes clorofórmio e hexano em diferentes temperaturas.....	103
<b>Figura 39</b> – Microalga <i>Scenedesmus</i> sp.: a) no cultivo; b) biomassa seca; c) 10 min de reação, utilizando etanol e clorofórmio a 60 °C; e d) 120 min de reação.....	105
<b>Figura 40</b> – Microalga <i>Spirulina</i> sp.: a) no cultivo; b) biomassa seca; c) 10 min de reação, utilizando etanol e clorofórmio a 60 °C; e d) 120 min de reação.....	105



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Especificações para o biodiesel.....	09
<b>Tabela 2</b> – Fontes de óleo para produção de biodiesel.....	12
<b>Tabela 3</b> – Composição química das microalgas expressas em base de massa seca (%)......	25
<b>Tabela 4</b> – Componentes principais do óleo da microalga <i>C. protothecoides</i> .	38
<b>Tabela 5</b> - Teor total de lipídios, em % de biomassa seca, extraídos por diferentes metodologias.....	43
<b>Tabela 6</b> - Perfil de ácidos graxos (%) das microalgas <i>Spirulina</i> sp., <i>Scenedesmus obliquus</i> , <i>Synechococcus nidulans</i> e <i>Chlorella vulgaris</i> .....	46
<b>Tabela 7</b> – Composição de lipídios em diferentes temperaturas de secagem..	48
<b>Tabela 8</b> – Relação de ésteres metílicos de ácidos graxos encontrados no biodiesel do óleo da microalga <i>S. obliquus</i> .....	51
<b>Tabela 9</b> – Ésteres metílicos de ácidos graxos no biodiesel de microalga <i>Chlorella protothecoides</i> .....	52
<b>Tabela 10</b> – Propriedades do biodiesel de óleo de microalgas e o diesel comum.....	52
<b>Tabela 11</b> – Meio MC para cultivo de <i>Scenedesmus</i> sp.....	56
<b>Tabela 12</b> – Meio DM para cultivo de <i>Scenedesmus</i> sp.....	56
<b>Tabela 13</b> – Meio NPK (10:10:10) para cultivo de <i>Scenedesmus</i> sp.....	57
<b>Tabela 14</b> – Meio NPK (10:10:10) para cultivo de <i>Scenedesmus</i> sp.....	57
<b>Tabela 15</b> – Meio Zarrouk para cultivo de <i>Spirulina</i> sp.....	58
<b>Tabela 16</b> – Solução A <sub>5</sub> (micronutrientes).....	58
<b>Tabela 17</b> – Solução B <sub>6</sub> (micronutrientes).....	59

<b>Tabela 18</b> – Produtividade e taxa de crescimento para diferentes meios no cultivo de <i>Scenedesmus</i> sp.....	74
<b>Tabela 19</b> – Produtividade (mg.L <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> ) para diferentes diluições do meio MC no cultivo de <i>Scenedesmus</i> sp.....	75
<b>Tabela 20</b> – Taxa de crescimento e duplicações por dia, para diferentes diluições do meio MC de cultivo de <i>Scenedesmus</i> sp.....	77
<b>Tabela 21</b> – Produtividade, taxa de crescimento e duplicações por dia para o cultivo da microalga <i>Spirulina</i> sp.....	78
<b>Tabela 22</b> – Produtividade e taxa de crescimento para a microalga <i>Scenedesmus</i> sp. e <i>Spirulina</i> sp. no cultivo em temperatura ambiente e escala maior (500 L).....	80
<b>Tabela 23</b> – Produtividade e taxa de crescimento para a microalga <i>Scenedesmus</i> sp. no cultivo em temperatura ambiente no fotobiorreator de 30 L.....	81
<b>Tabela 24</b> – Quantidade de lipídios totais da extração do óleo da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. pelo método Bligh e Dyer (1959).....	84
<b>Tabela 25</b> – Quantidade de lipídios totais/g biomassa seca obtida na extração do óleo das microalgas por dois métodos e três solventes diferentes.....	84
<b>Tabela 26</b> – Quantidade de óleo retido na coluna de leito fixo de carvão ativado.....	88
<b>Tabela 27</b> - Perfil de ácidos graxos do óleo da microalga <i>Scenedesmus</i> sp....	90
<b>Tabela 28</b> - Perfil de ácidos graxos do óleo da microalga <i>Spirulina</i> sp.....	94
<b>Tabela 29</b> – Características do óleo obtido das microalgas estudadas.....	97
<b>Tabela 30</b> – Valores mais altos de rendimentos em ésteres por grama de biomassa de <i>Scenedesmus</i> sp.....	101

<b>Tabela 31</b> – Valores mais altos de rendimentos em ésteres por grama de biomassa de <i>Spirulina</i> sp.....	104
<b>Tabela 32</b> – Ésteres etílicos produzidos a partir do óleo de microalga.....	107

# CAPÍTULO I

## INTRODUÇÃO

A preocupação mundial sobre a disponibilidade futura de recursos energéticos está fundamentada em questões de segurança nacional, estabilidade econômica e sustentabilidade ambiental (MASIERO e LOPES, 2008; SING *et al.*, 2011). Neste contexto, verifica-se que a demanda mundial por derivados do petróleo é crescente e os efeitos ambientais de seu uso em atividades industriais de geração de energia e de transporte, além da forte expectativa de desabastecimento futuro de petróleo, são responsáveis pela verdadeira revolução no desenvolvimento energético e na busca de energias alternativas (O FUTURO DA INDÚSTRIA: BIODIESEL, 2006). Assim, dentro do segmento de combustíveis automotivos, a inclusão de combustíveis renováveis na matriz energética, é uma alternativa para a dependência mundial em relação ao petróleo e para minimizar as emissões causadoras do efeito estufa (KHALIL, 2006; CARTILHA BIODIESEL-SEBRAE, 2008). Além disso, o uso de biocombustíveis pode oferecer outros benefícios, dentre os quais podem-se destacar o desenvolvimento regional e a estrutura social, especialmente para os países em desenvolvimento (DEMIRBAS, 2008).

No cenário mundial o biodiesel surgiu como um sucessor promissor aos combustíveis fósseis, derivados do petróleo. Um combustível alternativo ao petrodiesel deve ser tecnicamente possível, economicamente competitivo, ambientalmente aceitável e estar facilmente disponível (DEMIRBAS, 2008). O caráter renovável torna o produto uma fonte importante de energia a longo prazo (BIODIESEL NO BRASIL, 2008). O

interesse mundial pelo biodiesel resulta de uma conjunção de fatores: é compatível com o diesel de petróleo em praticamente todas as suas propriedades; é biodegradável; gera redução nas principais emissões presentes nos gases de exaustão; possui um alto ponto de fulgor, que lhe confere manuseio e armazenamento mais seguros; e apresenta excelente lubrificidade (KNOTHE *et al.*, 2006). Acredita-se que o uso de biodiesel permitirá buscar um equilíbrio entre agricultura, desenvolvimento sócio-econômico, e o meio ambiente (DEMIRBAS, 2008).

No Brasil, juntamente com o etanol, o biodiesel compõe uma oferta importante para o segmento de combustíveis. Atualmente, existem 65 plantas produtoras de biodiesel autorizadas pela ANP para operação no país, correspondendo a uma capacidade total autorizada de 17.862,95 m<sup>3</sup>/dia. Há, ainda, 10 novas plantas de biodiesel autorizadas para construção (ANP, Boletim Mensal do biodiesel, 09/2011).

O biodiesel pode ser produzido a partir de muitas matérias-primas distintas, incluindo óleos vegetais, gorduras animais, óleos usados em frituras e até matérias graxas de alta acidez. No Brasil existe uma grande diversidade de opções para a produção de biodiesel, tais como o óleo de palma, babaçu, soja, girassol, amendoim, algodão, entre outros. Fatores como geografia, clima e economia local são determinantes na escolha de quais óleos apresentam maior interesse e melhor potencial para o emprego como biodiesel (KNOTHE *et al.*, 2006) em cada região do país.

Embora uma série de bio-matérias-primas estão atualmente sendo experimentadas para a produção de biodiesel, as microalgas surgem como uma das fontes mais promissoras para a produção de biodiesel. Deste modo, a produção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas que apresentem alto teor de lipídios constitui-se em fonte renovável de energia e poderá contribuir de forma significativa para a matriz energética mundial (MORGADO *et al.*, 2008). Como características principais as microalgas são micro-organismos fotossintéticos que utilizam energia solar associada com água e gás carbônico (CO<sub>2</sub>) para produzir biomassa, sendo a fotossíntese o processo chave para transformar a energia solar em formas de energia disponível para toda vida orgânica no ambiente. Assim, as microalgas vêm sendo consideradas como fonte potencialmente útil para a produção de biodiesel, pois sua produtividade supera a de qualquer vegetal comercialmente produzido no mundo, sendo os rendimentos em óleo por hectare equivalente de área utilizada de ordens de grandeza superiores às das oleaginosas tradicionais (LOURENÇO, 2006). Além disso, as algas podem crescer em

lugares afastados de terras cultiváveis e florestas, minimizando, assim, os danos causados à cadeia alimentar e ao ecossistema.

As microalgas são encontradas em diversos biótopos, devido à sua diversidade ecológica e adaptabilidade fisiológica (MORGADO *et al.*, 2008). Outra característica bastante atrativa nas microalgas é que estas apresentam elevadíssimas produtividades em biomassa seca, o que representa, comparativamente, menor gasto de área para o cultivo. A produção da biomassa é contínua, não segue regime de safras e o meio de cultivo (que é aquoso) pode ser reaproveitado. Como fontes de carbono podem ser utilizados o CO<sub>2</sub> residual de processos. Isto pode contribuir de forma significativa para a captura deste no ambiente minimizando as emissões de gás do efeito estufa (VILCHEZ *et al.*, 1997). Também, podem ser cultivadas em água de esgoto e ao lado de grandes plantas industriais, sintetizando o óleo a partir da digestão dos poluentes (KOH e GHAZOUL, 2008).

Para a produção de biodiesel a escolha do catalisador depende da natureza do óleo. Os catalisadores mais comumente usados são os catalisadores ácidos ou básicos. Também podem ser empregados catalisadores enzimáticos, que apresentam algumas vantagens quando comparado aos catalisadores ácidos ou básicos, mas o seu custo ainda é um fator limitante para uso na produção de biodiesel em grande escala (DEMIRBAS, 2008).

Vários parâmetros afetam a formação de ésteres na reação de transesterificação, quais sejam: temperatura, relação molar álcool:óleo, umidade do óleo, tipo de catalisador, teor de ácidos graxos livres, pureza dos reagentes, dentre outros (SCHUCHARDT *et al.*, 1998). Foi observado que o aumento da temperatura de reação tem uma influência favorável no rendimento em ésteres. O rendimento em ésteres alquílicos também aumenta quando a relação molar de álcool:óleo aumenta (DEMIRBAS, 2008). A síntese de biodiesel a partir de óleo de microalgas pode ser influenciada por diversos fatores, entre estes, as condições de cultivo, visto que este parâmetro afeta a qualidade do óleo e, conseqüentemente, a escolha da rota de síntese para a produção de biodiesel (BECKER, 1994, ROSENBERG *et al.*, 2008, MANDAL e MALLICK, 2009).

Nas últimas décadas, os estudos envolvendo microalgas, em diversos países do mundo, vêm aumentando de forma significativa em termos qualitativos e quantitativos. Este quadro reflete o potencial elevado das microalgas como matéria-prima para a produção de biodiesel (UMDU *et al.*, 2009; MIAO e WU, 2006; XU *et al.*, 2006;

OGBONNA e TANAKA, 2000; RODOLFI *et al.*, 2008; VICENTE *et al.*, 2004; MANDAL e MALLICK, 2009; WIDJAJA *et al.*, 2009, LEWIS *et al.*, 2000). Um dos desafios na utilização de microalgas é a complexidade de extração de lipídios com solventes orgânicos, cujo extrato pode ser utilizado no processo de transesterificação para obtenção de biodiesel (WAHLEN *et al.*, 2011)

No Brasil, alguns centros de pesquisa vinculados a Universidades iniciaram estudos relacionados à produção de óleo de microalgas e sua aplicação na produção de biodiesel. A Petrobras, que é referência mundial em desenvolvimento tecnológico para a produção de biocombustíveis, em parceria com as Universidades Federais do Rio Grande do Norte e de Santa Catarina, realiza pesquisas para a produção de biodiesel a partir de microalgas, que vivem nas águas salinizadas do litoral do Norte e na água proveniente de produção de petróleo do Pólo Industrial de Guamaré. No Paraná, o Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Auto-Sustentável (NPDEAS) localizado no Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná em Curitiba, tem como objetivo inicial demonstrar o conceito de geração de potência distribuída auto-sustentável a partir de biocombustíveis renováveis, possuindo uma planta piloto para a produção de microalgas. Além disso, no norte do Paraná, a Copel em parceria com o IAPAR e a Fundação de Apoio à Pesquisa e ao Desenvolvimento do Agronegócio (FAPEAGRO), vêm se dedicando desde 2009 à implantação de um projeto para seleção de microalgas, resultando a instalação de um laboratório em Londrina voltado exclusivamente à pesquisa sobre microalgas para fins energéticos.

Embora as microalgas sejam potencialmente apropriadas para a produção de biocombustíveis, os dados disponíveis na literatura sobre o cultivo de microalgas, obtenção do óleo e produção de biodiesel são ainda limitados (LOURENÇO, 2006; TEIXEIRA e MORALES, 2008). Surge, então, a necessidade de se buscar o desenvolvimento e domínio da tecnologia de extração de óleo e da produção de biodiesel a partir de microalgas.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo estudar o cultivo de microalgas dos gêneros *Scenedesmus* sp. e *Spirulina* sp., a extração do óleo desta biomassa e a produção de ésteres, visando à produção de biodiesel. Para isto, primeiramente, as microalgas foram cultivadas em escala de bancada, sendo os parâmetros de cultivo avaliados para a produção de biomassa. Na etapa seguinte, a biomassa foi colhida e seca. A partir da biomassa seca foi realizada a extração dos lipídios totais, sendo avaliados o tipo de solvente, as condições de extração e as características físico-

químicas do óleo obtido. Por fim, foram realizadas reações de transesterificação/esterificação ácida da biomassa *in situ* e do óleo extraído das microalgas, para a produção de ésteres etílicos e metílicos, avaliando-se os parâmetros de temperatura e tempo de reação.



# CAPÍTULO II

## FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### II.1. BIODIESEL

A utilização de fontes alternativas de energia é umas das grandes prioridades atuais, que vem contribuir significativamente para contornar os graves problemas ocasionados pelo desenvolvimento tecnológico. A preocupação atual pela redução da poluição e a crise energética têm estimulado o mercado mundial de biocombustíveis. A economia global mantém-se em crescimento e a demanda por energia limpa e recursos renováveis encontra-se em contínuo aumento (RIVALDI *et al.*, 2009).

O biodiesel é definido como um biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil (Lei nº 11.097, de 13 de setembro de 2005).

O biodiesel surgiu mundialmente como uma alternativa promissora aos combustíveis minerais, derivados do petróleo. As projeções mundiais previstas apontam substituição crescente das fontes de combustível de origem fóssil pelas fontes renováveis de origem de biomassa, dentre estas as derivadas da cana-de-açúcar e do milho, para a produção de etanol, e as derivadas dos óleos vegetais de canola, de soja, de mamona, entre outros, para a produção de biodiesel (CARTILHA BIODIESEL – SEBRAE, 2008).

Juntamente com o etanol, o biodiesel compõe uma oferta importante para o segmento de combustíveis. Ambos são denominados de biocombustíveis por serem derivados de biomassa (matéria orgânica de origem vegetal ou animal que pode ser utilizada para a produção de energia), menos poluentes e renováveis. O caráter renovável torna o produto uma fonte importante de energia em longo prazo (BIODIESEL NO BRASIL, 2008). O interesse mundial pelo biodiesel resulta de uma conjunção de fatores (KNOTHE *et al.*, 2006), quais sejam:

- é compatível com o diesel de petróleo em praticamente todas as suas propriedades;
- é derivado de matérias-primas renováveis, reduzindo, assim, a dependência sobre os derivados de petróleo;
- é biodegradável;
- gera redução nas principais emissões presentes nos gases de exaustão;
- possui um alto ponto de fulgor, que lhe confere manuseio e armazenamento mais seguros;
- apresenta excelente lubricidade;
- é consideravelmente menos tóxico que o combustível diesel;
- pode ser armazenado adequadamente, por um ano, sem mudanças drásticas em seus parâmetros de qualidade.

Alguns problemas inerentes à produção e uso de biodiesel são relacionados (KNOTHE *et al.*, 2006):

- ao seu alto custo;
- ao aumento que causa nas emissões de NO<sub>x</sub> nos gases de exaustão;
- à sua baixa estabilidade à oxidação, quando exposto ao ar.

Em muitos países, o alto custo da produção de biodiesel tem sido compensado por legislações específicas, marcos regulatórios ou subsídios na forma de isenções fiscais (KNOTHE *et al.*, 2006). No Brasil, por meio do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), o Governo Federal organizou a cadeia produtiva, definiu as linhas de financiamento, estruturou a base tecnológica e editou o marco regulatório do novo combustível. O PNPB tem como principais diretrizes, implantar um programa sustentável, promovendo inclusão social, garantir preços competitivos, qualidade e

suprimento e produzir o biodiesel a partir de diferentes fontes oleaginosas e em regiões diversas.

Com relação às emissões de exaustão, estudos demonstram que o biodiesel, em comparação com o diesel proveniente do petróleo, apresentou decréscimo considerável nas emissões de CO, menor emissão de partículas totais, redução significativa nas emissões de compostos aromáticos, redução de 30% de emissão de aldeídos e cetonas e a mutagenicidade relacionada às emissões do biodiesel foi muito inferior, indicando que o biodiesel reduz os riscos à saúde associados ao câncer. Por outro lado, o uso de biodiesel levou a um aumento nas emissões de NO<sub>x</sub>, quando a administração do motor (intervalo e comportamento de injeção) permaneceu inalterada, porém, essas taxas de emissões foram inferiores ao limite legal de 7 g.kWh<sup>-1</sup> (KNOTHE *et al.*, 2006).

A produção de biodiesel está significativamente acelerada, uma vez que o governo brasileiro estabeleceu a obrigatoriedade da adição de biodiesel ao combustível de petróleo mediante a lei nº 11097/2005, sendo que desde janeiro de 2010 o óleo diesel comercializado em todo o Brasil contém 5% de biodiesel (Resolução nº 6/2009). A existência de um mercado cativo e crescente para o biodiesel representa um estímulo econômico muito importante para empresas capitalizadas e com maior escala de produção (CARTILHA DO BIODIESEL, 2008; ANP, 2011).

O Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo, com uma produção anual, em 2010, de 2,4 bilhões de litros e uma capacidade instalada para cerca de 5,8 bilhões de litro (ANP, 2011).

A produção e o uso do biodiesel no Brasil propiciam o desenvolvimento de uma fonte energética sustentável sob os aspectos ambiental, econômico e social e também trazem a perspectiva da redução das importações de óleo diesel. Em 2008, o uso do biodiesel evitou a importação de 1,1 bilhões de litros de diesel de petróleo resultando uma economia de cerca de US\$ 976 milhões, gerando divisas para o País e, ainda, de acordo com os dados do Ministério de Desenvolvimento Agrário, a produção de biodiesel gerou cerca de 600 mil postos de trabalho no campo (ANP, 2010).

O Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel não é restritivo, permitindo a utilização de diversas oleaginosas ou matérias-primas animais. Independente da matéria-prima e da rota tecnológica, o biodiesel é introduzido no mercado nacional de combustíveis com especificação única. Ainda que cada oleaginosa tenha suas próprias características, o biodiesel comercializado pelos diversos agentes econômicos autorizados em todo o território nacional deve atender à especificação

definida no Regulamento Técnico da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP nº 7, de 19/3/2008). A Tabela 1 apresenta as especificações brasileiras para a comercialização do biodiesel.

**Tabela 1** – Especificações para o biodiesel.

<b>Propriedades</b>	<b>Limites</b>
Massa específica a 20°C (kg/m <sup>3</sup> )	850-900 kg/m <sup>3</sup>
Viscosidade Cinemática a 40°C	3,0-6,0 mm <sup>2</sup> /s
Teor de Água, máx.	500 mg/kg
Contaminação Total, máx.	24 mg/kg
Ponto de fulgor, mín.	100,0 °C
Teor de éster, mín	96,5 % massa
Resíduo de carbono	0,050 % massa
Cinzas sulfatadas, máx.	0,020 % massa
Enxofre total, máx.	50 mg/kg
Sódio + Potássio, máx.	5 mg/kg
Cálcio + Magnésio, máx.	5 mg/kg
Fósforo, máx.	10 mg/kg
Corrosividade ao cobre, 3h a 50 °C, máx.	1
Número de Cetano	Anotar
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	19 °C
Índice de acidez, máx.	0,50 mg KOH/g
Glicerol livre, máx.	0,02 % massa
Glicerol total, máx.	0,25 % massa
Mono, di, triacilglicerol	Anotar % massa
Metanol ou Etanol, máx.	0,20 % massa
Índice de Iodo	Anotar g/100g
Estabilidade à oxidação a 110°C, mín.	6 h

Fonte: ANP nº 7, de 19/3/2008

O uso de óleos vegetais puros apresenta um comportamento satisfatório como combustível, porém, devido à alta viscosidade e baixa volatilidade, o uso direto de óleos vegetais nos motores é problemático. Altas viscosidades causam a má atomização do

combustível na câmara de combustão do motor, acarretando problemas como a ocorrência de depósitos em suas partes internas, entupimento dos bicos injetores, resultando uma diminuição da potência e aumento dos custos de manutenção (KNOTHE *et al.*, 2006; DEMIRBAS, 2005).

Para resolver o problema da alta viscosidade dos óleos vegetais, algumas tecnologias passaram a ser investigadas e empregadas na produção de combustíveis renováveis, tendo como insumo básico o óleo vegetal. Estes processos são denominados:

- Processos Químicos: transesterificação alcalina e esterificação ácida;
- Processo Bioquímico: transesterificação enzimática;
- Processos Termoquímicos: craqueamento catalítico (pirólise) e hidrocrackeamento;

Para a produção de biodiesel a escolha do catalisador depende da natureza do óleo. Os catalisadores mais comumente utilizados são os catalisadores ácidos ou básicos. Também podem ser empregados catalisadores enzimáticos, que apresentam certas vantagens sobre os catalisadores ácidos ou básicos, mas o seu custo ainda é um fator limitante para uso na produção de biodiesel em grande escala (DEMIRBAS, 2008).

## **II.2. MATÉRIAS-PRIMAS PARA A PRODUÇÃO DE BODIESEL**

Uma grande variedade de matérias-primas estão sendo utilizadas para a produção de biodiesel, como por exemplo: soja, dendê, amendoim, algodão, canola, girassol, nabo forrageiro, pinhão manso, óleos de frituras, sebo ou gordura animal (KNOTHE *et al.*, 2006; DEMIRBAS, 2008). Os parâmetros para a escolha da melhor matéria-prima a ser utilizada no processo de produção de biodiesel dependem do teor de óleo, da boa produtividade e, também, da disponibilidade da oleaginosa na região.

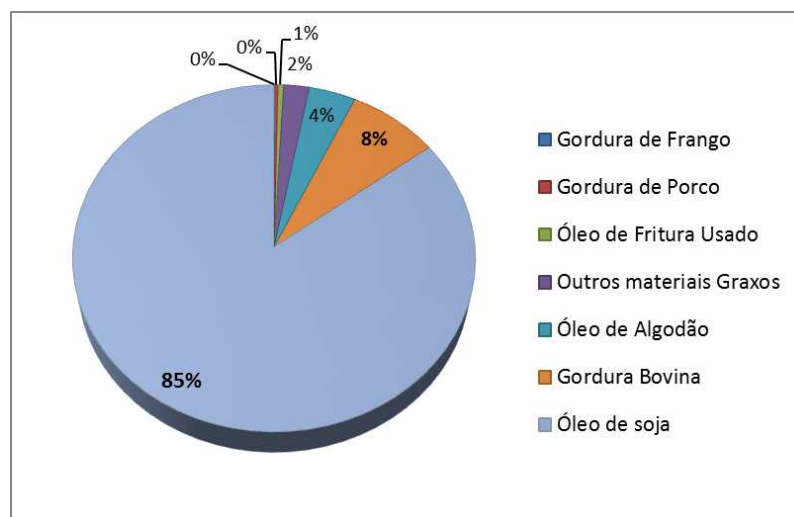
O Brasil apresenta uma extensa área geográfica, clima tropical e subtropical, que favorece uma ampla diversidade de matérias-primas para a produção de biodiesel. Muitas são as alternativas potenciais para a produção de biodiesel no Brasil, tais como soja, dendê, mamona, girassol, algodão, amendoim, canola, coco, macaúba, nabo forrageiro, pequi, pinhão manso, buriti, jojoba e milho, conforme mostrado na Figura 1. Destacam-se, dentre as principais matérias-primas oleaginosas, o algodão, o amendoim, o dendê, o girassol, a mamona, pinhão manso e soja. Entretanto, conforme pode ser

visto na Figura 2, atualmente 85% da matéria-prima utilizada na produção de biodiesel é soja.



**Figura 1** – Zoneamento agroecológico potencial de matérias-primas no Brasil.

Fonte: Adaptado de CRESTANA (2005).



**Figura 2** – Matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel.

Fonte: Adaptado do Boletim mensal do biodiesel – SRP (10/2011) – ANP.

Mais recentemente, diversos estudos reportam, na mídia e literatura especializada, o potencial de fontes oleaginosas não usuais, não raro consorciando oleaginosas perenes, como a macaúba, nabo forrageiro e o pinhão-manso, com a produção de gado e grãos, ou, ainda, o desenvolvimento de biorreatores para a produção de óleos a partir de algas (SUAREZ *et al.*, 2009).

Segundo SUAREZ *et al.* (2009), um dos grandes desafios dos processos de produção de biocombustíveis é dispor de matérias-primas capazes de atender às expectativas dos programas energéticos sem impactar de forma significativa a produção de alimentos. A Tabela 2 mostra um quadro comparativo entre as produtividades, por hectare, de diversas fontes de óleos e gorduras tradicionais (CHISTI, 2007). Cabe salientar que os dados apresentados na Tabela 2 representam valores médios divulgados na literatura e não são absolutos, pois a produtividade de culturas agrícolas depende de vários fatores, tais como clima, nutrientes no solo e irrigação, dentre outros (SUAREZ *et al.*, 2009).

Muitas pesquisas se concentram na produção de biodiesel de óleos vegetais como os óleos de soja, girassol, canola, palma e pinhão manso, mas há pouca informação disponível sobre o óleo de microalgas como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel (MIAO e WU, 2006). O uso de microalgas para a produção de biodiesel não compromete a produção de alimentos, forragens e outros produtos derivados do cultivo em terra agriculturável (CHISTI, 2007).

**Tabela 2** – Fontes de óleo para a produção de biodiesel.

<b>Matéria-prima</b>	<b>Rendimento óleo (L/ha)</b>
Milho	172
Soja	446
Canola	1.190
Coco	2.689
Óleo de Palma	5.950
Microalga <sup>a</sup>	136.900
Microalga <sup>b</sup>	58.700

<sup>a</sup> biomassa com 70% óleo (g);

<sup>b</sup> biomassa com 30% óleo (g).

Fonte: CHISTI(2007).

Atualmente, as microalgas, por serem organismos fotossintetizantes muito eficazes no processo de conversão da energia luminosa em energia química, têm chamado muito a atenção de vários centros de pesquisas, como matéria-prima para a produção de biodiesel (MANDAL e MALLICK, 2009). Alguns países, como o Japão, os Estados Unidos e a Alemanha, têm investindo substanciais recursos em programas de longo prazo para a pesquisa sobre fontes limpas de energia, sendo as microalgas um dos principais organismos pesquisados (LOURENÇO, 2006). Tendo em vista a enorme produtividade das microalgas, o rendimento médio da produção de biodiesel a partir de microalgas pode ser de 10 a 20 vezes superior aos rendimentos obtidos a partir de sementes oleaginosas ou óleos vegetais (GOUVEIA e OLIVEIRA, 2009), considerando-se o seu potencial teórico.

Desta forma, torna-se claro que o cultivo de biomassa de microalgas apresenta potencial elevado para a produção de biocombustíveis.

### **II.3. MICROALGAS**

Alga é um termo de uso popular, empregado para denominar uma enorme variedade de organismos, tão diferentes quanto sua morfologia, reprodução, fisiologia e ecologia. De fato, encontram-se incluídos entre as algas desde organismos morfológicamente muito simples, os unicelulares, até as gigantescas formas habitantes dos mares frios, os vareques, que já apresentam talos multicelulares com formação de tecidos (BICUDO e MENEZES, 2005). A principal via de produção de alimento pelas algas é a fotossíntese, ou seja, a síntese dos metabólitos essenciais a partir de substâncias químicas relativamente simples ( $\text{CO}_2$ ) e de energia luminosa (BICUDO e MENEZES, 2005).

As microalgas, sob o ponto de vista biotecnológico, não constituem um grupo de micro-organismos muito estudado. Dentre as dez mil espécies de microalgas que se acredita existirem, pouco mais de mil linhagens são mantidas em coleções ao redor do mundo. Apenas algumas centenas foram investigadas por seu conteúdo químico e somente uma pequena quantidade tem sido cultivada em escala industrial. Assim, por serem pouco exploradas, representam grande oportunidade para novas descobertas (BERTOLDI *et al.*, 2008).



Além da produtividade, as microalgas apresentam numerosas vantagens: ciclo de vida de poucos dias, permitindo colheitas contínuas; ocupam áreas de cultivo pequenas; podem ser passíveis de manipulação genética, visando à obtenção da composição nutricional desejada; e possibilidade de se utilizar o CO<sub>2</sub> oriundo de empresas poluidoras como insumo para a fotossíntese das algas, o que colabora para a diminuição das emissões que contribuem para o efeito estufa (SUAREZ *et al.*, 2009, CHISTI, 2007). Além disso, as algas são facilmente controladas, não afetam drasticamente o ambiente, pois não precisam de aplicação de pesticidas, e apresentam multiplicação alta em intervalo de tempo pequeno (BENEMAN, 1990).

Nos últimos anos, muito interesse tem sido focado no potencial biotecnológico das microalgas, principalmente, devido à identificação de diversas substâncias sintetizadas por estes organismos. Cada espécie de microalga produz diferentes razões de lipídios, carboidratos e proteínas (MANDAL e MALLICK, 2009). A imensa biodiversidade e consequente variabilidade na composição bioquímica da biomassa obtida das culturas microalgais, aliadas ao emprego de melhoramento genético e ao estabelecimento de tecnologia de cultivo em grande escala, vêm permitindo que determinadas espécies sejam utilizadas comercialmente (DERNER *et al.*, 2006).

A biomassa produzida destina-se às mais diversas aplicações, tais como produção de proteína unicelular, lipídios, carotenóides, clorofila, enzimas, ésteres, antibióticos, hidrocarbonetos e vitaminas (BECKER, 1994). Nesse sentido, cultivos de microalgas têm sido realizados visando à produção de biomassa, tanto para uso na elaboração de alimentos quanto para a obtenção de compostos naturais com alto valor no mercado mundial. Dentre os inúmeros compostos extraídos, ou com potencial de exploração comercial, podem ser relacionados ácidos graxos poli-insaturados, carotenóides, ficobilinas, polissacarídeos, vitaminas, esteróis e diversos compostos bioativos naturais (DERNER *et al.*, 2006).

### **II.3.1. Cultivo de microalgas**

Uma das características do cultivo de microalgas para a produção de biomassa é que o conteúdo e a composição dos lipídios e ácidos graxos podem ser influenciados por fatores como luz, temperatura, concentração da fonte de nitrogênio e concentração de dióxido de carbono (MORAIS e COSTA, 2008; LI *et al.*, 2008; MIAO e WU, 2004).

Pesquisas relacionadas com a interação entre intensidade luminosa, temperatura, agitação e concentração de nutrientes podem contribuir para a otimização do cultivo, pois o crescimento de microalgas deriva de diversas reações bioquímicas e biológicas (DUARTE *et al.*, 2001). O pH do meio também é importante no processo de cultivo, variando de neutro a alcalino para a maioria das espécies de microalgas (BERTOLDI, 2008).

Quando se trata de meio de cultura sintético, o alto custo dos nutrientes pode representar fator limitante para a produção. No caso de cultivos em meios de cultura alternativos (resíduos industriais ou agrícolas), os fatores limitantes para a produção de biomassa restringem-se à luz, à temperatura e à agitação da cultura (BERTOLDI, 2008).

A luz é fundamental para o crescimento microalgal, pois atua como a principal fonte de energia no processo de produção de biomassa (BECKER, 1994; BERTOLDI, 2008). A luminosidade induz à atividade enzimática, influenciando a síntese de proteína. O excesso de luz, também, pode provocar efeito letal nas células pela formação de peróxido de hidrogênio (substância tóxica para as microalgas) na presença de oxigênio, sendo tal reação denominada foto-oxidação ou morte fotooxidativa.

A agitação da cultura torna-se muito importante para otimizar todos os fatores essenciais relacionados à produção de biomassa de microalgas. A agitação da cultura, em meio líquido, mantém as células em suspensão evitando que algumas células fiquem depositadas no fundo do fotobiorreator e outras permaneçam na superfície recebendo luz em excesso (BECKER, 1994; BERTOLDI, 2008).

Como toda planta que faz fotossíntese, as algas produzem oxigênio como produto de reação (Equação 1), na qual cada mol de CO<sub>2</sub> consumido, um mol de O<sub>2</sub> é formado. Se há uma estagnação do meio, oxigênio pode se acumular, provocando uma inibição da eficiência fotossintética, fotorrespiração ou até mesmo a morte fotooxidativa. Assim, a agitação evita a foto-oxidação pela eliminação do oxigênio supersaturado no meio (BECKER, 1994; BERTOLDI, 2008).



Estes organismos podem ser cultivados em diversos sistemas de produção, com volume variando desde poucos litros até bilhões de litros. Geralmente, o cultivo de microalgas ocorre em tanques abertos com pequena profundidade visando assegurar a incidência adequada de luz solar. Esses tanques podem ser de plástico, concreto, fibra

de vidro, alvenaria ou laminados. Recentemente, alguns cultivos têm sido desenvolvidos em equipamento específico, denominado fotobiorreator, com luz solar ou artificial e adição de nutrientes, visando a alcançar elevadíssima produtividade. Os cultivos são realizados em sistema fechado, em painéis de forma achatada ou em serpentinas, espirais ou cilindros, construídos com tubos de plástico, vidro ou policarbonato (DERNER *et al*, 2006). Nos fotobiorreatores é possível controlar as condições de cultivo (quantidade dos nutrientes, temperatura, iluminação, pH etc.). Isto implica uma elevada produtividade, viabilizando a produção comercial de uma série de compostos de elevado valor de mercado. A desvantagem dos reatores em relação aos tanques abertos está relacionada com os custos de construção e manutenção (BERTOLDI, 2008). Por outro lado, o cultivo de microalgas em sistemas abertos, considerado uma forma de agricultura, tem como benefício a luminosidade natural sem custos. No entanto, há o risco de contaminação por outros organismos (BERTOLDI, 2008).

### **II.3.2. Meios de cultura e fontes nutricionais**

Microalgas podem crescer autotroficamente utilizando luz e dióxido de carbono. Também, podem ser cultivadas em sistema heterotrófico, utilizando compostos orgânicos como energia e fonte de carbono, ou, ainda, em sistema de cultivo mixotrófico. Nesse sistema utilizam-se simultaneamente a fonte luminosa e o substrato orgânico como fonte de energia, além de CO<sub>2</sub> e substrato orgânico como fontes de carbono (BERTOLDI, 2008; BECKER, 1994).

Os custos com reagentes químicos, para a elaboração do meio de cultura, constituem um dos maiores problemas do cultivo de microalgas (SIPAÚBA-TAVARES, 1995). O custo do substrato para o cultivo de micro-organismos, para a produção de proteína unicelular e outros bioprodutos, costuma representar de 40 a 60% do custo total. Dentre os meios de cultura alternativos utilizados para a produção de biomassa de microalgas destacam-se: esgoto doméstico esterilizado, efluentes de biodigestores, lodo digerido, despejos industriais purificados, vinhaça de cana-de-açúcar, águas residuais da produção de azeite de oliva e resíduos da suinocultura (BERTOLDI, 2008).

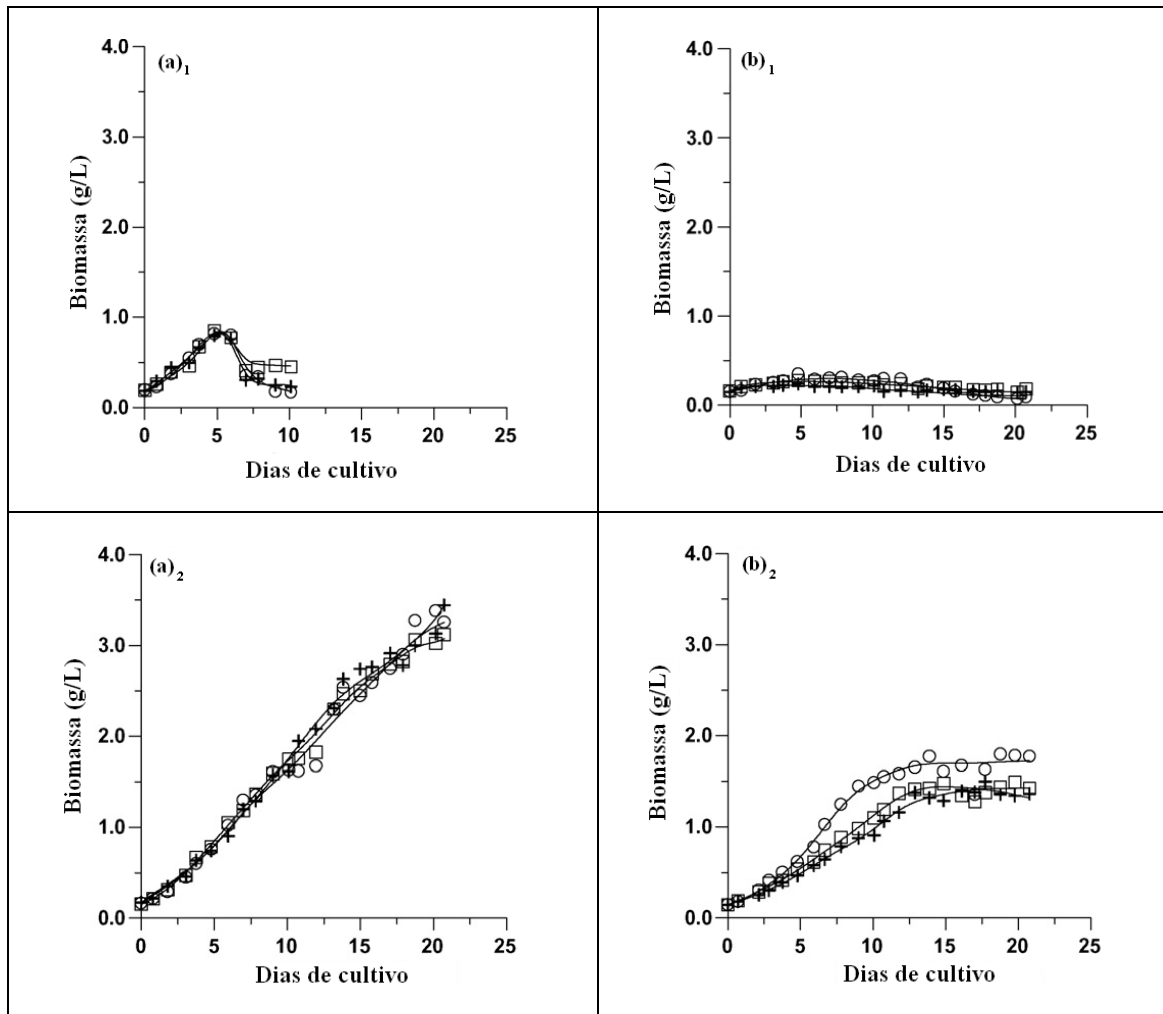
Muitos meios de cultura têm sido desenvolvidos para diferentes cultivos de algas, mas nenhum meio pode ser dito como o melhor. As principais considerações para o desenvolvimento de um meio de cultura são (BECKER, 1994):

- a) a concentração total de sal depende do biotipo da alga;
- b) fonte de carbono: aproximadamente 50% da biomassa algal consiste em carbono; um fornecimento suficiente de carbono é de vital importância para o sucesso do cultivo;
- c) fonte de nitrogênio adequada e econômica;
- d) concentração de outros elementos principais como potássio, magnésio, sódio, sulfato e fosfato;
- e) o valor do pH do meio;
- f) microelementos, que são conhecidos por serem essenciais e que são requeridos em quantidades muito pequenas nas soluções;
- g) adição de componentes orgânicos e de substâncias que promovam o crescimento.

Os meios de cultura são desenvolvidos para se adaptar tanto às necessidades nutricionais das algas, como também para as condições econômicas do momento. O meio deve atender às necessidades das espécies a serem cultivadas, fornecendo minerais necessários ou componentes orgânicos e fontes de energia necessárias para o crescimento e síntese celular (SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA, 2001).

Algas requerem uma fonte de carbono inorgânico para realizar a fotossíntese. O carbono pode ser fornecido na forma de CO<sub>2</sub> gasoso ou na forma de bicarbonato. Análises químicas mostram que em média aproximadamente 1,8 kg de dióxido de carbono são necessários para produzir 1 kg de alga (BECKER, 1994). O carbono inorgânico, fundamental para o processo de fotossíntese, constitui fonte relacionada ao pH. Em pH abaixo de 5,0 apenas o CO<sub>2</sub> é consumido pela microalga, entre 7 e 9 o bicarbonato passa a ser importante e acima de 9,5 destaca-se o carbonato (BERTOLDI, 2008).

Segundo Bertoldi (2008), o CO<sub>2</sub> é a fonte de carbono normalmente utilizada e quando empregado acima de 10% pode ocorrer a inibição do crescimento algal. Porém, Morais e Costa (2007) estudaram o cultivo das microalgas *Spirulina* sp. e *Scenedesmus obliquus*, em meios contendo uma concentração de 12% de gás carbônico no ar, mostrando que ambas podem crescer neste meio. Isto indica que estes organismos podem ser usados para sequestrar o gás carbônico atmosférico produzido pelos gases de combustão. Para a *Spirulina* sp a ausência de CO<sub>2</sub> cessou a produção de biomassa após cinco dias de cultivo, conforme pode ser observado na Figura 3.



**Figura 3** – Monitoramento da concentração de biomassa com diferentes concentrações de CO<sub>2</sub>: a<sub>1</sub> e a<sub>2</sub>) *Spirulina* sp com 6 e 12% de CO<sub>2</sub>; b<sub>1</sub> e b<sub>2</sub>) *Scenedesmus obliquus* com 6 e 12% de CO<sub>2</sub>, respectivamente.

Fonte: MORAIS e COSTA (2007).

Depois do carbono, o nitrogênio é quantitativamente o elemento mais importante na nutrição da alga, contribuindo para a formação de proteínas (BECKER, 1994). Um fator essencial na preparação do meio de cultura para muitas algas é a forma em que o nitrogênio é fornecido. Geralmente, as algas são capazes de utilizar nitrato, nitrito, amônia ou ureia. Quando a fonte de nitrogênio apresenta-se na forma de nitrato, a microalga realiza gastos celulares energéticos para reduzir esse íon a nitrito, posteriormente, ocorre outra redução gerando a amônia (forma de nitrogênio utilizada pela alga em seu metabolismo) (BERTOLDI, 2008). Na prática a preferência para o fornecimento de fonte de nitrogênio é na forma de amônia ou ureia, que são mais favoráveis que nitrato ou nitrito, por serem mais caros e, também, por requererem

considerável energia metabólica para sua assimilação, conforme discutido anteriormente. A taxa de crescimento é a mesma utilizando amônia ou ureia. Em média, a quantidade de nitrogênio requerida por muitas algas verdes é de aproximadamente 5 a 10% da sua massa seca ou 5-50 mmol/L (BECKER, 1994). A redução na quantidade de nitrogênio no meio de cultura possibilita que lipídios e carboidratos sejam sintetizados. Por outro lado, o aumento na concentração de nitrogênio no meio de cultura pode elevar o teor de clorofila na biomassa microalgal (BERTOLDI, 2008).

O fósforo é um nutriente necessário para o crescimento normal de todas as algas. É essencial para qualquer processo celular, atuando como transportador de substratos ou energia química, pois faz parte dos ácidos nucléicos e das membranas. Também, é tão importante que pequenas quantidades no meio de cultura podem limitar o crescimento de algumas espécies de microalgas (BECKER, 1994; BERTOLDI, 2008). Semelhantes aos efeitos observados no crescimento das algas sob a escassez de nitrogênio, culturas algais com deficiência de fósforo tendem a acumular grandes quantidades de lipídios, enquanto o conteúdo de proteína, clorofila e ácidos nucléicos diminuem (BECKER, 1994). De fato, o cultivo de *Chlorella*, contendo 0,25 mg/L de fosfato apresentou 15,7% de proteína. Entretanto, com a elevação da concentração de fosfato para 0,50 mg/L a quantidade de proteína alcançou 37%. Assim, a quantidade de monohidrogeno fosfato de potássio ( $K_2HPO_4$ ) adicionada influenciou a concentração de proteína. Em contra partida, a carência de fosfato no meio produziu aumento no teor de lipídios na composição da biomassa seca (BERTOLDI, 2008).

### II.3.3. Fotobiorreatores

Fotobiorreatores têm sido muito utilizados para a produção de grandes quantidades de biomassa de microalgas. Ao contrário de lagoas abertas os fotobiorreatores permitem essencialmente a cultura de uma única espécie de microalga, ou seja, a cultura fica isolada de qualquer contaminante externo (MOLINA GRIMA *et al.*, 1999, ROSENBERG *et al.*, 2008). Os fotobiorreatores proporcionam esterilidade e permitem um controle muito maior sobre os parâmetros da cultura, tais como a intensidade de luz, a quantidade de dióxido de carbono, componentes nutricionais e temperatura.

As configurações dos fotobiorreatores são descritas por BECKER (1994), quais sejam: tubulares fechados; cilíndricos fechados; tanques circulares; tanques retangulares e tanques inclinados.

As configurações da disposição dos fotobiorreatores são numerosas, podendo ser abertos ou fechados e, normalmente, são construídos de materiais transparentes que permitem a entrada de luz (BECKER, 1994; CHISTI, 2007; ROSENBERG *et al.*, 2008). A Figura 4 mostra alguns sistemas de fotobiorreatores.

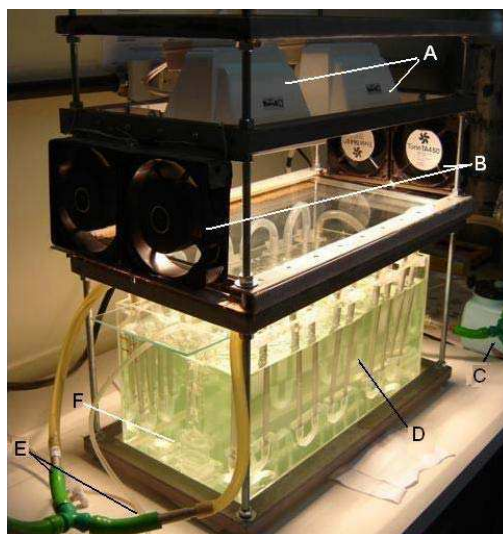


**Figura 4** – Diferentes configurações de fotobiorreatores.

Fontes: XU *et al.* (2006); CHISTI (2007); SCHENK *et al.* (2008), Revista Biodieselbr;  
[http://www.institut-paul-ricard.org/Oceano/02News\\_05Recherche\\_03spiruline.htm](http://www.institut-paul-ricard.org/Oceano/02News_05Recherche_03spiruline.htm)).

No entanto, nos cultivos em escala de bancada erlermeyers podem ser usados como fotobiorreatores (MORAIS e COSTA, 2008; SPECTOR *et al.*, 2008). Um aspecto importante que deve ser avaliado em qualquer configuração de fotobiorreator é a taxa de luminosidade que pode ser rapidamente atenuada pelas células suspensas no meio, levando a uma distribuição heterogênea da intensidade de luz dentro dos fotobiorreatores e, conseqüentemente, baixa produtividade (OGBONNA e TANAKA, 2000).

Um fotobiorreator denominado por Sistema Agitação com Bombeamento por Borbulhamento de Ar (BBA), foi desenvolvido por Teixeira *et al.* (2008) para o cultivo de microalgas. O sistema BBA é composto por um aquário de acrílico, iluminação posicionada acima do aquário, um sistema de controle de temperatura do meio e bomba de injeção de ar, conforme mostrado na Figura 5. Segundo os autores, o sistema de agitação BBA promoveu um aumento de 2,7 vezes na produtividade em biomassa de microalga *Spirulina*, em relação à produtividade média de cultivos comerciais, mostrando-se bastante promissor.



**Figura 5** – Fotobiorretor: A) lâmpadas de halogênio de 1.000W; B) ventiladores; C) compressor de ar do sistema de agitação do meio (BBA); D) tanque do fotobiorretor; E) mangueiras do sistema de termostatização do cultivo; e F) sistema BBA.

Fonte: TEIXEIRA *et al.* (2008).

Sob condições ideais, as microalgas são capazes de se duplicar dentro de poucas horas e alcançar densidades de até 60 g/L. Os desenvolvimentos recentes no cultivo de

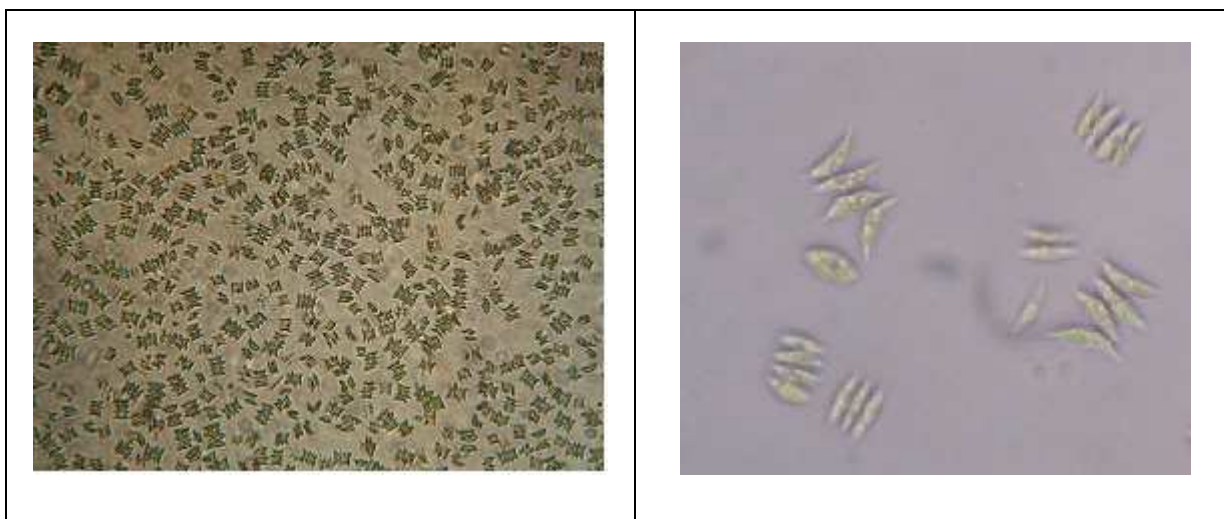


microalgas heterotróficas e o baixo custo dos fotobiorreatores têm fornecido vantagens econômicas no crescimento controlado das microalgas (ROSENBERG *et al.*, 2008).

O crescimento heterotrófico pode ser realizado em fotobiorreatores que melhoram o rendimento em biomassa e reduzem o custo de produção do óleo de microalga. Um baixo custo é importante e desejável para aplicação comercial na produção de biodiesel a partir do óleo de microalga. Assim, o desenvolvimento de culturas de microalgas com alta quantidade de lipídios é um modo novo e promissor para a produção de biodiesel no futuro (MIAO e WU, 2006).

#### II.3.4. *Scenedesmus* sp.

*Scenedesmus* sp. é o gênero de algas verdes mais comum. A colônia sempre plana é formada por 2 ou 4 células, mas podem ter 8, 16 ou 32 e, raramente, são unicelulares. As células podem ser elipsóides, ovóides, fusiformes ou lunadas e podem ser todas iguais ou as externas serem de uma forma e as internas de outra, conforme mostrado na Figura 6 (BICUDO e MENEZES, 2005). Estas algas são comumente encontradas no plâncton de água doce de rios, lagos e lagoas.



**Figura 6** – Colônia de *Scenedesmus* sp.

Fonte: Foto do autor, tirada do cultivo no LCHBio.

A *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) apresenta cenóbios (colônias) formados por quatro células, dispostas linear ou alternadamente, as externas arcuadas ou lunadas, afiladas, curvadas moderada a acentuadamente para fora do cenóbio. As células internas

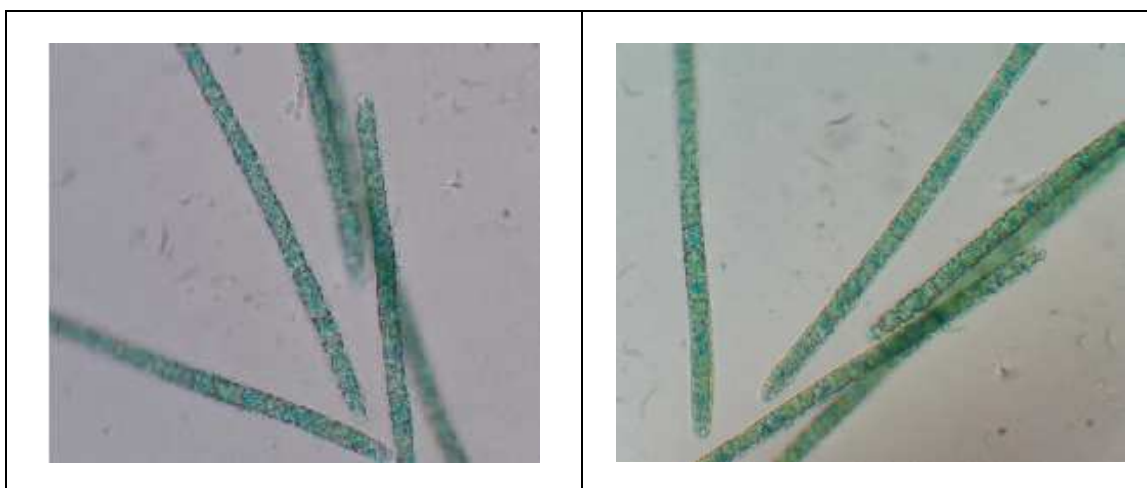
são retas ou levemente arcuadas e apresentam ápices afilados, já a *Scenedesmus acutus*, assemelha-se com *Scenedesmus acuminatus*, mas possui as células externas com leve curvatura para fora do cenóbio (MORESCO e BUENO, 2007).

O teor de lipídios nas microalgas *Scenedesmus* sp. pode chegar até 40 % em cultivo em laboratório, dependendo das condições nutricionais do meio (BECKER, 1994).

### II.3.5. *Spirulina* sp.

A *Spirulina* sp. é uma microalga verde-azulada multicelular e filamentosa, cujos filamentos ou tricomas tem forma helicoidal (Figura 7). As diversas espécies podem variar as suas dimensões, ocorrendo polimorfismo dentro de uma mesma espécie. Como exemplo, tem-se a *Spirulina máxima* que é encontrada com forma reta, predominante, e espiralada. Esta microalga é mesofílica, com temperatura ótima de crescimento de 35 °C a 37°C, sendo que algumas cepas podem crescer de 18 a 39 °C.

A *Spirulina* sp. é uma cianobactéria que se reproduz com rapidez. De acordo com Cozza e Costa (2000), a *Spirulina máxima*, quando cultivada em laboratório, pode produzir em média 12% de lipídios, sendo estes de grande importância para várias aplicações. As cianobactérias são, também, fontes de compostos de grande interesse comercial, tais como ficocianina, clorofila,  $\beta$ -caroteno e  $\gamma$ -linolênico.



**Figura 7**– Alga *Spirulina* sp.

Fonte: Foto do autor, tirada do cultivo no LCHBio.

## II. 4. ÓLEO NAS MICROALGAS

Algas crescem praticamente em qualquer lugar onde há bastante sol. Todas as algas contêm proteínas, carboidrato, lipídios e ácidos nucleicos em proporções variadas. O conteúdo de lipídios da biomassa microalgal pode variar entre 1 a 40% da massa seca e, em certas condições de cultivo, pode alcançar até 85%. Os lipídios algais são tipicamente compostos por glicerol, açúcares ou bases esterificadas e ácidos graxos, podendo ser tanto saturados quanto mono ou poli-insaturados. Os ácidos graxos correspondem à maior fração dos lipídios e, em algumas espécies, os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) representam entre 25 e 60% dos lipídios totais (BECKER, 1994; DERNER *et al.*, 2006). O óleo das microalgas possui características semelhantes aos óleos de peixe e óleos vegetais. O conteúdo de lipídios excede a maioria das plantas terrestres e pode ser considerado como um substituto potencial para os produtos do óleo de origem fóssil (OIL PRODUCTION, 2008).

Microalgas contêm lipídios e ácidos graxos como componentes da membrana, produtos de armazenamento, metabólitos e fontes de energia. Cada espécie de microalga produz diferentes razões de lipídios, carboidratos e proteínas, conforme pode ser observado na Tabela 3. Entretanto, a composição bioquímica da biomassa das microalgas não é determinada somente pela natureza de cada espécie, mas depende, também, de fatores como intensidade de luz, temperatura, pH, nutrientes e agitação, como discutido anteriormente (MIAO e WU, 2004; TEIXEIRA e TEIXEIRA, 2006; MANDAL e MALLICK, 2009).

A característica distintiva mais significativa de óleo de alga é seu rendimento e, conseqüentemente, seu rendimento em biodiesel. Na literatura os dados de rendimento de óleo nas microalgas são conflitantes. Esta discrepância pode ser explicada pelo fato de que os rendimentos em lipídios de cada espécie de alga são diferentes. Um aspecto muito importante é que o rendimento em lipídios é afetado, principalmente, pelas condições de cultivo (DEMIRBAS, 2008; BERTOLDI, 2008, MOLINA GRIMA *et al.*, 1999; BECKER, 1994; MIAO e WU, 2004; COZZA e COSTA, 2000; TEIXEIRA e TEIXEIRA, 2006; MANDAL e MALLICK, 2009; DERNER *et al.*, 2006; MIAO e WU, 2006; XU *et al.*, 2006; MORAIS e COSTA, 2008). Entretanto, destaca-se a necessidade de mais pesquisas no desenvolvimento de métodos e tecnologias de cultivo das microalgas, explorando o potencial destas na produção de óleo (LOURENÇO, 2006).

**Tabela 3** – Composição química das microalgas expressas em base de massa seca (%).

<b>Algas</b>	<b>Proteína</b>	<b>Carboidrato</b>	<b>Lipídio</b>	<b>Ácido nucléico</b>
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14	3-6
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	1-9	-
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40	-
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22	4-5
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2	-
<i>Spirogyra</i> sp.	6-20	33-64	11-21	-
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8	-
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6	-
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20	-
<i>Prymnesium parvum</i>	28-45	25-33	22-38	1-2
<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3	-
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14	-
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9	2-5
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7	3-4.5
<i>Synechococcus</i> sp.	63	15	11	5
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7	-

Fonte: BECKER (1994).

De acordo com Demirbas (2008), algumas estimativas do rendimento (por acre) de óleo de algas são mais de 200 vezes o rendimento dos óleos de plantas e/ou vegetais, sendo que aproximadamente 46 toneladas de óleo/hectare/ano podem ser produzidas por diatomáceas (algas). Já segundo Bertoldi (2008), microalgas podem produzir até 30 vezes mais óleo do que a soja, por unidade de área, com destaque para a composição dos ácidos graxos presentes nesses micro-organismos, que são, na sua maioria, insaturados. Porém, Morais e Costa (2008), que cultivaram as microalgas *Spirulina* sp., *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris* e *Chlorella kessleri* em laboratório, verificaram que os ácidos graxos saturados estavam em maior concentração que os insaturados, na maioria dos ensaios realizados. Os ácidos graxos saturados possuem número de cetano elevado e são menos propensos à oxidação que os compostos insaturados (MORAIS e COSTA, 2008).

## II. 5. EXTRAÇÃO DE ÓLEO

A extração de óleo com solvente é um processo de transferência de constituintes solúveis (o óleo) de um material inerte (a matriz graxa) para um solvente com o qual a matriz se acha em contato. Os processos que ocorrem são meramente físicos, pois o óleo transferido para o solvente é recuperado sem nenhuma reação química (BRUM *et al.*, 2009).

Os lipídios e os ácidos graxos são constituintes de todas as células vegetais, nas quais estes funcionam como componentes da membrana, como produtos de armazenamento, como metabólitos e como fontes de energia (BECKER, 1994).

A extração direta de lipídios de microalgas parece ser a metodologia mais eficiente para obter energia destes organismos, do que a fermentação de biomassa algal para produzir metano ou etanol (OIL PRODUCTION, 2008). Na extração do óleo da biomassa é necessário romper a membrana celular das algas, que pode ser realizado utilizando-se prensas ou extração com solventes. O processo de extração com solventes permite um rendimento maior em óleo. Devido à grande variedade de polaridade dos lipídios encontrados nas microalgas diferentes tipos de solventes podem ser utilizados na extração. Os solventes mais utilizados são o hexano, o etanol, o clorofórmio e o éter dimetílico (MOLINA GRIMA *et al.*, 2003; D'OCA *et al.*, 2011). Dentre os métodos de extração de lipídios empregados por pesquisadores do mundo inteiro, os mais conhecidos e, geralmente, mais efetivos e com melhor rendimento, são os que utilizam a mistura clorofórmio e metanol (TANAMATI, 2005).

Vários processos de extração de óleo de microalga encontrados na literatura (MIAO E WU, 2006, ZHANG *et al.*, 2003, XIONG *et al.*, 2008; SPECTOR *et al.*, 2008, UMDU *et al.*, 2009) utilizam o extrator Soxhlet (Figura 8) e como solvente o hexano, em temperaturas em torno de 80 °C e tempos de até 10 horas.



**Figura 8** - Extrator Soxhlet.

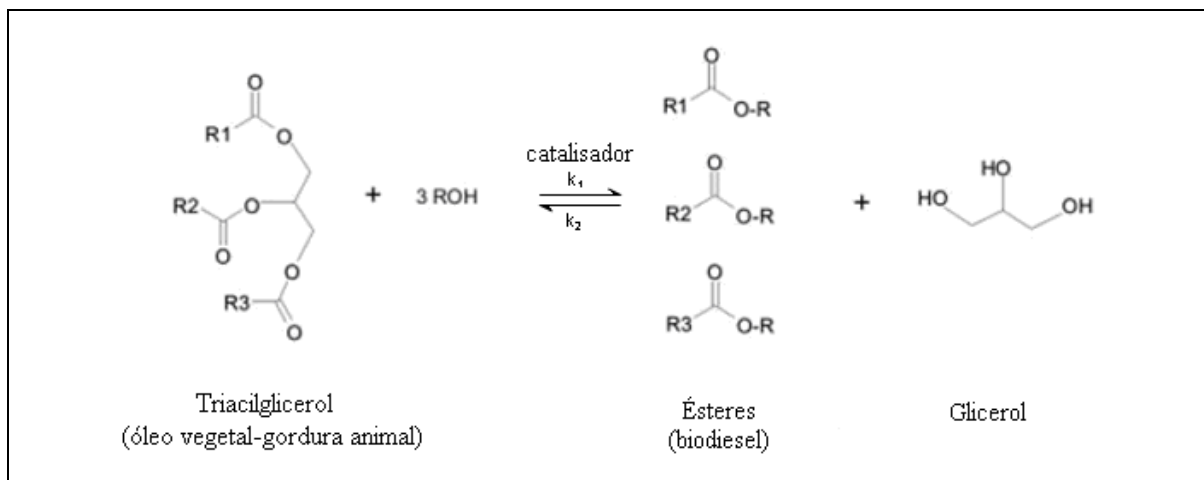
Fonte: SPECTOR *et al.* (2008).

O processo envolve lavagens sucessivas da amostra com o solvente até a retirada de todo o conteúdo lipídico das células. A partir disto, os lipídios são obtidos pela remoção do solvente em evaporadores rotativos. Porém, a natureza química dos lipídios a serem extraídos deve ser levada em consideração na escolha dos procedimentos de extração. Segundo alguns autores (TANAMATI, 2005; D'OCA *et al.*, 2008; MANDAL e MALLICK, 2009) a extração deve ser a temperatura ambiente, visto que altas temperaturas podem degradar o óleo mais rapidamente, causando a oxidação e a hidrólise dos ácidos graxos livres.

## II. 6. PRODUÇÃO DE ÉSTERES

A tecnologia para a produção de ésteres alquílicos visando à produção de biodiesel predominante é a rota tecnológica de transesterificação, que envolve a reação dos triacilgliceróis com álcoois de cadeias curtas, em presença de um catalisador, dando origem a ésteres de ácidos graxos (SUAREZ *et al.*, 2007). Cabe ressaltar que uma das características que influenciam o processo de produção de biodiesel é o conteúdo de ácidos graxos livres no óleo, sendo muitas vezes necessário um pré-tratamento, ou seja, a neutralização do óleo para a produção de biodiesel pela transesterificação.

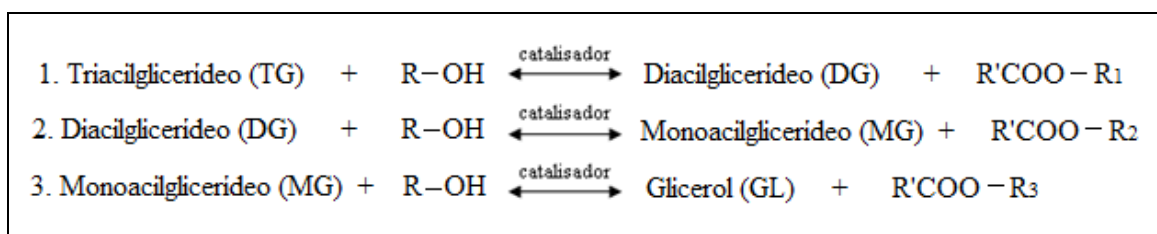
A reação global para a transesterificação de óleos e gorduras é apresentada na Figura 9, na qual são necessários três moles de álcool para cada mol de triacilglicerol utilizado.



**Figura 9** – Reação global de transesterificação de triacilglicerol.

Fonte: RIVALDI *et al.* (2009).

Esta reação global é consequência de várias reações reversíveis e consecutivas, conforme apresentado na Figura 10.



**Figura 10** – Etapas da reação de transesterificação.

Fonte: RIVALDI *et al.*, 2009.

A primeira reação consiste na conversão de triacilglicerídeos em diacilglicerídeos, seguida da conversão destes diacilglicerídeos em monoacilglicerídeos e, finalmente, de monoacilglicerídeos a glicerol, rendendo uma molécula de éster de álcool para cada glicerídeo em cada etapa da reação.

No final da etapa de transesterificação o glicerol e os ésteres formam uma massa líquida de duas fases, que são separáveis por decantação ou centrifugação, devido à baixa solubilidade do glicerol nos ésteres. A fase superior, mais leve ou menos densa, contém os ésteres constituintes do biodiesel. Na fase inferior ou pesada encontram-se o

glicerol bruto e as impurezas. O excesso de álcool tende a agir como um solubilizador e pode reduzir a velocidade de separação. Porém, o excesso de álcool não é, geralmente, removido até que o glicerol e os ésteres alquílicos estejam devidamente separados, pois há a preocupação com a reação reversa. Água pode ser acrescentada à mistura, depois que a reação de transesterificação estiver terminada, com o objetivo de melhorar a separação do glicerol (GERPEN, 2005). Como se pode notar obter ésteres puros, pelo processo de transesterificação, não é fácil, pois os produtos de reação são uma mistura de ésteres, glicerol, álcool, catalisador e tri-, di- e monoacilglicerídeos (MA e HANNA, 1999).

### II.6.1. Álcool

Dentre os álcoois que podem ser usados na reação de transesterificação estão metanol, etanol, propanol e butanol (FUKUDA *et al.*, 2009). Dentre estes, os mais utilizados são o metanol e o etanol. A reação de transesterificação é mais lenta quando se utilizam álcoois com massa molar maior (DEMIRBAS, 2008). O consumo de álcool e as condições de reação e de separação são diferentes em função das propriedades de cada álcool, o que leva a definir as rotas tecnológicas como metílica e etílica, respectivamente, para o uso de metanol e etanol.

A escolha prévia do álcool metílico (metanol) ou álcool etílico (etanol) como agente de transesterificação do óleo vegetal ou da gordura animal define fortemente alguns aspectos tecnológicos do processo de produção industrial. Em muitos países, como, por exemplo, nos Estados Unidos, o metanol é o álcool predominantemente utilizado para a produção de ésteres de ácidos graxos, por ser o álcool mais barato.

O metanol é um álcool geralmente obtido de fontes fósseis, por meio de gás de síntese (a partir do metano) e, em quantidades menores, pode ser obtido também por destilação seca da madeira (LIMA, 2005). Ressalta-se, no entanto, que o metanol tem uma toxicidade muito elevada, podendo trazer malefícios à saúde, causando, inclusive, cegueira e câncer. O metanol é isento de água e possui uma cadeia mais curta e uma maior polaridade. Esta última propriedade torna mais fácil a separação entre os ésteres e a glicerina (KNOTHE *et al.*, 2006). O Brasil não é autossuficiente na produção de metanol e o importa, mas não para uso como combustível (LIMA, 2005). Esta condição é uma desvantagem importante na utilização do metanol para produção de biodiesel no país.



Por outro lado, no Brasil, a disponibilidade de matéria-prima e tecnologia permite a produção economicamente viável do etanol, resultando um produto que é mais barato que o metanol (KNOTHE *et al.*, 2006). Além disso, a utilização do etanol pode ser atrativa do ponto de vista ambiental, pois apresenta a vantagem de não ser tóxico, ser biodegradável e ser produzido a partir de fontes renováveis (DANTAS, 2006; DEMIRBAS, 2008).

A estequiometria da reação indica a necessidade de três moles de álcool para reagir com um mol de triacilglicerol (3:1), formando 3 moles de ésteres alquílicos e 1 mol de glicerol, conforme já mostrado na Figura 6. Para favorecer a formação de ésteres, o equilíbrio da reação é deslocado para a formação dos produtos, utilizando uma quantidade de álcool superior à estequiométrica (excesso de álcool) (DEMIRBAS, 2008; MA e HANNA, 1999; FUKUDA *et al.*, 2001). A relação molar álcool:óleo também está associada ao tipo de catalisador utilizado. De fato, os estudos de Freedman *et al.* (1986) mostraram que na catálise ácida para a síntese de biodiesel, a partir de óleo de soja, foi necessária uma razão molar metanol:óleo de 30:1, enquanto na catálise básica foi preciso uma razão molar de 6:1 para alcançar o mesmo rendimento em ésteres, para um tempo de reação fixo. A razão molar álcool:óleo é um dos fatores principais que influenciam a reação. Assim, o excesso do álcool favorece a formação de ésteres alquílicos. Entretanto, uma quantidade excessiva de álcool dificulta a recuperação do glicerol (GERPEN, 2005).

Atualmente, o uso de etanol nos processos de produção de ésteres etílicos, visando à produção de biodiesel, tem sido bastante estudado (PISARELLO *et al.*, 2010). O Brasil, na qualidade de grande produtor de álcool combustível, deve ampliar seu uso e, ainda, tem incentivado as pesquisas com o objetivo de melhorar as rotas de utilização de etanol para a produção de biodiesel de modo economicamente viável.

## II.6.2. Catalisadores

A transesterificação de óleos vegetais ou gordura animal pode ser conduzida por uma variedade de rotas tecnológicas, em que diferentes tipos de catalisadores podem ser empregados. Os catalisadores são conceitualmente classificados como substâncias de elevada atividade e promotoras da reação química específica. Os catalisadores podem ser bases orgânicas, ácidos, resinas de troca iônica (resinas catiônicas fortemente

ácidas), argilominerais ativados e enzimas lipolíticas (Lípases), dentre outros (RAMOS *et al.*, 2003).

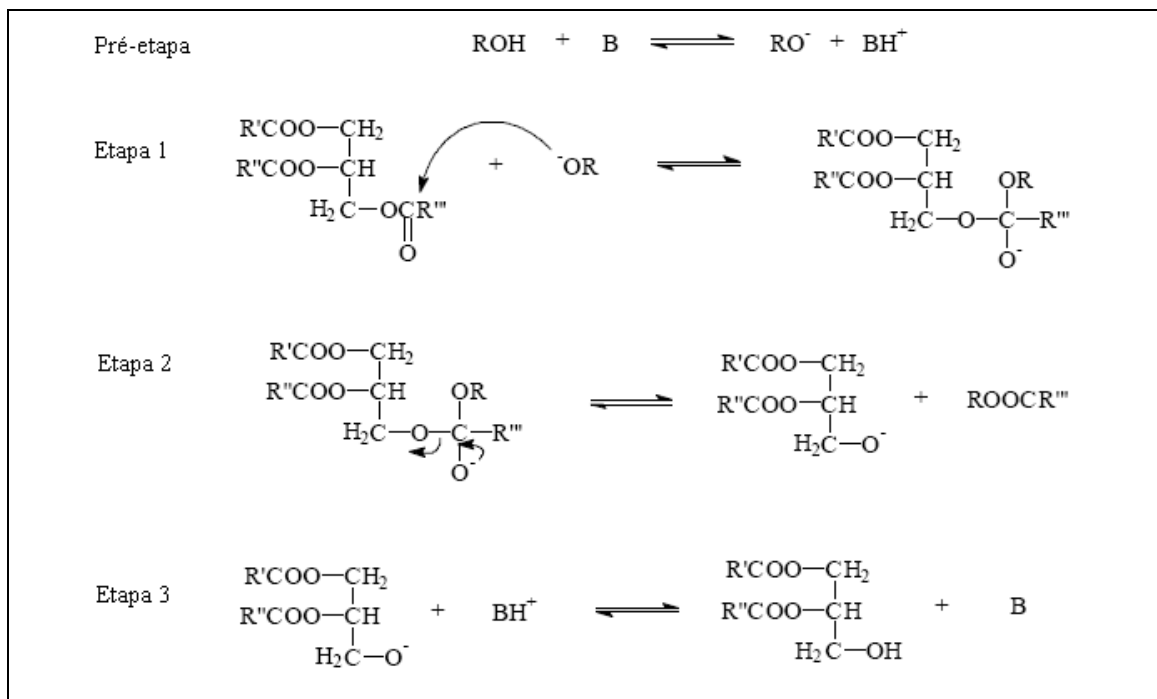
Os catalisadores mais empregados nos processos de produção de biodiesel por transesterificação são os compostos de caráter alcalino. Na transesterificação básica os catalisadores hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de potássio (KOH) e metóxido de sódio (NaOCH<sub>3</sub>) são os mais comuns. No entanto, os métodos que empregam hidróxido de sódio ou potássio são mais utilizados devido à facilidade no preparo e ao custo relativamente menor, quando comparado com metóxido de sódio (MILINSK, 2007). As concentrações usuais destes compostos (NaOH e KOH), previamente diluídos no álcool, variam entre 0,5 e 1,0% em relação ao teor de óleo. A acidez livre do óleo determina a eventual elevação da concentração do catalisador ou a opção pela esterificação do óleo em meio ácido (MILINSK, 2007).

No processo de transesterificação básica o catalisador (KOH ou NaOH) é dissolvido no álcool, por agitação lenta e constante, formando um alcóxido (SCHUCHARDT *et al.*, 1998; MILINSK, 2007). Esta se constitui numa pré-etaapa da reação de transesterificação, como pode ser visto na Figura 7, sendo a solução resultante transferida para o reator contendo o óleo. A reação produz duas fases líquidas: os ésteres e o glicerol. A transesterificação básica de óleos vegetais prossegue mais rapidamente que a reação catalisada por ácido e proporciona alta conversão, em menos tempo, a temperaturas mais baixas, sendo utilizada quando o óleo apresenta umidade e índice de acidez baixos (DEMIRBAS, 2008). Para a utilização de catalisadores básicos, geralmente, a acidez do óleo deve estar abaixo de 3% (m/m) (MA e HANNA, 1999).

Os triacilglicerídeos e o álcool utilizados na reação de transesterificação básica devem ser anidros, porque a água promove a reação de saponificação, que leva à produção de sabão (FREEDMAN *et al.*, 1984, ZHANG *et al.*, 2003, DEMIRBAS, 2008).

As etapas envolvidas na reação de transesterificação de triacilglicerol catalisada por hidróxido de sódio são apresentadas na Figura 11 (MA e HANNA, 1999; MEHER *et al.*, 2006; MILINSK, 2007). Primeiramente, na pré-etaapa, a base e o álcool reagem produzindo um alcóxido. Assim, na etapa 1, o ânion do álcool (alcóxido) ataca o carbono da carbonila na molécula de triacilglicerídeo para formar um intermediário tetraédrico. O rompimento da ligação entre o carbono e o oxigênio deste intermediário leva à formação de um éster alquílico e um ânion de diacilglicerol (etapa 2). Na etapa seguinte, diacilglicerol é formado após a remoção do átomo de hidrogênio da molécula

desprotonada na pré- etapa ( $\text{BH}^+$ ). Diacilglicerídeos e monoacilglicerídeos são convertidos pelo mesmo mecanismo para uma mistura de ésteres alquílicos e glicerol (SCHUCHARDT *et al.*, 1998; SUAREZ *et al.*, 2007).



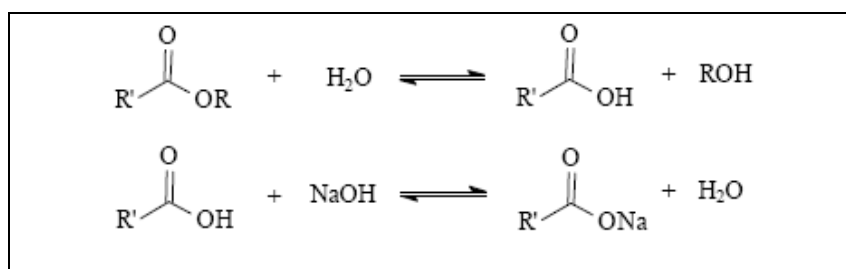
**Figura 11** – Etapas do mecanismo da reação de transesterificação com álcool.

Fonte: SCHUCHARDT *et al.* (1998).

Quando NaOH, KOH ou outros catalisadores similares são misturados com álcool, o catalisador real, grupo alcóxido é formado, mas uma pequena quantidade de água também é gerada. A presença de água origina a hidrólise de alguns ésteres obtidos, com a consequente formação de sabão durante a reação de transesterificação, como mostrado na Figura 12.

Os principais catalisadores utilizados na esterificação ácida são os ácidos clorídrico, sulfúrico e sulfônico. O catalisador é, primeiramente, dissolvido no álcool e depois transferido para o reator com o óleo. Estes catalisadores proporcionam rendimentos altos em ésteres alquílicos, mas as reações são mais lentas (GERPEN, 2005, DEMIRBAS, 2008). Quando são utilizados catalisadores ácidos a reação é feita em temperaturas elevadas, geralmente 100 °C, por um tempo maior (3 horas), para se atingir um bom nível de conversão (MA e HANNA, 1999, FUKUDA *et al.*, 2001; KUCEK, 2004). Outra desvantagem é a contaminação com catalisadores ácidos residuais, que podem atacar as partes metálicas do motor, causando a corrosão e, por

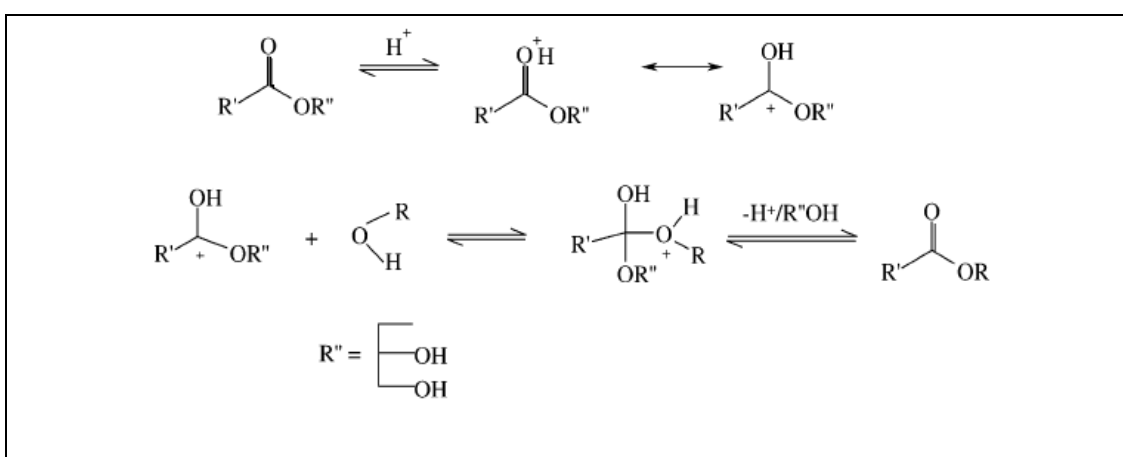
isso, devem ser eliminados completamente do produto final, implicando muitas etapas de purificação (KUCEK, 2004).



**Figura 12** – Reação de saponificação, em que R' é cadeia carbônica do ácido graxo e R representa o grupo alquila do álcool.

Fonte: SCHUCHARDT *et al.* (1998).

As etapas envolvidas na reação de transesterificação ácida para um monoacilglicerídeo são mostradas na Figura. 13. Este mecanismo pode ser estendido para di- e triacilglicerídeos. Neste mecanismo, primeiramente, ocorre a protonação do grupo carbonílico do éster, formando um carbocátion, que, após um ataque nucleofílico do álcool, produz um intermediário tetraédrico. A partir disso, ocorre a eliminação de um diacilglicerídeo e um éster graxo do mono-álcool, juntamente com a regeneração da espécie H<sup>+</sup> (SCHUCHARDT *et al.*,1998; SUAREZ *et al.*, 2007).



**Figura 13** – Etapas do mecanismo da reação de transesterificação ácida com álcool, em que R' é a cadeia carbônica do ácido graxo e R o grupo alquila do álcool.

Fonte: Adaptado de SCHUCHARDT *et al.* (1998), MEHER *et al.* (2006).

Numerosos sistemas com catalisadores heterogêneos tem sido reportado na literatura, para a produção de ésteres alquílicos, incluindo enzimas, zeólitas, argilas,

polímeros orgânicos, resinas de troca-iônica e óxidos (MOREIRA *et al.*, 2007; PINTO *et al.*, 2005).

O desenvolvimento de catalisadores heterogêneos para a produção de ésteres alquílicos tem sido estudado, pois a utilização destes na reação de transesterificação simplifica o processo de pós-tratamento dos produtos (separação e purificação). Desta forma, não se produz sabões, por neutralização dos ácidos graxos livres, e tampouco por saponificação dos triacilglicerídeos. Entretanto, este sistema requer condições mais drásticas de reação e o rendimento em biodiesel e o tempo de reação são ainda desfavoráveis quando comparados aos catalisadores básicos homogêneos (VICENTE *et al.*, 2004). Além disso, quando comparados com os catalisadores tradicionais, estes sistemas heterogêneos trifásicos (óleo/álcool/catalisador) apresentam atividades baixas, principalmente, devido aos problemas de difusão (SUAREZ *et al.*, 2007).

De uma forma geral, a transesterificação e a esterificação não alteram a composição dos ácidos graxos das matérias-primas. Desta forma, a composição do óleo e o tipo de álcool utilizado determinam a composição e a estrutura dos ésteres produzidos (RAMOS *et al.*, 2009; TORRENS *et al.*, 2009). Portanto, a composição dos ácidos graxos no óleo desempenha um papel importante em alguns parâmetros críticos do biodiesel, tais como:

- número de cetano (NC): relacionado à qualidade de ignição do combustível;
- viscosidade, que impacta a pulverização do combustível e consequentemente as emissões;
- propriedades de fluxo a frio, ligadas à viscosidade e à temperatura de ebulição do combustível;
- estabilidade oxidativa, determinada pela quantidade de insaturações dos componentes do biodiesel, que determina se o combustível se degrada com o armazenamento, devido à oxidação.

Segundo Ramos *et al.* (2009), que estudaram a influência da composição dos ácidos graxos de óleos vegetais sobre a qualidade de biodiesel, um número de cetano baixo está associado a uma quantidade alta de componentes insaturados no óleo (C18:2 e C18:3). Além disso, a estabilidade à oxidação diminui com o aumento do teor de ésteres poli-insaturados. Verificaram-se, também, que as propriedades de fluxo a frio são degradadas pela presença de ésteres de cadeia saturada e longa, enquanto a

estabilidade oxidativa é aumentada pela presença destes ésteres (RAMOS *et al.*, 2009; KNOTHE, 2008). A contraposição entre estas tendências leva à necessidade de obter composições que apresentem bom desempenho em ambas as condições (KNOTHE, 2005). Portanto, o biodiesel sintetizado a partir de óleos com alto teor de ésteres monoinsaturados apresenta propriedades globais melhores.

# **CAPÍTULO III**

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

O processo de produção de biodiesel a partir de óleo de microalgas consiste em várias etapas: produção de biomassa pelo cultivo das microalgas, recuperação e secagem da biomassa, extração do óleo, análise do óleo obtido, reação de transesterificação (para acidez <1 %), qualificação e quantificação do biodiesel. A rentabilidade deste processo se baseia tanto na produtividade do óleo da microalga, discutido anteriormente, quanto em determinar as condições ótimas de operação em cada etapa. Além disso, deve-se considerar como a composição dos nutrientes do meio de cultivo pode influenciar no metabolismo das algas e favorecer o rendimento em lipídios.

### **III.1. VARIAÇÃO NA COMPOSIÇÃO DOS NUTRIENTES**

As microalgas sofrem variações no crescimento, de acordo com o meio de cultivo utilizado e as condições do meio externo. De acordo com Becker (1994), quando se tem um sistema típico de cultivo homogêneo, em que a oferta de nutrientes é limitada e nada é adicionado ou removido do sistema, o crescimento das algas passa por várias fases diferentes, sendo estas fases definidas como:

- fase 1: adaptação (lag);
- fase 2: aceleração do crescimento;
- fase 3: crescimento exponencial (log);
- fase 4: diminuição do crescimento (crescimento linear);

- fase 5: fase estacionária;
- fase 6: fase de morte das algas;
- fase 7: fase log de morte.

No entanto, nem sempre é possível acompanhar claramente cada fase do crescimento, pois algumas partes da curva de crescimento podem ser alteradas de acordo com cada cultura. Nas fases de crescimento (fase 2 e 3) as algas já se adaptaram às condições de cultivo e, durante este período, a intensidade da luz não é limitante (BECKER, 1994). Deste modo, a manipulação das condições de cultivo pode estimular a biossíntese de compostos. O estudo de nutrientes para o cultivo das microalgas justifica-se pelo fato de que os meios utilizados para este cultivo em grande escala ainda são muito onerosos. Assim, a utilização de nutrientes de baixo custo é um fator importante na produção, pois possibilita a redução de custos de processo (MULITERNO *et al.*, 2005).

Becker (1994) estudou os efeitos dos diferentes regimes de nitrogênio nos parâmetros de crescimento e componentes nas algas, para duas clorofíceas (*Scenedesmus obliquus* e *Chorella vulgaris*) e para quatro cianobactérias (*Spirulina platensis*, *Anacystis nidulans*, *Microcystis aeruginosa* e *Oscillatoria rubescens*). Em todas as algas estudadas o aumento dos níveis de nitrogênio conduziu a um aumento da biomassa, do conteúdo de proteínas e de clorofila. Em baixos níveis de nitrogênio, as clorofíceas apresentaram níveis de lipídios totais em torno de 45%. Por outro lado, as cianobactérias não apresentaram mudanças significativas na composição de lipídios. Desta maneira, a cultura de cianofíceas pode ser manipulada, em cultivo com baixos níveis de nitrogênio, para se obter uma biomassa com a concentração de lipídios desejada.

Com o objetivo de estimular a produção de lipídios, Spector *et al.* (2008) realizaram diferentes formas de estresse de nitrogênio no cultivo da microalga marinha *Isochrysis galbana*, em escala de laboratório. O estresse programado de nitrogênio (alterações do nutriente disponível no meio de cultivo) revelou ser um caminho eficiente para o estímulo da produção lipídica, proporcionando um aumento de 40% na quantidade de lipídios.

O estresse devido à falta de nitrogênio biodisponível faz a microalga alterar o seu mecanismo natural de produção de lipídios, embora o efeito da escassez pareça inibir o ciclo celular e a produção dos componentes celulares. Nestas condições, a taxa



de síntese lipídica permanece alta, levando a um acúmulo de óleo nas células enfraquecidas. No entanto, as alterações nos fluxos específicos de vias metabólicas causadas pelo crescimento heterotrófico e pela escassez de nitrogênio devem ainda ser mais estudadas, pois estas duas condições são importantes para compreender os mecanismos da regulação dos ácidos graxos na biossíntese das algas verdes (ROSENBERG *et al.*, 2008).

Andrade e Costa (2008) avaliaram o crescimento de *Spirulina platensis* em meio de cultivo Zarrouk, diluído com água destilada estéril a 20% v/v e complementado com melação de cana líquido (MEL) e melação em pó (MEP), nas concentrações de 0,00, 0,25, 0,50, 0,75 e 1,00 g/L. Os autores constataram que a concentração máxima de biomassa e a produtividade nos cultivos diminuíram com o aumento da concentração de MEP. Também, houve fase de adaptação de 5 a 17 dias da biomassa nos meios e após as células iniciaram crescimento exponencial. A maior concentração de biomassa obtida foi no ensaio com 0,50 g/L MEL, alcançando 2,83 g/L.

Miao e Wu (2006) cultivaram *Chlorella protothecoides* para a produção de biodiesel. Os autores analisaram o crescimento da microalga utilizando um meio contendo glicose (10 g/L), para crescimento heterotrófico e cultivo autotrófico, sem a adição de nutrientes. O crescimento heterotrófico não só causou o desaparecimento da clorofila nas células, mas levou a um alto acúmulo de lipídios, chegando este a 55,2 %, o que é cerca de quatro vezes maior que no cultivo autotrófico (Tabela 4).

**Tabela 4** – Componentes principais do óleo da microalga *C. protothecoides*.

Componente (%)	Meio Autotrófico	Meio Heterotrófico
Proteína	52,64 ± 0,26	10,28 ± 0,10
Lipídio	14,57 ± 0,16	55,20 ± 0,28
Carboidrato	10,62 ± 0,14	15,43 ± 0,17
Cinza (resíduo)	6,36 ± 0,05	5,93 ± 0,04
Umidade	5,39 ± 0,04	1,96 ± 0,02
Outro	10,42 ± 0,65	11,20 ± 0,61

Fonte: MIAO e WU (2006).

A produção de óleo a partir da microalga *Chlorella protothecoides* também foi estudada por Xu *et al.* (2006). Para aumentar a biomassa e reduzir o custo de cultivo,

amido de milho hidrolisado em pó, em vez de glicose, foi utilizado como fonte de carbono orgânico no meio de cultura heterotrófica. Os resultados mostraram que a densidade celular aumentou significativamente nestas condições e o conteúdo lipídico nas células foi cerca de quatro vezes maior que nas células autotróficas (sem amido de milho hidrolisado).

Mandal e Mallick (2009) examinaram a biomassa da microalga *Scenedesmus obliquus*, avaliando as interações entre os parâmetros críticos que influenciam o rendimento de lipídios, por meio de análises estatísticas. Os parâmetros analisados foram a concentração de nitrato (A), a concentração de fosfato (B), a concentração tiosulfato (C) e o tempo de cultivo (D). Neste estudo os autores mostraram que o rendimento em lipídios é influenciado pelos parâmetros separadamente e, também, pela interação entre eles. Foi possível alcançar um teor de lipídios de 58,3% da massa seca, manipulando-se os nutrientes. Porém, a produtividade em biomassa foi afetada quando ocorreu complemento do tiosulfato e limitação de nitrato e fosfato.

Outro fator que influencia o crescimento das microalgas é a intensidade de luz no cultivo (iluminância). Zhang *et al.* (1999) estudaram a influência da variável intensidade luminosa no cultivo da *Spirulina platensis*. Como fonte de carbono orgânico empregaram a glicose (2 g/L). Observaram que, para as intensidades luminosas variando entre 500 e 2000 lux, a velocidade máxima de crescimento aumentou com a luminosidade, enquanto entre 2000 e 4000 lux, a velocidade máxima de crescimento manteve-se constante com o aumento da luminosidade.

Muliterno *et al.* (2005) estudaram o cultivo da microalga *Spirulina platensis*. Foram avaliadas as concentrações máximas de biomassa em função da iluminância. Os experimentos foram realizados em meio Zarrouk, com adição de glicose em modo batelada, mantendo-se a concentração desta em 0,5 g/L, com variação na iluminância entre 1800 e 3000 lux. Os resultados mostraram que as maiores concentrações de biomassa foram obtidas para os experimentos com intensidade luminosa de 3000 lux. Neste mesmo estudo observaram que, nos experimentos em que a concentração de glicose foi mantida em 1,0 g/L, os resultados não apresentaram uma tendência quanto à influência da iluminância nas concentrações máximas de biomassa. Segundo os autores as menores produtividades de biomassa, com iluminância de 3000 lux e concentração de glicose de 1,0 g/L, podem ter sido causadas pelo fato de que estas duas condições juntas constituem uma condição de estresse.

Morais e Costa (2008) avaliaram a produção de lipídios nas microalgas *Spirulina* sp e *Scenedesmus obliquus*. O cultivo foi realizado em fotobiorreatores, tipo erlenmeyer de 2 L, com uma aeração de 0,3 vol/vol.min (vvm) de mistura ar comprimido e CO<sub>2</sub>, sendo que as concentrações de CO<sub>2</sub> foram de 0,038, 6, 12 e 18% (v/v). A *Spirulina* sp. foi cultivada em meio Zarrouk modificado e a *Scenedesmus obliquus* com meio para *Chlorella ellipsoidea* (meio MC). Os cultivos tiveram a duração de 20 dias, com concentração inicial de biomassa de 0,15 g/L, a temperatura de 30 °C. O fotoperíodo foi de 12 h claro/escuro em uma iluminância de 3200 lux, fornecida por lâmpadas fluorescentes. O maior conteúdo lipídico de cada microalga foi de 6,1% para *Spirulina* sp. e de 5,3% para *Scenedesmus obliquus*. Os resultados mostraram que, dependendo do gênero e da espécie de microalga cultivada, a concentração de CO<sub>2</sub> e a adição de bicarbonato de sódio, no meio, podem ser variadas de modo a incrementar a biossíntese de ácidos graxos saturados ou insaturados, de acordo com a utilização que se pretende dar à biomassa formada.

Andrade *et al.* (2008) avaliaram o crescimento da biomassa e a perda de carbono em cultivos da microalga *Spirulina* sp. LEB-18, em diferentes concentrações de carbono inorgânico dissolvido. Notaram que a menor perda química de CO<sub>2</sub> para a atmosfera (13,61%) e os maiores parâmetros de crescimento da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 ocorreram no ensaio com a menor concentração de carbono testada (NaHCO<sub>3</sub> de 2,8 g/L). Empregando 50 g/L de NaHCO<sub>3</sub> observaram que 38,73% do carbono do meio foi perdido para a atmosfera, além de ocorrer inibição do crescimento celular. A manutenção dos cultivos em baixas concentrações de carbono inorgânico dissolvido pode resultar maior eficiência no consumo do nutriente pela microalga *Spirulina* sp. LEB-18, contribuindo para a redução de custos em plantas de produção da biomassa microalgal.

O aumento na concentração de carbono inorgânico dissolvido, utilizado no preparo do meio Zarrouk, provocou maiores perdas de carbono para a atmosfera. Além das perdas de carbono dos cultivos para a atmosfera representarem um custo adicional na produção de biomassa, o aumento de pH associado pode conduzir a valores de pH inibitórios ao crescimento celular. Segundo Andrade *et al.* (2008), poucos autores consideram as perdas químicas de carbono nos cultivos. Deste modo, nos estudos sobre o pH e o consumo de carbono em cultivos de microalgas, estas perdas podem ser confundidas com o consumo biológico de carbono pelas células, levando a resultados equivocados.

### III.2. RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA E SECAGEM

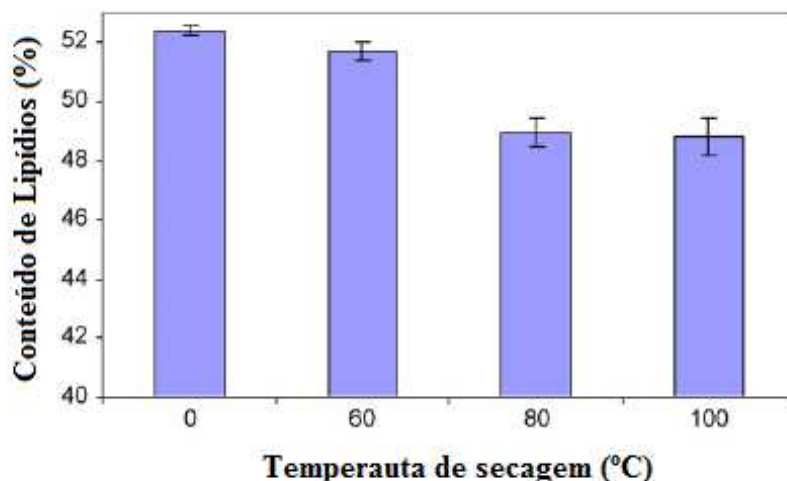
A recuperação da biomassa do meio de cultivo é muito importante devido ao pequeno tamanho das células de algas (3-30  $\mu\text{m}$  de diâmetro), sendo que esta pode necessitar de uma ou mais etapas de separação. Neste sentido, a biomassa pode ser colhida por centrifugação, filtração ou, em alguns casos, por sedimentação. Estes processos podem ser precedidos por uma etapa de floculação (MOLINA GRIMA *et al.*, 2003).

O crescimento da biomassa pode ser monitorado pela concentração celular, por meio de uma correlação pré-determinada (curva-padrão) entre a massa seca da biomassa e a absorbância a 670 nm, em espectrofotômetro UV-vis, ou pela turbidez da amostra (ANDRADE e COSTA, 2008; MULITERNO *et al.*, 2005).

Depois da recuperação da biomassa da solução a próxima etapa do processo é a secagem. A seleção de um determinado método de secagem depende da escala de operação e do destino final do produto seco. Em vários trabalhos (BECKER, 1994; SPECTOR *et al.*, 2008; D'OCA *et al.*, 2008; MIAO e WU, 2006; XU *et al.*, 2006) a secagem foi realizada em estufas a 60 ou 70  $^{\circ}\text{C}$ , até massa constante, ou por liofilizadores. No entanto, os altos custos do processo de secagem utilizando liofilizadores podem limitar seu uso.

Segundo Tiburcio *et al.* (2007), uma secagem rápida minimizando o tempo de exposição ao calor e ao oxigênio é desejada, o que pode evitar o processo de peroxidação lipídica. Assim, a otimização do processo de secagem por luz solar pode fornecer produtos com alta qualidade.

Widjaja *et al.* (2009) realizaram um estudo avaliando o efeito da temperatura de secagem no conteúdo e na composição de lipídios para a microalga *Chlorella vulgaris*. A recuperação da biomassa foi feita por centrifugação e após serem lavadas com água destilada foram submetidas à secagem, que foi realizada nas temperaturas de 0  $^{\circ}\text{C}$ , em liofilizador, e a 60, 80 e 100  $^{\circ}\text{C}$ , em estufa. A secagem na temperatura de 60  $^{\circ}\text{C}$  resultou uma ligeira redução no conteúdo de lipídios, quando comparado com a secagem a 0  $^{\circ}\text{C}$ . Quando a secagem foi realizada a 80  $^{\circ}\text{C}$  ou a temperatura superior, o teor lipídico diminuiu significativamente, como pode ser visto na Figura 14.



**Figura 14** – Efeito da temperatura de secagem da biomassa da microalga *Chlorella vulgaris* no conteúdo de lipídios.

Fonte: WIDJAJA *et al.* (2009).

### III.3. EXTRAÇÃO DO ÓLEO EM MICROALGAS

D’oca *et al.* (2008) realizaram testes de extração de lipídios da microalga *Chlorella* obtida comercialmente. Os testes de extração foram realizados com solventes clorofórmio:metanol (2:1), etanol, metanol e hexano, com e sem ultrassom. O melhor rendimento médio em óleo foi de 20,83%, obtido utilizando o ultrassom e mistura de clorofórmio:metanol, seguido de 5,79% com metanol, 4,64% com etanol, e 1,002% com hexano. Por outro lado, sem o uso de ultrassom, utilizando agitação magnética, durante 24h, o maior rendimento médio de óleo foi de 11,33%, obtido com metanol, seguido de 10,66% com etanol e de 3,55% com hexano. A mistura clorofórmio:metanol não foi testada sem o ultrassom.

Soares *et al.* (2009) determinaram o teor de lipídios de microalgas marinhas, avaliando adaptações de diferentes metodologias de extração de lipídios. Assim, os autores analisaram três metodologias diferentes com amostras de biomassa liofilizadas:

- Adaptação do método de Bligh e Dyer (1959), na proporção de clorofórmio/metanol (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH; 1/2, v/v);
- Adaptação do método de Bligh e Dyer (1959), na proporção de clorofórmio/metanol (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH; 2/1, v/v);
- Adaptação do método de Folch *et al.* (1957).

Segundo os autores, o teor de lipídios extraído pelo método de Bligh e Dyer adaptado foi, no mínimo, 56% maior para a microalga *Nannochloropsis oculata* e 90% maior para a microalga *Phaeodactylum tricornutum*, em relação ao método de Folch *et al.* Mudando-se apenas a proporção de solvente no método adaptado de Bligh e Dyer não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os resultados. Neste caso, a proporção do solvente não influenciou tanto quanto a metodologia, pois apesar de a metodologia adaptada de Folch *et al.* utilizar as mesmas proporções de solvente da metodologia adaptada de Bligh e Dyer, na proporção de clorofórmio/metanol de 2/1 (v/v), os resultados foram significativamente menores, como visto na Tabela 5.

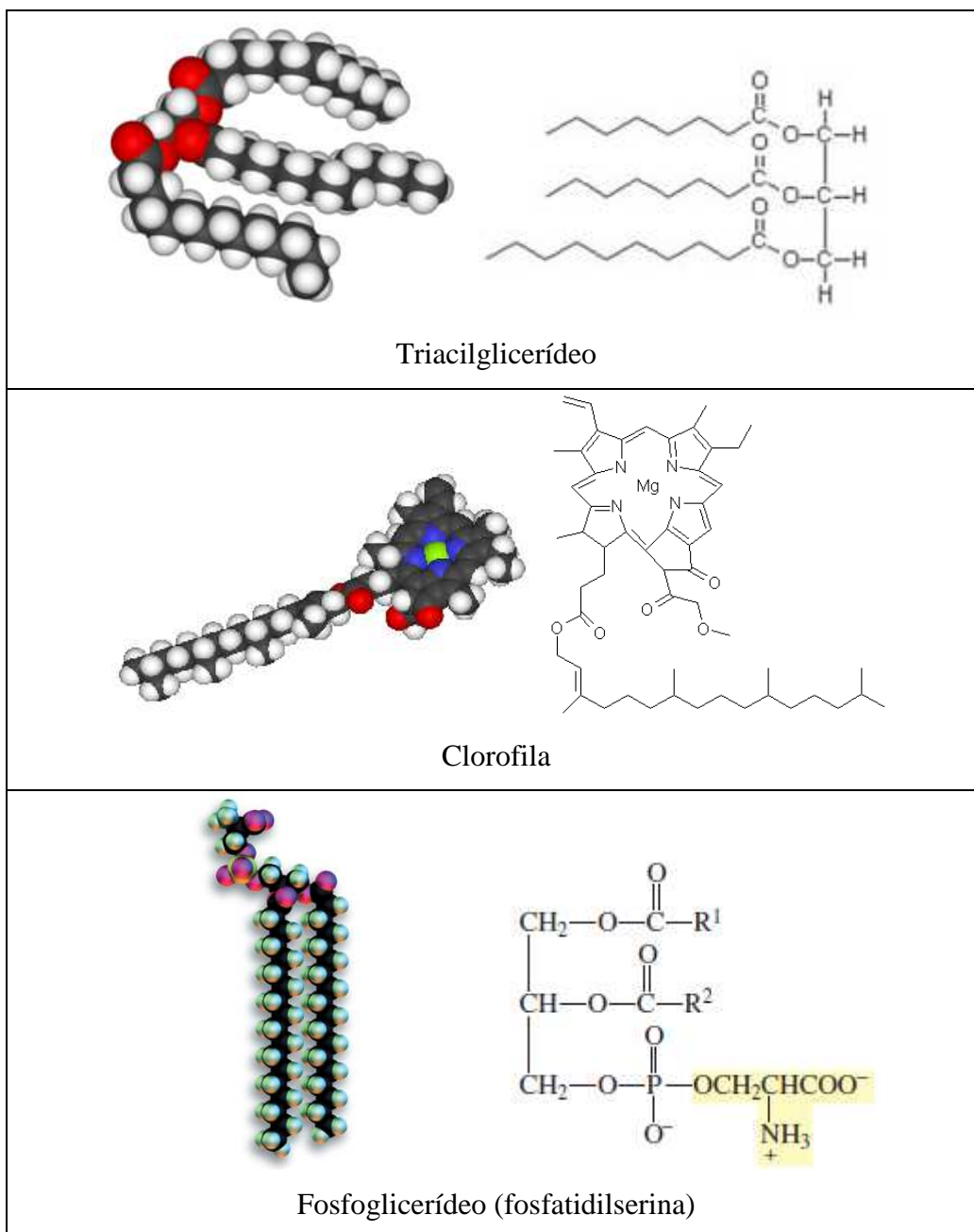
**Tabela 5** - Teor total de lipídios, em % de biomassa seca, extraídos por diferentes metodologias.

Espécie	Adaptação do método de Bligh e Dyer CHCl <sub>3</sub> /CH <sub>3</sub> OH (1/2, v/v)	Adaptação do método de Bligh e Dyer CHCl <sub>3</sub> /CH <sub>3</sub> OH (2/1, v/v)	Adaptação do método de Folch <i>et al.</i> CHCl <sub>3</sub> /CH <sub>3</sub> OH (2/1, v/v)
<i>Nannochloropsis Oculata</i>	8,13 ± 0,07	8,87 ± 0,07	5,20 ± 0,11
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	14,85 ± 0,53	16,97 ± 0,63	7,82 ± 0,44

Fonte: SOARES *et al.*, 2009.

A extração da fração lipídica é uma determinação importante nos mais diversos tipos de matérias-primas, portanto, deve ser realizada com extrema exatidão. Algumas amostras requerem cuidados especiais para a obtenção da fração lipídica, pois fatores como coextração dos componentes não-lipídicos e a oxidação indesejada podem influenciar a qualidade final da fração lipídica (BRUM *et al.*, 2009).

No extrato obtido é preciso analisar as três classes de lipídios produzidos: lipídio total, lipídio bruto e lipídio neutro. A fração lipídica total inclui pigmentos, fosfolipídios, glicolipídios, além dos lipídios neutros (Figura 15), a fração lipídica bruta contém todos os lipídios neutros e pigmentos e a fração lipídica neutra inclui os triacilglicerídeos, os ácidos graxos livres, os hidrocarbonetos, os esteróis, os ésteres de esteróis e os álcoois livres (BRIAN *et al.*, 2011).



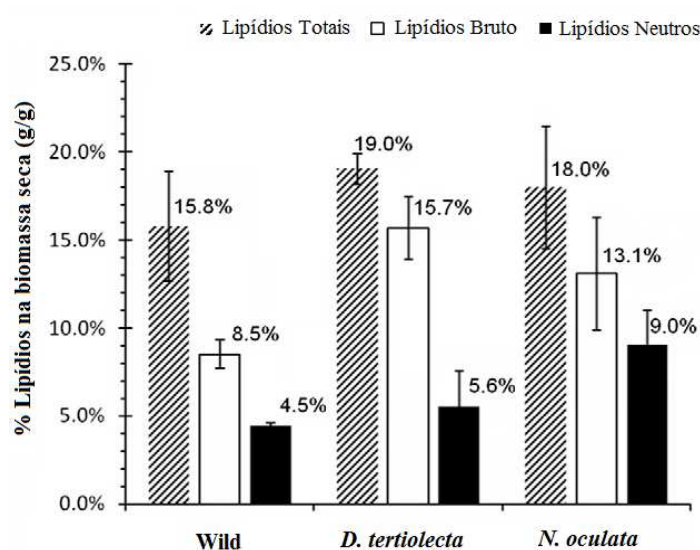
**Figura 15** – Exemplo de moléculas presentes nos lipídios totais.

Fonte: BRUICE, 2006.

O extrato de lipídios totais é constituído de pigmentos, fosfolipídios, glicolipídios e lipídios neutros, sendo os últimos ligados covalentemente, podem ser extraídos dos tecidos por solventes apolares. Enquanto lipídios polares, os quais estão ligados por forças eletrostáticas e pontes de hidrogênio, requerem solventes polares capazes de quebrar tais ligações e liberá-los (BRUM, 2009).

Utilizando um sistema Soxhlet e hexano como solvente, Brian *et al.* (2011) realizaram a extração dos lipídios das microalgas *Dunaliella tertiolecta* e

*Nannochloropsis oculata*. Após a extração a solução de hexano contendo os lipídios foi filtrada em papel filtro de 1,2  $\mu\text{m}$  e, em seguida, o hexano foi removido no rotaevaporador. O óleo bruto obtido foi redissolvido em hexano e filtrado com carvão ativado, para a remoção dos pigmentos, sendo, então, obtidos os lipídios neutros. Estes eram transparentes, variando da cor amarelo claro a âmbar. A porcentagem de lipídios na biomassa seca foi determinada por análise gravimétrica, utilizando clorofórmio/metanol. A análise gravimétrica dos lipídios obtidos, solúveis em hexano, é mostrada na Figura 16. Segundo os autores, apenas 30% dos lipídios totais para Wild e *D. tertiolecta* e 50% para *N. oculata* eram de lipídios neutros.



**Figura 16** – Análise da composição lipídica das microalgas Wild, *D. tertiolecta* e *N. Oculata*.

Fonte: BRIAN *et al.* (2011).

O intenso interesse em microalgas para a produção de biodiesel decorre, principalmente, do alto teor de lipídios e da alta produtividade de biomassa por unidade de superfície em comparação com cultivos tradicionais, conforme discutido anteriormente. No entanto, a produtividade e o rendimento em biodiesel a partir das algas muitas vezes é confundido com a produtividade em lipídios totais, porém, apenas os triacilgliceróis e os ácidos graxos livres, que fazem parte dos lipídios neutros, devem ser considerados para a produção de biodiesel puro (HU *et al.*, 2008; BRIAN *et al.*, 2011; WAHLEN *et al.*, 2011).



### III.4. ÁCIDOS GRAXOS NO ÓLEO DE MICROALGAS

Radmann e Costa (2008) determinaram o conteúdo lipídico e o perfil dos ácidos graxos do óleo de microalgas *Spirulina sp.* LEB-18, *Scenedesmus obliquus* LEB-22, *Synechococcus nidulans* LEB-25 e *Chlorella vulgaris* LEB-106 cultivadas na presença de 12% de CO<sub>2</sub>, 60 µL L<sup>-1</sup> de SO<sub>2</sub> e 100 µL L<sup>-1</sup> NO, na temperatura de 30 °C, em um sistema de fotobiorreatores fechados em série, do tipo tubulares (FBRT), de 2 L (volume útil de 1,8 L). Na quantificação de lipídios totais a fração lipídica foi esterificada para a obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos. A determinação de ácidos graxos foi realizada em cromatógrafo a gás, identificados pela comparação dos tempos de retenção com padrões e quantificados por normalização de áreas.

A Tabela 6 apresenta o perfil dos ácidos graxos obtidos.

**Tabela 6** - Perfil de ácidos graxos (%) das microalgas *Spirulina sp.*, *Scenedesmus obliquus*, *Synechococcus nidulans* e *Chlorella vulgaris*.

Composição	<i>Spirulina sp.</i>	<i>S. obliquus</i>	<i>S. nidulans</i>	<i>C. vulgaris</i>
Ácidos graxos saturados				
C 15:0	0,08	2,14	0,08	0,14
C 16:0	2,54	3,22	0,73	4,36
C 17:0	1,92	1,02	8,18	1,26
C 18:0	0,33	0,91	0,78	1,20
C 20:0	12,60	0,70	0,13	29,10
C 22:0	nd	nd	nd	0,15
C 23:0	nd	2,06	1,15	0,97
Ácidos graxos monoinsaturados				
C 14:1	0,26	0,57	0,36	0,21
C 15:1	1,26	1,57	0,09	2,30
C 16:1	41,02	37,01	36,04	23,47
C 17:1	2,45	6,28	2,73	1,80
C 18:1	8,04	18,27	16,9	21,81
C 20:1	0,14	0,67	nd	0,37
C 24:1	nd	1,64	2,85	1,00

**Tabela 6** – continuação.

Ácidos graxos poli-insaturados				
C 18:2	2,71	3,98	3,53	6,26
$\alpha$ - C 18:3	7,61	3,52	0,10	nd
$\gamma$ - C 18:3	18,12	5,42	17,72	3,12
C 20:2	0,08	4,99	7,64	0,31
C 20:3	0,36	0,69	0,19	0,57
C 20:4	0,49	nd	0,12	0,49
C 20:5	nd	nd	0,10	0,13
C 22:2	nd	1,16	0,11	0,89
C 22:6	nd	3,60	0,13	0,10

nd: não detectado.

Fonte: RADMANN e COSTA (2008).

A microalga *Scenedesmus obliquus* LEB-22 apresentou o maior teor lipídico ( $6,18 \pm 0,20\%$ ). Para *Spirulina sp.* LEB-18, *Synechococcus nidulans* LEB-25 e *Chlorella vulgaris* LEB-106 foram obtidas as concentrações de  $5,97 \pm 1,22$ ,  $5,00 \pm 0,80\%$  e  $5,21 \pm 0,06\%$ , respectivamente.

Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Morais e Costa (2008), com 5,20; 3,30 e 4,60% de lipídios para *Spirulina sp.* LEB-18, *Scenedesmus obliquus* LEB-22 e *Chlorella vulgaris* LEB-106, respectivamente, com adição de 12% de CO<sub>2</sub>, mas sem adição dos gases SO<sub>2</sub> e NO. A variação das condições de cultivo pode fazer a produção de lipídios variar entre 1 e 40% (m/m) (RADMANN e COSTA, 2008).

A temperatura de secagem da biomassa algal também influencia o conteúdo de ácidos graxos no óleo. Widjaja *et al.* (2009) realizaram um estudo avaliando o efeito da temperatura de secagem na composição de lipídios da microalga *Chlorella vulgaris*. A secagem da biomassa foi realizada nas temperaturas de 0, 60, 80 e 100 °C. Verificaram que a temperatura de secagem da biomassa algal afeta tanto a composição lipídica como o teor de lipídios. A secagem por liofilização (0 °C) mantém a composição de lipídios originais das microalgas, conforme mostrado na Tabela 7. Por outro lado, há uma diminuição no teor de triacilgliceróis em temperaturas mais altas de secagem. No entanto, a secagem nas temperaturas de 60 e 80 °C mantém a composição lipídica, diminuindo apenas um pouco o teor de lipídios.

**Tabela 7** – Composição de lipídios em diferentes temperaturas de secagem.

Principais componentes dos lipídios	Composição (%)			
	0 °C	60 °C	80 °C	100 °C
C <sub>16</sub>	0,85 ± 0,1	0,51 ± 0,07	0,72 ± 0,15	0,57 ± 0,1
C <sub>18</sub>	1,64 ± 0,2	0,89 ± 0,1	1,27 ± 0,3	1,37 ± 0,6
Diacilglicerídeos	3,61 ± 0,1	5,23 ± 1,1	3,53 ± 1,9	5,32 ± 1,2
Triacilglicerídeos	83,73 ± 2,3	85,56 ± 3,4	58,23 ± 2,4	44,26 ± 1,8
Outros	10,16 ± 1,2	7,79 ± 2,5	34,44 ± 2,5	47,46 ± 3,1

Fonte: WIDJAJA *et al.* (2009).

As propriedades dos triacilglicerídeos e do biodiesel são determinadas pela quantidade de cada ácido graxo que estão presentes nas moléculas. O comprimento da cadeia e o número de duplas ligações determinam as características físicas de ambos os ácidos graxos e triacilglicerídeos (RAMOS *et al.*, 2009).

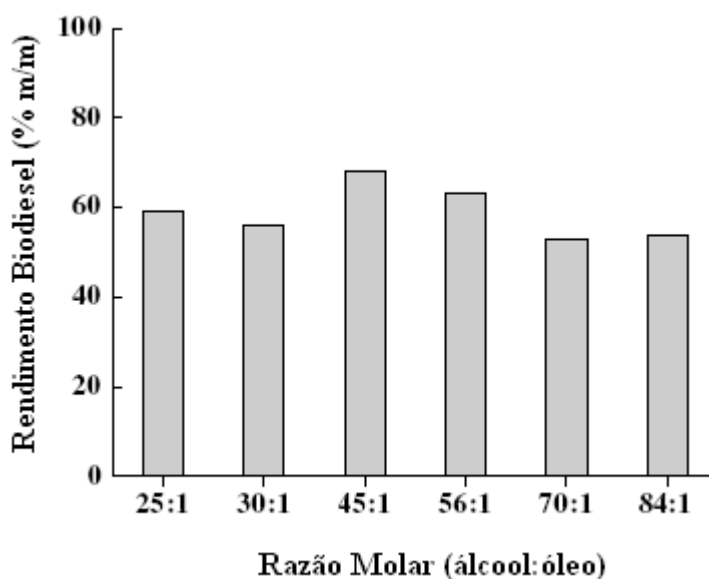
### III.5. BIODIESEL DE ÓLEO MICROALGAL

Os métodos mais empregados em todo o mundo para a produção de ésteres alquílicos (biodiesel) utilizam o óleo bruto ou purificado nas reações (FREEDMAN *et al.*, 1984; MIAO e WU, 2006; XU *et al.*, 2006; MENDES-BURAK *et al.*, 2011). Em contraste com os métodos convencionais de produção, a transesterificação *in situ* (direta) tem sido utilizada com sucesso para produzir biodiesel a partir de materiais para os quais as tradicionais extrações com solvente não são eficientes (OBIBUZOR *et al.*, 2003; LEWIS *et al.*, 2000; WAHLEN *et al.*, 2011; HAAS e WAGNER, 2011). Além de simplificar o processo de produção, os resultados de transesterificação direta melhoram os rendimentos em ésteres alquílicos, quando comparados a uma extração convencional (LEWIS *et al.*, 2000).

#### III.5.1 Transesterificação/Esterificação ácida

Miao e Wu (2006) estudaram a reação de esterificação do óleo de *Chlorella protothecoides*, variando a quantidade de catalisador (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), a temperatura de reação e

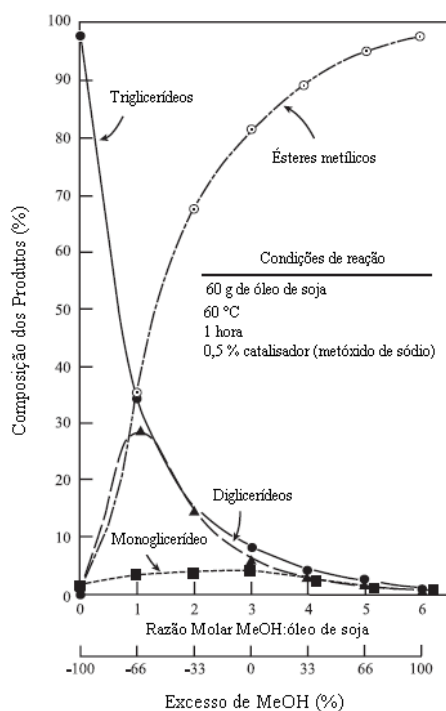
a razão álcool:óleo. A quantidade de catalisador foi baseada na massa de óleo, nas seguintes proporções: 25, 50, 60 e 100 %. As temperaturas de reação estudadas foram 30, 50 e 90 °C. O estudo da razão álcool:óleo foi realizado a 30 °C, com 100% de catalisador (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) em relação à massa de óleo, nas razões metanol:óleo de 25:1, 30:1, 45:1, 56:1, 70:1 e 84:1. Para diferentes quantidades de catalisador, o maior rendimento em biodiesel foi conseguido a 50 °C, porém, houve pouca diferença no rendimento em biodiesel e na densidade para as temperaturas de 30 e 50 °C. Segundo os autores, no aspecto econômico, a melhor combinação do processo é usar uma quantidade de catalisador de 100% com temperatura de 30 °C. Neste caso, o custo da produção é mais baixo do que quando se usa H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a altas temperaturas por um tempo longo. Em relação à quantidade de álcool, os resultados mostraram que os maiores rendimentos em biodiesel foram obtidos nas razões metanol:óleo de 45:1 e 56:1 (Figura 17). A presença do excesso de metanol na transesterificação é essencial para quebrar a ligação glicerol-ácido graxo. Porém, um excesso de metanol (70:1 e 84:1) reduz a velocidade de separação das duas fases produzidas.



**Figura 17** – Rendimento em biodiesel em função da razão álcool:óleo.

Fonte: MIAO e WU (2006).

Um estudo feito por Freedman *et al.* (1984) sobre a influência da razão álcool:óleo na reação de transesterificação do óleo de soja mostrou que, quando a razão álcool:óleo é muito baixa, quantias significativas de mono- e diacilglicerídeos estão presentes no produto final (Figura 18).



**Figura 18** – Efeito da razão álcool:óleo na composição dos produtos da reação de transesterificação do óleo de soja

Fonte: FREEDMAN *et al.* (1984).

No estudo foi necessária uma razão de 6:1 álcool:óleo para que a reação fosse completa, ou seja, que todos os triacilglicerídeos tivessem reagido formando ésteres alquílicos. Os mono- e diacilglicerídeos de ácidos graxos saturados presentes no biodiesel se cristalizam facilmente e podem causar obstrução do filtro de combustível e outros problemas de desempenho nos motores automotivos (GERPEN, 2005).

Umdu *et al.* (2009) estudaram a reação de transesterificação heterogênea com óleo da microalga *Nannochloropsis oculata*, na temperatura de 50 °C e razão álcool:óleo de 6:1. Verificaram que os catalisadores puros CaO e MgO não são ativos na transesterificação de óleo microalgal. Empregando os catalisadores CaO/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e MgO/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (80 % com relação à massa de óleo) os rendimentos em biodiesel foram de 23 e 16%, respectivamente. Rendimentos de 97,5% só foram conseguidos quando a razão metanol:óleo foi aumentada de 6:1 para 30:1. Segundo os autores a atividade não foi relacionada aos tamanhos dos cristalitos de CaO na Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, mas está relacionada à densidade de sítios básicos e à força básica gerada na síntese.

Mandal e Mallick (2009) realizaram o estudo da transesterificação ácida do óleo da microalga *S. obliquus*, utilizando uma razão metanol:óleo de 60:1. Verificaram que após sete horas de reação nenhum triacilglicerídeo e diacilglicerídeo foi encontrado no biodiesel. Os resultados obtidos também mostraram que os principais ésteres metílicos encontrados foram aqueles correspondentes aos ácidos graxos palmítico, oléico, linoléico e linolênico, conforme mostrado na Tabela 8. Portanto, o biodiesel proveniente do óleo de *S. obliquus* contém principalmente, ácidos graxos saturados e mono-insaturados, que são desejados por proporcionarem alta estabilidade oxidativa.

**Tabela 8** – Relação de ésteres metílicos de ácidos graxos encontrados no biodiesel do óleo da microalga *S. obliquus*

Ésteres metílicos		Quantidade (% relativa)
Ácido palmítico	(C16:0)	38,8
Ácido oléico	(C18:1)	35,4
Ácido linoléico	(C18:2)	10,8
Ácido linolênico	(C18:3)	15,0

Fonte: MANDAL e MALLICK (2009)

A qualidade do biodiesel produzido a partir de óleo da microalga *Chlorella protothecoides* foi estudada por Xu *et al.* (2006). Para o processo de transesterificação ácida as condições de reação ótimas foram: razão molar álcool:óleo de 56:1, 100% de catalisador (baseado na massa do óleo) e temperatura de reação de 30 °C, com uma redução na densidade do óleo inicial de 0,912 para o valor final de 0,864, em quatro horas de reação. O perfil e a quantidade de ésteres metílicos de ácidos graxos encontrados no biodiesel são apresentados na Tabela 9. O componente mais abundante foi o éster metílico do ácido 9-octadecenóico, com um teor de 60,84%. O total de ésteres metílicos de ácidos graxos com 18 carbonos encontrados foi acima de 80%, o que resultou uma alta qualidade de biodiesel, conforme pode ser observado na Tabela 10. Deste modo, observaram que as propriedades físicas e combustíveis do biodiesel de alga são comparáveis à do diesel comum. Os resultados também sugerem que este novo processo pode ser um método fácil e efetivo para a produção de biodiesel de alta qualidade.

**Tabela 9** – Ésteres metílicos de ácidos graxos no biodiesel de microalga *Chlorella protothecoides*.

<b>Fórmula Molecular</b>	<b>Massa Molar</b>	<b>Ésteres</b>	<b>Composição (%)</b>
C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	242	Metil tetradecanóico	1,31
C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	270	Éster metílico de ácido hexadecanóico	12,94
C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	284	Éster metílico de ácido heptadecanóico	0,89
C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	294	Éster metílico de ácido 9,12-octadecadeinóico	17,28
C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	296	Éster metílico de ácido 9-octadecenóico	60,84
C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	298	Éster metílico de ácido octadecanóico	2,76
C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	310	Éster metílico de ácido 10-nonadecenóico	0,36
C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	324	Éster metílico de ácido 11-eicosenóico	0,42
C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	326	Éster metílico de ácido eicosanóico	0,35

Fonte: XU *et al.* (2006).

**Tabela 10** – Propriedades do biodiesel de óleo de microalgas e o diesel comum.

<b>Propriedades</b>	<b>Biodiesel de óleo de microalgas</b>	<b>Combustível Diesel (Petrodiesel)</b>
Densidade (kg/L)	0,864	0,838
Viscosidade (mm <sup>2</sup> /s, cSt a 40 °C)	5,2	1,9-4,1
Ponto de Fulgor (°C)	115	75
Ponto de fusão (°C)	-12	-50 a 10
Ponto de entupimento de filtro a frio (°C)	-11	-3,0 (max. -6,7)
Índice de acidez (mg KOH/g)	0,374	Max. 0,5
Razão H/C	1,81	1,81

Fonte: Tabela adaptada de MIAO e WU (2006) e XU *et al.* (2006).

### III.5.2 Reações *in situ*

A esterificação e/ou transesterificação *in situ* refere-se à conversão de ésteres alquílicos a partir de ácidos graxos livres e triacilglicerídeos presentes em um material biológico. Reações conduzidas dessa forma são simples e envolvem a adição de um álcool, um catalisador e um material lipídico, a pressão atmosférica e temperaturas

moderadas. Nestas reações os ésteres produzidos se difundem para a fase líquida, a partir da qual podem ser facilmente recuperados (HAAS e WAGNER, 2011).

Ehimem *et al.* (2010) estudaram a esterificação *in situ* com *Chlorella* sp., contendo 28% em massa de óleo, catalisada por ácido sulfúrico. Foram obtidos mais de 90% de conversão máxima teórica, em reações de até 8 h de duração. Os maiores rendimentos foram obtidos nas reações conduzidas a 60 °C, ou acima desta temperatura, contendo pelo menos 4 mL de metanol por grama biomassa algácea (razão molar de álcool:óleo de 1:5) e razão molar entre o óleo na biomassa e o catalisador de 1:1.

Wahlen *et al.* (2011) conduziram a esterificação *in situ*, utilizando várias cepas de microalgas, cianobactérias e também de culturas mistas de lagoas de estabilização. O rendimento teórico máximo de ésteres metílicos foi conseguido em tempos de reações relativamente curtos (20 min). Os autores observaram que a quantidade de ésteres metílicos formados foi maior que a quantidade de ácidos graxos disponível na alga, quando comparado aos resultados prévios de extração com solventes. Esta discrepância pode ser explicada considerando que a técnica de extração utilizada para determinar o conteúdo de triacilglicerídeos é ineficaz, deixando uma quantidade substancial do óleo na célula. Assim, a inclusão de ácido nas reações de esterificação *in situ*, também, poderia facilitar a extração, por quebrar a parede celular do microrganismo. Além disso, uma segunda explicação seria que outras fontes de ácidos graxos, como os lipídios de membrana, como os fosfolipídios, podem ser convertidos em ésteres por este método e contribuir no rendimento em ésteres metílicos totais.

Johnson e Wen (2009) descobriram que a eficácia da esterificação *in situ* de células liofilizadas da microalga *Schizochytrium limacinum* foi substancialmente aumentada pela adição de um solvente orgânico. Nas reações de esterificação a 90 °C, por 40 min, utilizando apenas metanol (7,4 mL/g de alga), o rendimento em ésteres foi de apenas 13% do total de materiais extraíveis com clorofórmio-metanol. Entretanto, quando uma porção de 4 mL do metanol foi substituída por clorofórmio o rendimento em ésteres foi 10 a 20% maior.

Os biocombustíveis são uma alternativa viável aos combustíveis de origem fóssil. Neste contexto, a busca por novas matérias-primas se tornou foco nos últimos anos. A biomassa de microalgas está entre umas das matérias-primas consideradas por muitos como uma fonte promissora de energia. No entanto, a produção de biodiesel a partir de biomassa algácea, considerando o nível de maturidade tecnológica para a produção do biodiesel, apresenta várias desvantagens em comparação às matérias-



primas convencionais, como, por exemplo, a soja (LARDON *et al*, 2009). Considerando os gargalos tecnológicos para uma produção eficiente e sustentável de biocombustível a partir da biomassa algácea surge a necessidade de se desenvolver e buscar o domínio de uma rota tecnológica para esta promissora matéria-prima. Assim, é necessário desenvolver melhores condições de cultivo, que conduzam a uma maior eficiência acoplada a diminuição de custos, biorreatores mais eficientes e que permitam um controle mais fino das condições de cultivo e contaminação, métodos de extração do óleo de microalgas adequados, assim como a otimização dos parâmetros de reação, tais como temperatura e razão molar óleo:álcool:catalisador, nos processos de transesterificação/esterificação para a produção de biodiesel a partir de biomassa algácea.

# CAPÍTULO IV

## MATERIAIS E MÉTODOS

### **IV.1. CULTIVO DAS MICROALGAS**

As cepas das microalgas *Scenedesmus* sp. e *Spirulina* sp. foram gentilmente fornecidas pelo laboratório de Limnologia, Ecotecnologia e Biomanipulação da Universidade Estadual de Oeste do Paraná - UNIOESTE, coordenado pelo Professor Dr. Nyamien Yahaut Sebastien.

Primeiramente, foi realizado um estudo em escala de bancada para o preparo, cultivo e a manutenção do inóculo. Para a preparação dos meios de cultivo deve ser lembrado que estes são constituídos de macronutrientes, ou nutrientes essenciais ao desenvolvimento das plantas, como por exemplo, nitrogênio, hidrogênio, fósforo, cálcio, magnésio e potássio e, também, por micronutrientes, nutrientes requeridos em pequenas quantidades, como por exemplo, boro, cobre, zinco e molibdênio (SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA, 2001).

#### **IV.1.1. Meios de cultivo**

Para a microalga *Scenedesmus* sp. foram testados quatro meios de cultivo diferentes propostos na literatura para este tipo de alga (WATANABE, 1960), quais sejam: meio MC, DM, NPK (10:10:10) e NPK (20:5:10). No cultivo em escala de bancada foram avaliadas as melhores condições de crescimento de biomassa algácea,

frente a cada meio. Os experimentos foram realizados aplicando-se as mesmas condições para todos os meios, sendo a razão volumétrica meio:inóculo:água de 1:1:8.

As Tabelas 11 a 14 apresentam os nutrientes que compõem os meios testados no cultivo das microalgas *Scenedesmus* sp.

➤ **MeioMC:**

**Tabela 11** – Meio MC para cultivo de *Scenedesmus* sp.

Reagente	Quantidade (g/L)
KNO <sub>3</sub>	1,25
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	1,25
FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0,02
Solução A <sub>5</sub> (micronutrientes)	1 mL por litro

Fonte: WATANABE (1960).

➤ **Meio DM:**

**Tabela 12** – Meio DM para cultivo de *Scenedesmus* sp.

Reagente	Quantidade (g/L)
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	1,0
KCl	0,25
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0,55
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,26
FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0,02
Solução A <sub>5</sub> (micronutrientes)	1 mL por litro

Fonte: WATANABE (1960).

➤ **Meio NPK (10:10:10):**

**Tabela 13** – Meio NPK (10:10:10) para cultivo de *Scenedesmus* sp.

Reagente	Quantidade (g/L)
(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	10
Superfosfato Simples	10
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10

Fonte: Adaptado Becker (1994) e Lourenço (2006).

➤ **Meio NPK (20:5:10):**

**Tabela 14** – Meio NPK (25:5:10) para cultivo de *Scenedesmus* sp.

Reagente	Quantidade (g/L)
(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	20
Superfosfato Simples	50
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10

Fonte: Adaptado Becker (1994) e Lourenço (2006).

A microalga *Spirulina* sp. é uma alga que cresce em águas salgadas. A cepa fornecida pelo laboratório de Limnologia, Ecotecnologia e Biomanipulação da Unioeste, era cultivada em água salgada proveniente do mar. No entanto, a microalga *Spirulina* sp. tem sido amplamente cultivada em laboratórios utilizando um meio sintético padrão, para este tipo de microalga, o meio Zarrouk (BERTOLIN, 2005; MORAIS e COSTA, 2007; MULITERNO *et al.*, 2005; LOURENÇO, 2006).

De acordo com Moraes e Costa (2007), a diluição ideal para o cultivo da microalga *Spirulina* sp. é de 1:1 (meio:água + inóculo). Desta maneira, este padrão de diluição do meio Zarrouk foi usado neste trabalho.

A Tabela 15 apresenta os nutrientes que compõem os meios testados no cultivo das microalgas *Spirulina* sp. e as Tabelas 16 e 17 apresentam a composição das soluções de micronutrientes utilizadas para compor os meios para o cultivo das microalgas *Scenedesmus* sp. e *Spirulina* sp.

➤ **Meio Zarrouk:**

**Tabela 15** – Meio Zarrouk para cultivo de *Spirulina* sp.

Reagente	Quantidade (g/L)
NaHCO <sub>3</sub>	16,8
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
NaNO <sub>3</sub>	2,5
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0
NaCl	1,0
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,2
CaCl <sub>2</sub>	0,04
EDTA	0,08
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,01
Solução A <sub>5</sub> e B <sub>6</sub> (micronutrientes)	1mL por litro de cada

Fontes: MULITERNO *et al.* (2005) e BERTOLIN *et al.*(2005).

➤ **Solução A<sub>5</sub> e B<sub>6</sub>:**

**Tabela 16** – Solução A<sub>5</sub> (micronutrientes).

Reagente	Quantidade (g/L)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,9
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,81
ZnCl <sub>2</sub>	0,11
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,08
3(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> O .7MoO <sub>3</sub> . 4H <sub>2</sub> O	0,018

Fonte: WATANABE (1960).

**Tabela 17** – Solução B<sub>6</sub> (micronutrientes).

Reagente	Quantidade (g/L)
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	22,86
KCr(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> . 12H <sub>2</sub> O	19,2
NiSO <sub>4</sub> . 6H <sub>2</sub> O	44,8
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	17,94
TiSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .8H <sub>2</sub> O	61,1
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	43,98

Fonte: WATANABE (1960).

#### IV.1.2. Cinética de crescimento

O aumento da biomassa e/ou densidade celular nos cultivos foi monitorado pela concentração celular, utilizando-se uma correlação pré-determinada (curva-padrão) entre a massa seca da biomassa, pela absorvância a 670 nm, determinada utilizando-se um espectrofotômetro Shimadzu UV-vis 1203 e, também, por turbidez (MULITERNO *et al.*, 2005), utilizando-se um turbidímetro portátil HACH – modelo 2100P.

Durante a fase de crescimento do cultivo, o aumento da biomassa (expresso em massa seca, número de células ou densidade óptica) é proporcional à biomassa presente, caracterizando um crescimento exponencial (LOURENÇO, 2006). O aumento populacional é representado por:

$$\frac{dN}{dt} = rN \quad (2)$$

Integrando e rearranjando os termos, tem-se:

$$r = \frac{\ln(N/N_0)}{\Delta t} \quad (3)$$

sendo que:  $N$  = Densidade de células ou biomassa (g/mL) no tempo  $t$  qualquer  
 $N_0$  = Densidade inicial de células ou biomassa (g/mL) no tempo  $t=0$   
 $r$  = taxa de crescimento exponencial  
 $t$  = tempo (dia)

Como o crescimento de microalgas em cultivo resulta da divisão binária da célula mãe, o aumento da população de microalgas é expresso em logaritmos de base 2. Portanto, a taxa de crescimento foi convertida em duplicações por dia ( $k$ , dia<sup>-1</sup>), segundo:

$$k = \frac{r}{\ln 2} = \frac{r}{0,6931} \quad (4)$$

A produtividade ( $P$  em g.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>) da biomassa é dada por:

$$P = \frac{(X_t - X_0)}{(t - t_0)} \quad (5)$$

sendo que:  $X_t$  é a densidade celular no tempo  $t$  em (g.L<sup>-1</sup>)  
 $X_0$  é a densidade celular no tempo  $t_0$  em (g.L<sup>-1</sup>)  
 $t$  é o tempo (dia)

#### IV.1.3. Condições de cultivo de biomassa

Para o cultivo das microalgas foram testadas três condições diferentes:

- 1) em ambiente controlado, pequenos volumes (escala de bancada);
- 2) em temperatura ambiente, grande volume (em biorreator com capacidade de 500 litros);
- 3) em fotobiorreator (com capacidade para 30 litros).

Desta forma, o cultivo das microalgas em ambiente controlado foi realizado com um fotoperíodo de 24 horas e temperatura controlada em torno de 25°C. O fotoperíodo foi fornecido por quatro lâmpadas fluorescentes de 20 W, totalizando uma iluminância de 5000 Lux. Além disso, utilizou-se aeração proveniente de um compressor de ar tipo A320/A420 (SEBASTIEN e GRANJA, 2005; MOLINA GRIMA *et al.*, 1999).

A construção do biorreator foi realizada com o objetivo principal de desenvolver um biorreator simples, de baixo custo de construção e manutenção, com agitação por meio de borbulhamento de ar comprimido e com uma configuração que permitisse homogeneidade na taxa de luminosidade na cultura (MOLINA GRIMA *et al.*, 1999, ROSENBERG *et al.*, 2008; SPECTOR *et al.*, 2008).

O cultivo em escala maior foi realizado em temperatura ambiente, com fotoperíodo de 24 horas, fornecido por onze lâmpadas fluorescentes de 25 W, totalizando uma iluminância de 4500 Lux. A aeração foi provida com auxílio de um compressor, em que o ar foi fornecido por uma mangueira disposta de forma circular no fundo da caixa, distribuindo, assim, mais homogeneamente em todo o tanque de cultivo.

O cultivo no fotobiorreator foi realizado em temperatura ambiente, com fotoperíodo natural com iluminância máxima de  $110 \times 10^3$  Lux, fornecida pelo sol no horário de maior incidência solar (12:00 horas). O volume do fotobiorreator foi de aproximadamente 30 L, sendo utilizada uma bomba Atman (AT – 306) para promover a recirculação no sistema, numa vazão em torno de 10 L/min.

## **IV.2. RECUPERAÇÃO E SECAGEM DA BIOMASSA.**

A recuperação da biomassa no cultivo foi realizada pela adição de 5 mL de uma solução na concentração de 5 g/L de floculante Tanfloc-SL (cedido gentilmente pela empresa Tanac) por litro de cultivo de alga, que proporcionou que a biomassa decantasse. Assim, após a decantação a biomassa foi filtrada em telas de 20 mesh, e então recolhida e colocada em estufa para a secagem, na temperatura de 60 °C, por 24 horas (BECKER, 1994; SPECTOR *et al.*, 2008; D'OCA *et al.*, 2008; MIAO e WU, 2006; XU *et al.*, 2006). De acordo com os dados da literatura, temperaturas em torno de 60 °C mantém a composição de lipídios na biomassa algácea (WIDJAJA *et al.*, 2009).

Depois de seca, a biomassa foi triturada e armazenada em potes plásticos a temperatura de -8 °C (em freezer), com o objetivo de manter, desta maneira, as propriedades da biomassa (MOLINA GRIMA *et al.*, 2003; WIDJAJA *et al.*; 2009).

## **IV.3. EXTRAÇÃO DO ÓLEO**

No processo de extração dos lipídios da biomassa algácea duas metodologias descritas na literatura, que relatam a extração do óleo de tecidos animais e, também, de microrganismos, foram analisadas: 1) metodologia proposta por Bligh e Dyer (1959); e 2) pelo sistema utilizando o extrator Soxhlet (BLIGH e DYER, 1959; TANAMATI, 2005; LOURENÇO, 2006; MORAIS e COSTA, 2008; SPECTOR *et al.*, 2008; D'OCA



*et al.*, 2008; MANDAL e MALLICK, 2009; BRUM *et al.*, 2009). Também, foi utilizada uma metodologia alternativa, que consistiu em realizar extrações dos lipídios pelo método de extração sucessiva (lavagem) da amostra com solvente a quente.

#### IV.3.1. Métodos

##### ➤ Método 1 –BLIGH e DYER (1959)

Pesaram-se cerca de 100 g de amostra de microalga seca em um béquer de 500 mL. A este béquer foi adicionado uma mistura de 100 mL de clorofórmio e 200 mL de metanol. A suspensão foi homogeneizada por 2 min, para se obter um sistema monofásico. A esse sistema monofásico ternário adicionaram-se 100 mL de clorofórmio, sendo a mistura agitada por 30 s. Então, adicionaram-se 100 mL de água destilada, agitando o béquer continuamente por mais 30 s. A mistura resultante foi filtrada a vácuo, em funil de Büchner, e transferiu-se o filtrado resultante para um funil de separação de 500 mL.

Após a separação, a fase inferior contendo o clorofórmio e a matéria graxa foi drenada para um balão de fundo chato de 500 mL, previamente pesado (denominado  $P_1$ ), e o solvente foi evaporado em evaporador rotativo, com o banho-maria sendo mantido a 34-36 °C. Após, deixou-se o balão secar, sob vácuo, até obter massa constante (denominado  $P_2$ ). O teor de lipídios foi determinado a partir da diferença de massa entre  $P_2$  e  $P_1$  ou seja ( $P_2-P_1$ ).

##### ➤ Método 2- Extração com o Soxhlet (SPECTOR *et al.*, 2008)

Primeiramente, a amostra de microalga seca foi pesada em balança analítica, sendo, em seguida, colocada dentro de um cartucho de papel filtro, o qual foi transferido para o extrator Soxhlet. Pesou-se o balão de extração com precisão ( $P_1$ ) e adicionou-se o solvente n-hexano a este balão. O balão foi, então, acoplado ao extrator e o sistema foi aquecido em banho de silicone até a temperatura desejada, controlador por termopar, por 10 horas. Quando o processo de extração foi completado, desligou-se o sistema de extração e o balão contendo o extrato foi levado a um evaporador rotativo para evaporação do solvente, na temperatura de 50 °C. O balão contendo a matéria graxa foi colocado em estufa a 60 °C até obter massa constante ( $P_2$ ). O teor de lipídios totais foi determinado a partir da diferença de massa entre  $P_2$  e  $P_1$ . Três solventes foram testados neste método: hexano; éter etílico; e diclorometano. A temperatura utilizada variou

conforme a temperatura de ebulição de cada solvente, para o hexano a temperatura foi de 85 °C e para o éter etílico e o diclorometano a temperatura foi de 60 °C.

➤ **Método 3- Extração sucessiva**

Pesou-se 1 grama de biomassa seca, sendo esta transferida para um tubo tipo Falcon, ao qual foram adicionados 10 mL de solvente. Em seguida, o tubo foi colocado em um banho, sob agitação, a 60 °C, por 30 min. Após, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 4000 rpm e o solvente sobrenadante foi transferido para um balão previamente pesado ( $P_1$ ). Ao tubo contendo a biomassa residual adicionaram-se mais 10 mL de solvente e este foi levado novamente ao banho, por mais 30 minutos. Esse processo se repetiu por 6 vezes. Ao final, o solvente no balão, contendo a matéria graxa, foi evaporado em um evaporador rotativo. O balão contendo a matéria graxa foi seco em estufa, a 60 °C, até massa constante ( $P_2$ ). O teor de lipídios totais foi determinado a partir da diferença de massa entre  $P_2$  e  $P_1$ . Três solventes foram testados por este método: hexano, éter etílico e diclorometano.

#### **IV.4. CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO**

Para a caracterização do óleo obtido foi determinado o índice de acidez, a massa molar de cada óleo e o perfil de ácidos graxos obtidos frente a extração com diferentes solventes, conforme descrito a seguir.

##### **IV.4.1. Determinação do índice de acidez**

O índice de acidez indica o estado de conservação do óleo, definido como o número de mg de hidróxido de potássio necessário para neutralizar os ácidos graxos livres em 1 grama de amostra. A oxidação dos acilglicerídeos é acelerada pelo calor e pela luz e a rancidez é quase sempre acompanhada pela formação de ácidos graxos livres (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985; DANTAS, 2006).

O índice de acidez foi determinado pelo método de Adolfo Lutz, que consistiu em pesar 2 g da amostra óleo em um erlenmeyer de 250 mL, adicionar 25 mL da solução de éter:álcool (2:1) e agitar a amostra até a dissolução total da mesma. Em seguida são adicionadas 2 gotas de indicador fenolfotaleína 1%, sendo a amostra

titulada com uma solução de hidróxido de sódio 0,01 mol/L, até o aparecimento de uma coloração rósea, a qual deve persistir por aproximadamente 30 segundos. Assim, o índice de acidez é dado por:

$$\text{Índice de acidez} = \frac{V \cdot f \cdot 5,61}{P} \quad (\text{mg KOH/g}) \quad (6)$$

sendo que:  $V$  é o volume da solução de NaOH 0,01 mol/L gasto na titulação (mL);

$f$  é o fator de correção da solução de NaOH 0,01 mol/L;

$P$  é a massa da amostra (g).

A padronização da solução de hidróxido de sódio foi realizada da seguinte maneira: primeiramente, retirou-se a umidade excessiva do bifitalato de potássio, deixando o sólido em estufa a 105 °C/1 h; depois de frio, pesou-se rapidamente 0,05 g de bifitalato de potássio seco e adicionou-se em 75 mL de água isenta de gás carbônico (água fervida por 3 a 5 minutos e resfriada sem contato com o ar); acrescentou-se à solução 2 gotas de fenolftaleína a 1% e titulou-se com uma solução de hidróxido de sódio 0,01 mol/L a ser padronizada, até o aparecimento de uma solução rósea clara. O fator de correção deve estar entre 0,99 a 1,10, caso contrário adiciona-se água ou hidróxido de sódio na solução até atingir-se esse patamar.

O fator de correção é dado por:

$$f = \frac{P}{0,2042 \cdot V \cdot N} \quad (7)$$

sendo que:  $P$  é a massa do bifitalato de potássio usado na titulação (g);

$V$  é o volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação (mL);

$N$  é a normalidade da solução (nEq/V).

#### IV.4.2. Determinação do perfil de ácidos graxos do óleo

Segundo Visentainer e Franco (2006), para determinar o perfil de ácidos graxos presentes no óleo é necessário, primeiramente, realizar a derivatização deste, já que os óleos a serem analisados precisam ser convertidos em componente de maior

volatilidade, tais como os ésteres metílicos. Como o óleo de microalga apresentou um alto teor de acidez, utilizou-se a metodologia de esterificação de lipídios (HARTMANN e LAGO, 1973), descrita a seguir.

Pesaram-se 100 mg de amostra de óleo em um tubo de ensaio. Adicionaram-se 4 mL de solução 0,5 equivalente/L de NaOH em metanol. Fechou-se bem o tubo de ensaio, o qual foi aquecido em banho de água em ebulição, até dissolver os glóbulos de óleo e a solução tornar-se transparente. Esfriou-se o tubo de ensaio em água corrente e adicionaram 5 mL do reagente esterificante (metanol). O tubo foi novamente aquecido em banho, sendo adicionados 4 mL da solução saturada de cloreto de sódio. Agitou-se vigorosamente o tubo por 30 segundos e, após, adicionaram-se 5 mL do solvente (n-heptano). O tubo foi novamente agitado por mais 30 segundos. Deixou-se o tubo em repouso por aproximadamente 90 minutos, na geladeira. O sobrenadante foi utilizado para análise do óleo por cromatografia em fase gasosa.

#### IV.4.3. Determinação da massa molar do óleo

Uma vez que o óleo de microalgas (assume-se que este é composto principalmente de triacilglicerídeos) contém diferentes ácidos graxos, as suas respectivas contribuições foram utilizadas para estimar a massa molar do óleo de microalgas. Como a formação da molécula de triacilglicerídeos é facilitada pela combinação de moléculas de ácidos graxos e uma molécula de glicerol, com a condensação de três moléculas de água, a massa molar média do óleo de microalgas ( $MM_{\text{óleo}}$ ) foi calculada pela seguinte relação (GEORGOGIANNI *et al.*, 2007; EHIMEN *et al.*, 2011):

$$MM_{\text{óleo}} = 3 \times (\% MM_{\text{ácido graxo}}) + MM_{\text{glicerol}} - 3 \times MM_{\text{água}} \quad (8)$$

sendo que:  $MM_{\text{ácido graxo}}$  é a massa molar do ácido graxo encontrado (g/gmol);

$MM_{\text{glicerol}}$  é a massa molar do glicerol (g/gmol);

$MM_{\text{água}}$  é a massa molar da água (g/gmol).

## IV.5. PRODUÇÃO DE ÉSTERES

Na produção de ésteres alquílicos a partir dos ácidos graxos, duas metodologias foram testadas: a reação de esterificação/transesterificação ácida do óleo de microalga e o processo de esterificação/transesterificação ácida *in situ*, ou seja, utilizando a biomassa seca na reação. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

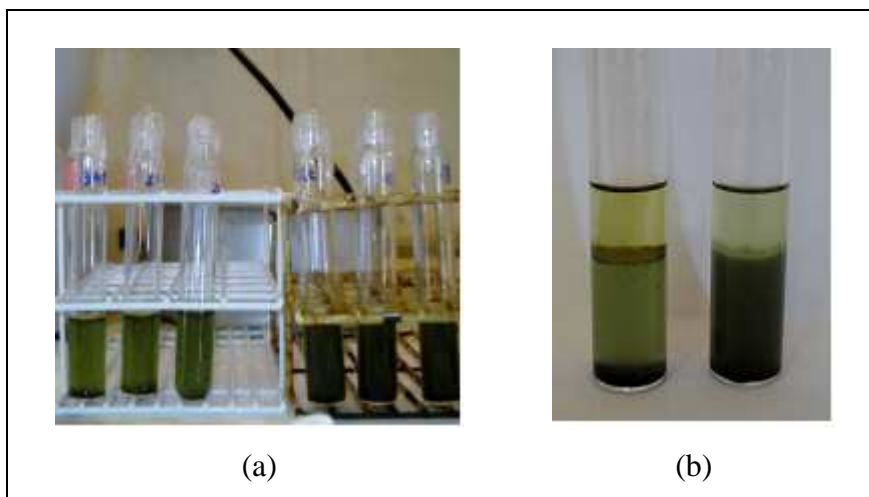
### IV.5.1. Reação *in situ*

Foi avaliada a produção de ésteres via transesterificação e/ou esterificação ácida *in situ* para a biomassa das microalgas *Scenedesmus* sp. e *Spirulina* sp. Este método foi baseado no procedimento proposto por Lewis *et al.* (2000), para a síntese de ésteres alquílicos, descrito a seguir.

Primeiramente, pesaram-se 20 mg de biomassa seca dentro de tubos de ensaio, com capacidade de aproximadamente 10 mL, providos de tampa. Em seguida, foi adicionado ao tubo 3 mL de uma solução contendo álcool (etanol ou metanol), catalisador (HCl) e solvente (hexano ou clorofórmio) na razão 10:1:1 (v/v/v). A biomassa foi suspensa na solução por meio de agitação manual, sendo esta colocada imediatamente no banho, em temperatura pré-determinada. Os tempos de reação estudados foram de 10, 20, 30, 60 e 120 min.

Depois de decorrido o tempo de reação, o tubo foi retirado do banho e resfriado até a temperatura ambiente, em banho com água gelada. Depois de frio, foi adicionado 1 mL de água desionizada, sendo, em seguida, adicionados 2 mL de uma mistura de hexano:clorofórmio na proporção 4:1 (v/v). Após a separação das fases o sobrenadante foi recolhido em outro tubo. Este processo foi repetido por 3 vezes, para assegurar uma completa remoção dos ésteres formados do meio reacional (Figura 19). O solvente foi, então, evaporado e os ésteres produzidos foram diluídos em uma solução de hexano e de éster metílico tricosanóico, utilizado como padrão interno (PI), de concentração conhecida. A amostra foi armazenada a -8 °C (freezer).

Para o estudo das reações *in situ* foram avaliados dois álcoois (etanol e metanol) e dois solventes (hexano e clorofórmio). A reação foi realizada em cinco temperaturas diferentes, quais sejam: 30, 45, 60, 75 e 90 °C. Também, foi avaliado o tempo de reação, sendo estes 10, 20, 30, 60 e 120 minutos.



**Figura 19** – Reação *in situ*: a) antes de se adicionar hexano:clorofórmio; e b) após separação das fases.

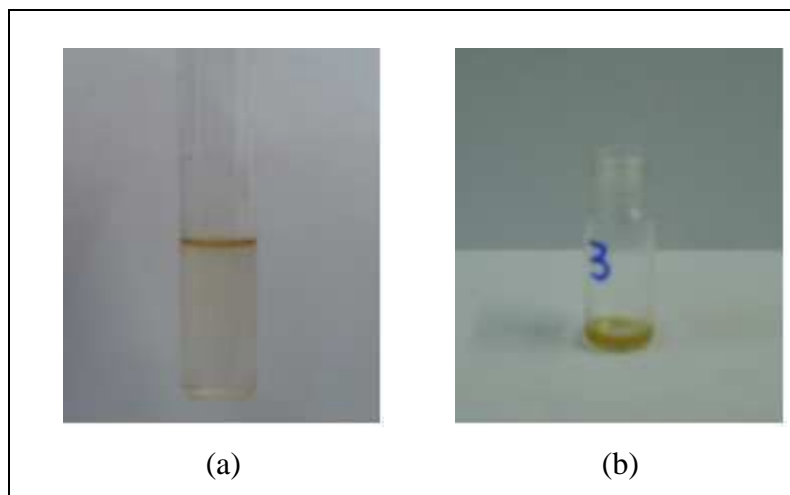
#### IV.5.1. Reação transesterificação/esterificação ácida

A reação de transesterificação/esterificação ácida do óleo das microalgas *Scenedesmus* sp. e *Spirulina* sp. foi realizada dentro de tubos de ensaio providos de tampa, conforme o procedimento descrito a seguir.

Primeiramente, pesou-se o óleo dentro do tubo e adicionou-se uma solução contendo álcool etílico e ácido clorídrico, na quantidade necessária para se ter uma razão molar álcool:óleo de 20:1 e 3% de catalisador com relação à massa de óleo. Imediatamente, o tubo foi colocado em banho, na temperatura de 100 °C. Depois de decorridos 3 horas de reação, o tubo foi resfriado rapidamente até a temperatura ambiente, em banho com água fria, e, em seguida, foram adicionados 2 mL de uma solução saturada de cloreto de cálcio.

Após a separação das fases (Figura 20a), a fase oleosa foi transferida com auxílio de uma pipeta de *Pasteur* para um *vial* de 2 mL (Figura 20b). O tubo foi colocado em um dessecador, acoplado a uma bomba de vácuo Tecnal E-058, com vácuo de 400 mmHg, permanecendo armazenado nesta condição até massa constante.

Em um balão volumétrico de 10 mL pesou-se com exatidão cerca de 20 mg da fase oleosa, que estava armazenada no *vial*, sendo adicionados 0,2 mL de uma solução de éster metílico tricosanóico, utilizado como padrão interno (PI), de concentração conhecida. O volume do balão foi, então, completado com n-heptano. A amostra obtida foi acondicionada adequadamente dentro de *vial* e armazenada a -8 °C (freezer).



**Figura 20** – Reação de transesterificação/esterificação do óleo de microalgas:  
a) separação das fases; e b) ésteres etílicos obtidos.

#### IV.6. ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

As análises cromatográficas foram realizadas em Cromatógrafo Varian, modelo CP – 3800, com detector de ionização de chama (DIC), contendo uma coluna capilar específica para separação de ácidos graxos BP – X70 – SGE de 30 m x 0,25 mm. Como gás de arraste utilizou-se o hélio, numa razão *split* de 1:10. A análise foi realizada com programação de temperatura da coluna, iniciando a 140 °C, com aquecimento até 250 °C a uma taxa de 5 °C/min. A temperatura do detector foi de 220 °C e do injetor de 260 °C.

A partir do cromatograma obtido para as amostras analisadas foi possível identificar, por meio da comparação dos tempos de retenção na coluna com uma amostra padrão, os respectivos ésteres etílicos/metílicos presentes na amostra (VISENTAINER e FRANCO, 2006).

A determinação dos tempos de retenção foi realizada injetando-se no cromatógrafo padrões de ésteres de ácidos graxos conhecidos. Os resultados foram, então, comparados com o tempo de retenção dos ésteres da amostra que foi analisada, nas mesmas condições cromatográficas (VISENTAINER e FRANCO, 2006).

Para isto, fez-se uso de um padrão FAME Mix (*fatty acid methyl ester*), que consiste em uma amostra contendo 37 diferentes ésteres metílicos, os quais incluem os ésteres contidos no óleo e biodiesel analisados.

#### IV.6.1. Quantificação dos produtos de reação

Para quantificar os produtos de reação utilizou-se a metodologia da padronização interna, conforme descrita em Visentainer e Franco (2006). Esta metodologia foi escolhida por ser menos sensível a erros de injeções e variações instrumentais, como, por exemplo, o fluxo do gás de arraste, a temperatura da coluna etc. Isto ocorre devido à injeção da amostra e do padrão serem feitas conjuntamente, em que os possíveis erros na injeção ou variações instrumentais ocorrem em ambos, anulando-se mutuamente (VISENTAINER e FRANCO, 2006).

O padrão interno (PI) utilizado foi o éster metílico tricosanóico 99%, adquirido da Sigma-Aldrich. Este éster foi escolhido como PI por não ter sido identificado como componente da amostra de biodiesel produzido. Além disso, é um composto estável, permite a adição de uma quantidade precisa na amostra e, principalmente, apresenta a resposta próxima aos componentes encontrados no biodiesel produzido (VISENTAINER e FRANCO, 2006).

Para o cálculo da massa de ácidos graxos presentes na amostra é necessário utilizar fatores de correção para os ésteres, em relação ao padrão interno (PI). Existem dois fatores para corrigir esta resposta diferencial, sendo estes o fator de correção experimental ( $F_{CE}$ ), cujo valor é determinado experimentalmente, e o fator de correção teórico ( $F_{CT}$ ), determinado teoricamente a partir do número de carbonos ativos ( $C^*$ ), ou seja, o número de carbonos ligados a átomos de hidrogênio (C-H).

Para o cálculo do fator de correção teórico, primeiramente, definiu-se um éster, que foi utilizado como referência, sendo que este éster recebe arbitrariamente o valor da unidade. A partir disso, calcula-se a porcentagem mássica de carbonos ativos do composto de referência (estereato de etila), bem como do éster a ser determinado. Desta forma, tem-se:

$$F_{CT} = \frac{P_r}{P_x} \quad (8)$$

sendo que:

$P_r$  é a porcentagem mássica de carbonos ativos do composto de referência (estereato de etila);

$P_x$  é a porcentagem mássica de carbonos ativos do composto analisado x.



Considerando o ácido palmítico como exemplo, tem-se:

Para o composto de referência a  $MM_{\text{ésterato de etila}} = 312,50 \text{ g/gmol}$ , sendo que a massa de carbonos ativos (Massa de C\*) = 228,20 g/gmol. Assim, para a massa molar de 312,50 g/gmol do composto de referência (100%), a porcentagem de carbonos ativos (228,20 g/gmol) neste composto corresponderá a 73,03%.

Para o ácido palmítico a  $MM_{\text{ácido palmítico}} = 284,48 \text{ g/gmol}$ , sendo que a massa de carbonos ativos (Massa de C\*) = 204,19 g/gmol. Assim, para a massa molar de 284,48 g/gmol do ácido palmítico (100%), a porcentagem de carbonos ativos (204,19 g/gmol) no ácido palmítico corresponderá a 71,78%.

Portanto, o fator de correção teórico será obtido como:

$$F_{CT} = \frac{73,03\%}{71,78\%} = 1,0174 \quad (9)$$

Repete-se o mesmo procedimento para o cálculo do fator de correção teórico dos outros componentes presentes na amostra.

Além disso, de acordo com Visentainer e Franco (2006), os componentes injetados são ésteres metílicos/etílicos e para convertê-los para ácido graxo é necessário calcular o fator de conversão. O objetivo deste procedimento foi corrigir a resposta diferencial do detector entre um éster metílico/etílico e o seu ácido graxo correspondente. Para isso, utilizou-se a seguinte relação:

$$F_{CEA} = \frac{MM_{\text{éster}}}{MM_{\text{ácido graxo}}} \quad (10)$$

sendo que:  $MM_{\text{éster}}$  é a massa molar do éster metílico/etílico (g/gmol);

$MM_{\text{ácido graxo}}$  é a massa molar do ácido graxo (g/gmol).

$F_{CEA}$  é o fator de conversão de éster metílico/etílico para ácido graxo.

A partir da determinação destes parâmetros foi possível calcular a massa de ácido graxo na amostra, bem como a massa de éster metílico/etílico. Assim, para o cálculo da massa de ácido graxo na amostra utilizou-se a seguinte relação:

$$M_x = \frac{A_x \cdot M_p \cdot F_{CT}}{A_p \cdot F_{CEA} \cdot M_a} \quad (11)$$

sendo que:

$M_x$  é a massa do ácido graxo  $x$  na amostra analisada de lipídios totais (mg/g);

$M_p$  é a massa do padrão interno (mg);

$M_a$  é a massa de lipídios totais (g);

$A_x$  é a área no cromatograma relativa ao ácido graxo  $x$  na amostra analisada;

$A_p$  é a área no cromatograma relativa ao padrão interno na amostra analisada;

Na determinação da quantidade de éster obtida, o fator  $F_{CEA}$  é omitido da equação (11), visto que este é o fator de conversão de ésteres a ácido graxo. Nas reações *in situ*, o valor de  $M_a$  foi igual a massa de biomassa utilizada na reação. Obteve-se, assim, a massa de éster produzido por grama de biomassa seca (mg de éster/g biomassa). Para as reações em que se utilizou o óleo extraído, o valor de  $M_a$  foi igual a quantidade de óleo analisada. Obteve-se, assim, a massa de éster produzido por grama de óleo (mg de éster/g de óleo).

# CAPÍTULO V

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### V.1. CULTIVO DAS MICROALGAS

Primeiramente, foi realizado um estudo em escala de bancada para o preparo, cultivo e a manutenção dos inóculos. A microalga *Scenedesmus* sp. é cultivada em água doce, já a *Spirulina* sp. é uma alga que cresce em água marinha e seu cultivo no laboratório foi realizado com meio padrão para esta microalga, conforme descrito no capítulo anterior.

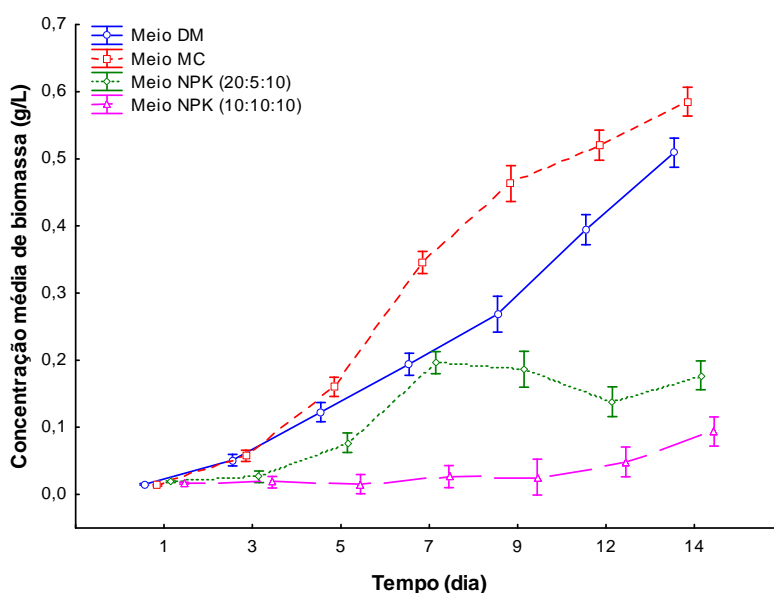
O crescimento dos cultivos foi monitorado pela densidade óptica e, também, pela turbidez. Estes parâmetros foram determinados por meio de uma curva padrão, previamente construída, que relaciona a massa seca de amostra, a densidade óptica e a turbidez. A concentração inicial de biomassa também foi determinada por esse procedimento.

#### **V.1.1. Cultivo de microalgas dos gêneros *Scenedesmus* sp. e *Spirulina* sp. em escala de bancada e avaliação dos parâmetros de cultivo.**

##### **- *Scenedesmus* sp.**

Para a microalga *Scenedesmus* sp. foram testados quatro meios de cultivo diferentes propostos na literatura para este tipo de alga (WATANABE, 1960). No cultivo em escala de bancada foram avaliadas as melhores condições de crescimento de biomassa algácea frente a cada meio.

De forma geral, o meio que apresentou as melhores produtividades após a fase de adaptação, no período de 7-9 dias, foi o meio MC, seguido do meio DM, e do meio NPK (20:5:10). O meio NPK (10:10:10) apresentou os menores valores de produtividade, não se mostrando um bom meio para o cultivo da microalga *Scenedesmus* sp., conforme pode ser observado na Figura 21 e na Tabela 18. Verificou-se, também, que a taxa de crescimento e, conseqüentemente, a produtividade para os meios NPK (10:10:10) e (20:05:10) foram muito menores do que para os meios DM e MC.



**Figura 21** – Concentração da biomassa de *Scenedesmus* sp. em função do tempo de cultivo, para diferentes meios.

Os resultados indicam que as maiores taxas de crescimento de *Scenedesmus* sp. ocorreram nos primeiros dias de cultivo, exceção feita ao cultivo realizado com NPK (10:10:10), que apresentou a maior taxa de crescimento após doze dias de cultivo. Da mesma forma que a produtividade, a taxa de crescimento também apresentou valores maiores quando cultivada no meio MC, principalmente, nos primeiros dias de cultivo.

**Tabela 18** – Produtividade e taxa de crescimento para diferentes meios no cultivo de *Scenedesmus* sp.

Intervalo (dia)	Meios de Cultivo							
	DM		MC		NPK (20:05:10)		NPK (10:10:10)	
	P	r	P	r	P	r	P	r
1-3	18,09 ± 3,42	0,617	21,98 ± 4,73	0,723	3,71 ± 2,79	0,167	0,82 ± 0,62	0,047
3-5	26,92 ± 3,24	0,438	36,66 ± 4,18	0,512	14,58 ± 0,76	0,540	0,37 ± 1,35	-0,093
5-7	29,84 ± 1,17	0,229	55,31 ± 3,53	0,384	29,6 ± 1,74	0,468	1,61 ± 0,62	0,274
7-9	31,68 ± 0,97	0,162	56,19 ± 4,7	0,147	20,96 ± 1,65	-0,026	1,12 ± 0,41	-0,014
9-12	34,35 ± 0,76	0,127	46,07 ± 2,53	0,039	10,86 ± 1,46	-0,100	2,87 ± 0,6	0,211
12-14	38,03 ± 1,8	0,130	43,97 ± 0,95	0,059	12,21 ± 1,09	0,125	5,92 ± 1,06	0,331

P = produtividade ( $\text{mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ); r = taxa de crescimento ( $\text{dia}^{-1}$ ).

O meio de cultivo DM mostrou produtividades menores nos primeiros dias, quando comparado ao MC. No entanto, após 7 dias de cultivo o meio DM apresentou taxa de crescimento maior, quando comparado ao meio MC.

Valores parecidos foram encontrados por Moraes e Costa (2007), quando cultivaram *Scenedesmus obliquus* em três fotobiorreatores conectados em série, utilizando o meio MC no cultivo. No entanto, a taxa de crescimento máxima obtida pelos autores para *Scenedesmus obliquus* ( $0,15 \text{ dia}^{-1}$ ) foi inferior à taxa de crescimento de  $0,512 \text{ dia}^{-1}$  para a *Scenedesmus* sp. alcançada no presente trabalho.

Devido ao excelente resultado obtido na produtividade de *Scenedesmus* sp. com o meio de cultivo MC, este foi utilizado como meio padrão na produção de biomassa algácea, necessária para a fase experimental de extração de lipídios e produção de biodiesel.

Tendo em vista que o custo de produção representa nos dias de hoje um dos fatores limitantes na produção de biodiesel e, ainda, que os custos com o meio de cultivo são relevantes, foi realizado um experimento variando-se a concentração do meio MC, com o objetivo de encontrar uma relação ótima entre a diluição do meio e a produtividade da microalga. A Figura 22 mostra os experimentos preparados para cinco diluições do meio MC em água.



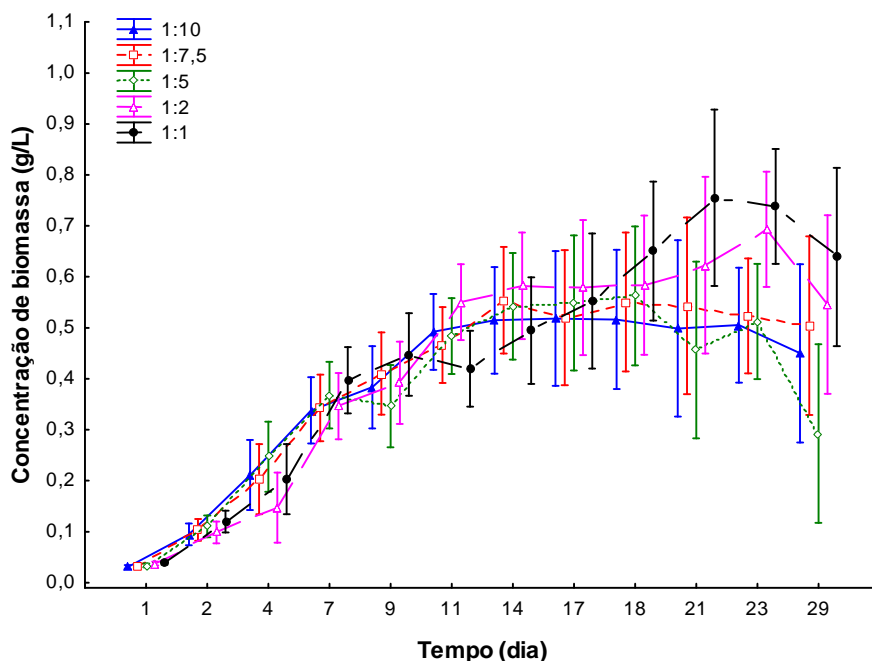
**Figura 22** – Montagem dos experimentos para estudar a variação na concentração do meio MC no cultivo da microalga *Scenedesmus* sp.

Quando utilizadas diferentes diluições do meio MC não foi possível observar diferenças significativas na produtividade de biomassa algácea, entre os meios, até o 18º dia. Esse resultado indica que, na produção de biomassa até 18 dias de cultivo, conforme mostrado na Tabela 19 e Figura 23, se pode utilizar o meio MC com diluições de até 1:10, sem comprometer a produtividade de biomassa de *Scenedesmus* sp.

**Tabela 19** – Produtividade ( $\text{mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ) para diferentes diluições do meio MC no cultivo de *Scenedesmus* sp.

Intervalo (dia)	Diluição do meio				
	1:10*	1:7,5	1:5	1:2	1:1
0-2	64,21 ± 2,67**	71,16 ± 2,19	76,79 ± 4,39	61,37 ± 2,27	81,11 ± 9,25
2-4	60,18 ± 2,81	56,91 ± 6,0	71,12 ± 13,89	36,51 ± 19,98	54,79 ± 10,43
4-7	51,25 ± 8,28	51,71 ± 4,21	55,7 ± 2,83	51,48 ± 3,91	59,7 ± 15,0
7-9	44,1 ± 7,1	47,24 ± 7,37	39,07 ± 5,83	44,3 ± 7,2	51,08 ± 11,03
9-11	46,17 ± 2,06	43,37 ± 6,15	45,01 ± 9,25	51,3 ± 2,68	38,05 ± 6,18
11-14	37,25 ± 2,12	40,11 ± 2,84	39,11 ± 12,01	41,92 ± 5,36	35,04 ± 3,7
14-17	30,5 ± 2,08	30,47 ± 3,17	32,19 ± 10,78	33,84 ± 6,03	32,1 ± 6,46
17-18	28,59 ± 2,55	30,49 ± 3,2	31,12 ± 9,09	32,13 ± 2,74	35,95 ± 9,27
18-21	23,41 ± 2,29	25,53 ± 0,79	21,13 ± 6,46	29,27 ± 5,4	35,81 ± 12,14
21-23	21,57 ± 3,94	22,31 ± 1,08	21,75 ± 1,18	29,82 ± 1,49	31,77 ± 7,65
23-29	14,98 ± 2,96	16,85 ± 1,05	9,24 ± 2,12	18,16 ± 9,44	21,43 ± 3,79

\* razão meio : água+inóculo. \*\* produtividade ± desvio padrão da média



**Figura 23** – Concentração da biomassa de *Scenedesmus* sp., cultivada no meio MC, nas diluições 1:10 (▲), 1:7,5 (■), 1:5 (●), 1:2 (○), 1:1 (■), em função do período de cultivo.

Na Tabela 20 é possível observar que a taxa de crescimento para todas as diluições variou amplamente ao longo do tempo e, acompanhando esta tendência, as duplicações por dia variaram ao longo do desenvolvimento do cultivo. Os dados indicam que nos dois primeiros dias a microalga realizou mais que uma duplicação por dia, reduzindo o tempo de duplicação nos dias subsequentes até atingir o valor mínimo.

Conforme discutido anteriormente, o custo dos reagentes para a preparação dos meios de cultivos é um dos fatores relevantes na produção de microalgas e a redução da quantidade de meio utilizado, por biomassa algácea produzida, poderá diminuir de forma significativa os custos de produção. Assim, a diluição do meio de cultivo indica os primeiros passos no caminho a ser seguido para tornar viável a produção, em escala industrial, dessa nova alternativa de fonte energética. Além disso, não havendo diferença significativa entre as diluições, foi utilizada a diluição de 1:10 como condição padrão para as demais cultivos.

**Tabela 20** – Taxa de crescimento e duplicações por dia, para diferentes diluições do meio MC de cultivo de *Scenedesmus* sp.

Intervalo (dia)	Diluição do Meio									
	1:10*		1:7,5		1:5		1:2		1:1	
	r	k	r	k	r	K	r	k	r	k
0-2	1,11	1,60	1,11	1,68	1,19	1,71	0,97	1,40	1,12	1,62
2-4	0,39	0,56	0,39	0,48	0,40	0,58	0,17	0,25	0,26	0,38
4-7	0,17	0,25	0,17	0,25	0,14	0,20	0,31	0,44	0,22	0,32
7-9	0,06	0,09	0,06	0,13	0,03	-0,05	0,06	0,08	0,06	0,09
9-11	0,13	0,18	0,13	0,09	0,16	0,24	0,17	0,25	0,03	-0,04
11-14	0,01	0,02	0,01	0,08	0,03	0,05	0,02	0,03	0,06	0,08
14-17	0,00	0,00	0,00	-0,03	0,00	0,00	0,00	-0,01	0,03	0,05
17-18	0,00	-0,01	0,00	0,08	0,03	0,05	0,02	0,02	0,15	0,22
18-21	0,00	-0,02	0,00	-0,01	0,07	-0,10	0,02	0,03	0,04	0,06
21-23	0,00	0,00	0,00	-0,03	0,07	0,11	0,06	0,08	0,00	0,00
23-29	0,0	-0,03	0,00	-0,01	-0,10	-0,14	-0,06	-0,08	-0,02	-0,03

\* razão meio : água+inóculo; r = taxa de crescimento (dia<sup>-1</sup>); k = duplicações por dia (dia<sup>-1</sup>).

### - *Spirulina* sp.

A microalga *Spirulina* sp. foi cultivada com um meio sintético padrão (Zarrouk) para este tipo de microalga (BERTOLIN, 2005; MORAIS e COSTA, 2007; MULITERNO *et al.*, 2005, LOURENÇO, 2006).

A Figura 24 mostra o cultivo da microalga *Spirulina* sp. em meio Zarrouk, cultivada em ambiente controlado. A produtividade, a taxa de crescimento e as duplicações por dia obtidas para a microalga *Spirulina* sp., são apresentadas na Tabela 21. Como descrito anteriormente, Morais e Costa (2007), relataram que a diluição ideal para o cultivo da microalga *Spirulina* sp. é de 1:1 (meio: água + inóculo), assim, este padrão de diluição do meio Zarrouk foi usado para o cultivo neste trabalho.





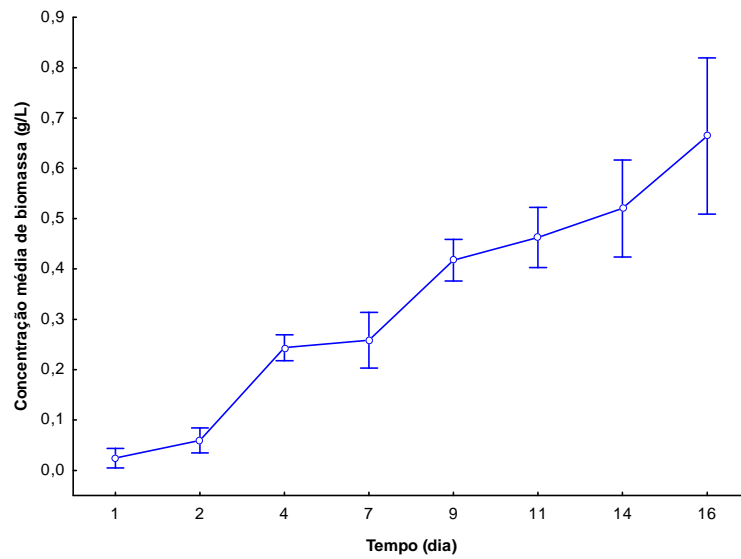
**Figura 24** – Montagem dos experimentos para estudar o cultivo das microalgas *Spirulina* sp. em meio Zarrouk.

A partir dos valores apresentados na Tabela 21 pode-se observar que a maior produtividade se deu no período de 2-4 dias e, também, para o período de 7-9 dias. É possível notar, ainda, que a taxa de crescimento e consequentemente o número de duplicações diminui com o tempo, até atingir o valor mínimo. Valores próximos a estes foram encontrados por Moraes e Costa (2007), quando cultivaram *Spirulina* sp. em três fotobiorreatores conectados em série, utilizando o meio Zarrouk de cultivo. A Figura 25 mostra a concentração de biomassa da microalga *Spirulina* sp em função do tempo de cultivo, corroborando com os dados da Tabela 21, observou-se um aumento na concentração da biomassa no período de 2-4 dias, assim como no período de 7-9 dias.

**Tabela 21** – Produtividade, taxa de crescimento e duplicações por dia para o cultivo da microalga *Spirulina* sp.

Intervalo (dia)	Produtividade	r	k
1-2	35,52 ± 8,57	0,451	0,65
2-4	91,98 ± 2,93	0,703	1,01
4-7	4,91 ± 13,07	0,020	0,03
7-9	67,99 ± 43,71	0,211	0,31
9-11	18,99 ± 11,34	0,046	0,07
11-14	40,41 ± 15,41	0,082	0,12
14-16	48,76 ± 15,87	0,081	0,12

P = produtividade (mg.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>); r = taxa de crescimento (dia<sup>-1</sup>); k = duplicações (dia<sup>-1</sup>).



**Figura 25** – Concentração da biomassa para o cultivo de *Spirulina* sp.

### V.1.2. Condições de cultivo

Em ambiente controlado, o cultivo das microalgas foi realizado em erlemeyers de 1, 2 ou 6 litros, conforme ilustrado na Figura 26.



**Figura 26** – Cultivo das microalgas em ambiente controlado.

O cultivo também foi realizado em escala maior, utilizando-se como biorreator uma caixa d'água de polietileno, com capacidade para 500 L (Figura 27).



**Figura 27** – Cultivo das microalgas em temperatura ambiente em biorreator de maior capacidade (500 L).

A Tabela 22 apresenta os dados de produtividade para a microalga *Scenedesmus* sp. e *Spirulina* sp. no cultivo em temperatura ambiente e em escala maior (500 L).

**Tabela 22** – Produtividade e taxa de crescimento para a microalga *Scenedesmus* sp. e *Spirulina* sp. no cultivo em temperatura ambiente e escala maior (500 L).

<i>Scenedesmus</i> sp.				<i>Spirulina</i> sp.			
Intervalo (dia)	P	r	T <sub>média</sub> (°C)	Intervalo (dia)	P	r	T <sub>média</sub> (°C)
0-5	0,00	0,006	21	0-2	2,28	0,068	18
5-11	0,91	0,072	9	2-6	1,28	0,013	26
11-14	8,03	0,312	17	6-9	0,60	0,010	24
14-18	5,88	0,116	13	9-13	3,15	0,029	22
18-20	0,00	0,045	16	13-16	2,53	0,036	10
20-27	2,94	0,043	21	16-20	7,07	0,049	15
27-33	7,20	0,073	20	20-23	9,42	0,071	19
33-36	2,47	0,020	18	23-26	3,65	0,032	18
39-39	2,35	0,018	18				

P=produtividade ( $\text{mg.L}^{-1}\text{dia}^{-1}$ ); r=taxa de crescimento ( $\text{dia}^{-1}$ ); T=temperatura média (°C), p/ intervalo dias.

Além das condições já mencionadas, foi ainda realizado o cultivo em um fotobiorreator (30 L), mostrado na Figura 28, que operou a temperatura ambiente, com fotoperíodo natural.



**Figura 28** – Cultivo das microalgas em fotobiorreator de 30 L.

A Tabela 23 apresenta os dados de produtividade para a microalga *Scenedesmus* sp. no cultivo em temperatura ambiente no fotobiorreator de 30 L.

**Tabela 23** – Produtividade e taxa de crescimento para a microalga *Scenedesmus* sp. no cultivo em temperatura ambiente no fotobiorreator de 30 L.

Intervalo (dia)	P	r	T <sub>média</sub> (°C)
5	0,27	0,025	21
8	0,26	0,021	9
12	0,16	0,012	17
14	0,85	0,061	13
21	5,93	0,190	16
27	22,28	0,202	21
30	7,67	0,038	20
33	17,44	0,073	18
36	30,79	0,099	18

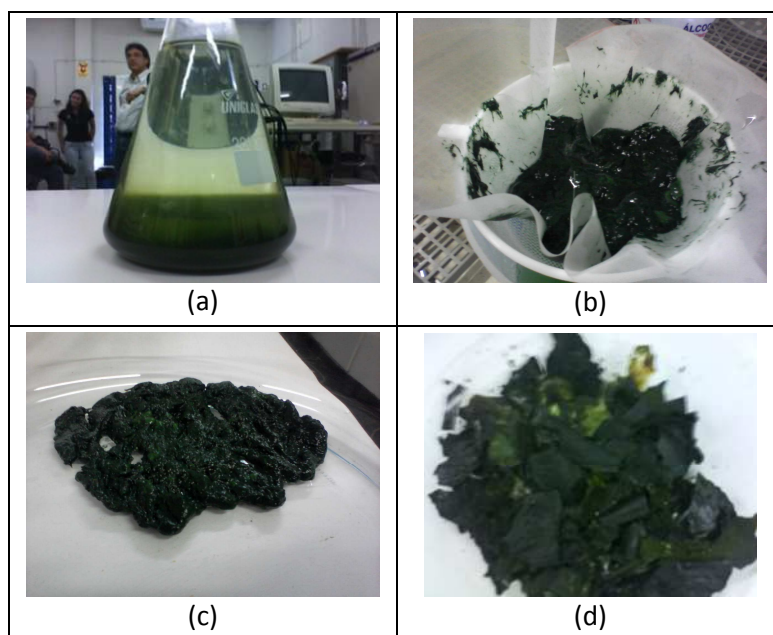
P = produtividade ( $\text{mg.L}^{-1}\text{dia}^{-1}$ ); r = taxa de crescimento; T = temperatura média (°C).

Observa-se que a produtividade da biomassa algácea tanto no fotobiorreator de 30 L como no cultivo em caixa d'água de 500 L foi bem menor do que aquela obtida em ambiente controlado. Estes resultados podem ser devido à variação na incidência de luz, que foi menor para os sistemas em escala maior e, principalmente, à variação de temperatura ao longo do cultivo, visto que houveram dias em que a temperatura chegou próxima a 0 °C, uma vez que os ensaios foram realizados no período de maio a julho.

Porém, estes resultados não excluem a possibilidade do cultivo de microalgas ser realizado em ambientes sem controle de temperatura, pois para um sistema em grande escala o controle de temperatura do meio poderia elevar o custo de produção de forma significativa. Cabe ressaltar, ainda, que os resultados obtidos para ambas as algas indicam que os sistemas estudados requerem um tempo maior para alcançar concentrações maiores por litro de biomassa.

## V.2. RECUPERAÇÃO E SECAGEM DA BIOMASSA

O processo de recuperação da biomassa foi realizado pela adição de floculante, decantação e filtração em telas de 20 mesh, para se obter a biomassa. A Figura 29 ilustra o processo de decantação e filtração da biomassa.

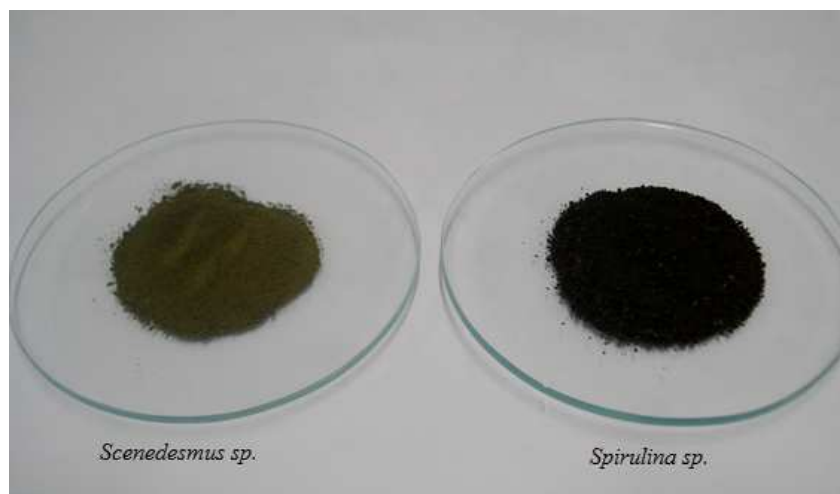


**Figura 29** – Recuperação da biomassa: a) Decantação após adição do floculante; b) filtração; c) recuperação da biomassa; e d) biomassa algácea seca.

Trabalhos preliminares de separação da biomassa foram realizados apenas por filtração e, também, por centrifugação. Os resultados obtidos mostraram que não foi possível filtrar a biomassa, mesmo empregando de filtros de abertura muito pequena. Por outro lado, com o processo de centrifugação da biomassa foi possível separar a biomassa do meio. No entanto, este processo em larga escala se tornou impossível,

devido à possibilidade de se tratar apenas pequenos volumes de biomassa (centrifugas de pequeno porte). Assim, houve a necessidade de se promover a separação da biomassa do meio com a ajuda de um agente floculante, conforme descrito. Portanto, a adição do floculante fez com que as células em suspensão se aglomerassem e decantassem, possibilitando que o excesso de água fosse retirado. A biomassa decantada foi, então, facilmente filtrada. A adição do floculante possibilitou que a recuperação celular fosse maximizada, com menor perda de células, conforme já mostrado na Figura 29.

A biomassa seca foi triturada para obter uma biomassa homogênea (Figura 30), para ser utilizada nas reações de esterificação e nas reações *in situ*, assim como para os testes de extração frente a vários solventes.



**Figura 30** – Biomassa seca e triturada

### V.3. EXTRAÇÃO DO ÓLEO

As metodologias encontradas na literatura para análise de lipídios totais não são muito claras para o caso de microalgas. Devido a este fato, foram testadas diferentes metodologias para a extração de lipídios totais, cujos procedimentos foram descritos no capítulo anterior.

Os resultados da extração do óleo da biomassa seca pelo método proposto por Bligh e Dyer (1959), para as microalga *Scenedesmus* sp. e *Spirulina* sp, são apresentados na Tabela 24.

**Tabela 24** – Massa de lipídios totais da extração do óleo da microalga *Scenedesmus* sp. pelo método Bligh e Dyer (1959).

Microalga	g lipídios totais/g Biomassa seca (%)
<i>Scenedesmus</i> sp	8,3
<i>Spirulina</i> sp.	12,4

A extração pela metodologia proposta por Bligh e Dyer (1959) apresentou um bom resultado de rendimento em lipídios totais. Os valores observados são compatíveis com os valores apresentados na literatura para estes tipos de microalgas (BECKER, 1994). Porém, um dos inconvenientes encontrados nesta metodologia, para as microalgas testadas, foi que, após a adição da água no sistema, a separação das fases não ocorreu, dificultando a recuperação da fase lipídica extraída. Também, foi observado que a recuperação do solvente para o reuso em outra extração foi muito trabalhosa, por ocorrer uma mistura de solventes no meio. Desta maneira, foram realizados testes de extração com o extrator Soxhlet e extração sucessiva utilizando apenas um solvente, facilitando, assim, a recuperação do solvente para reutilizá-lo novamente no processo.

Os resultados de extração pelos métodos utilizando o Soxhlet e a extração sucessiva são apresentados na Tabela 25.

**Tabela 25** – Massa de lipídios totais/g biomassa seca obtida na extração do óleo das microalgas por dois métodos e três solventes diferentes.

Solvente *	g lipídios totais/g biomassa seca (%)			
	<i>Spirulina</i> sp.		<i>Scenedesmus</i> sp.	
	Extração sucessiva **	Soxhlet **	Extração sucessiva **	Soxhlet **
Hexano	2,98	4,80	5,14	5,96
Éter etílico	7,26	4,01	8,51	7,39
Diclorometano	4,64	3,64	17,46	10,19

\* Testes realizados em triplicata. \*\* média aritmética das triplicatas.

Para a microalga *Scenedesmus* sp. as maiores quantidades de lipídios totais por biomassa de alga foram observadas na extração com diclorometano, seguido de éter etílico e hexano. Por outro lado, para a microalga *Spirulina* sp. os métodos de extração

apresentaram resultados diferenciados frente aos solventes utilizados. Com o método de extração sucessiva, os melhores resultados foram obtidos com o uso do solvente éter etílico, seguido de diclorometano e hexano, já com o método Soxhlet, os melhores resultados foram obtidos com o uso do solvente hexano, seguido de éter etílico e com valores próximos ao diclorometano.

A partir do resultado do teste de extração por Soxhlet e pela extração sucessiva, realizados para as duas espécies de microalgas, observa-se uma ampla variação nos resultados de rendimento de lipídios totais por grama de biomassa seca. Vários fatores podem ter influenciado esta variação na porcentagem de lipídios extraída, como, por exemplo, a característica do solvente, a matéria-prima, a técnica de extração e as razões entre os solventes (SMEDES e ASKLAND, 1999; LEWIS *et al.*, 2000; BRIAN *et al.*, 2011).

Para a microalga *Scenedesmus* sp. houve um aumento de lipídios extraídos com o aumento da polaridade do solvente. Estes resultados indicam que a maioria dos lipídios na biomassa da *Scenedesmus* sp. é de natureza polar, o que está de acordo com os resultados obtidos com outras espécies de microalgas (D'OCA *et al.*, 2011). Da mesma forma, parece haver um equilíbrio entre os lipídios polares e apolares presentes na biomassa para a *Spirulina* sp.

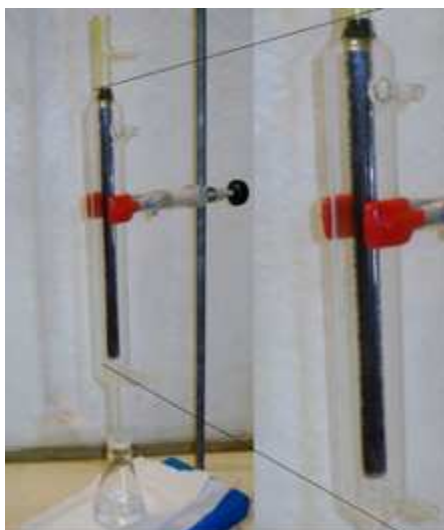
Diversos pesquisadores têm observado, em seus estudos, que há uma grande variação na eficiência de recuperação dos lipídios, para diferentes técnicas de extração e, também, para uma mesma técnica (LEWIS *et al.*, 2000; SMEDES e TORSTEN, 1999; BRIAN *et al.*, 2011). Lewis *et al.* (2000) descrevem ainda que, devido a esta grande variabilidade, a eficiência na extração dos lipídios de microrganismos necessita de uma escolha cuidadosa da metodologia. Assim, a determinação do melhor método de extração estudado requer, ainda, para ser completa, uma análise do perfil de ácidos graxos obtidos no extrato.

Conforme discutido, o extrato de lipídios totais é constituído de pigmentos, fosfolipídios, glicolipídios e lipídios neutros. Estes últimos são ligados covalentemente e podem ser extraídos dos tecidos por solventes apolares. Por outro lado, os lipídios polares, que estão ligados por forças eletrostáticas e pontes de hidrogênio, requerem solventes polares capazes de quebrar tais ligações e liberá-los (BRUM, 2009). Portanto, acredita-se que a polaridade do solvente seja um fator que pode ter ocasionado a variação na massa de lipídios totais extraídos por grama de amostra de microalga, ou



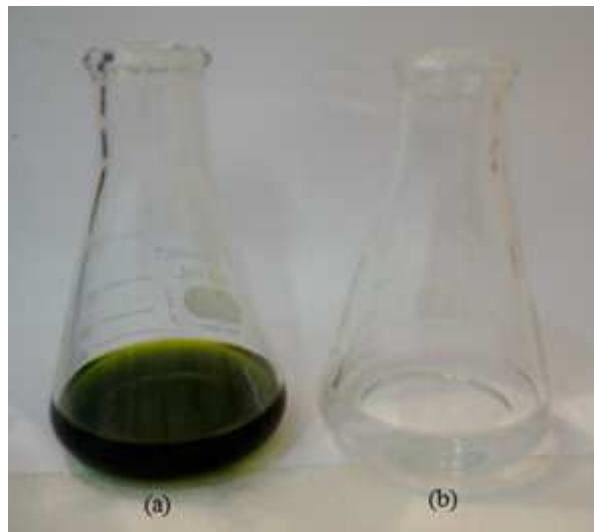
seja, os solventes diclorometano e éter etílico arrastaram uma quantidade maior de componentes polares, tais como pigmentos, fosfolipídios e glicolipídios.

Para determinar a quantidade real de lipídios neutros extraídos é necessário promover uma separação do extrato, obtendo-se, assim, apenas os lipídios neutros. A purificação dos lipídios pode ser realizada por processo de adsorção seletiva em coluna de leito fixo. Desta maneira, como alternativa, pode-se passar o extrato contendo os lipídios totais por uma coluna recheada com carvão ativado (BRIAN *et al.*, 2011). Assim, o extrato contendo os lipídios neutros foi diluído em hexano (1:20) ( $m_{\text{biomassa}}/mL$ ) e esta solução foi passada por uma coluna contendo um leito de 3 g de carvão ativado granulado, com 30 cm de altura, conforme mostrado na Figura 31.



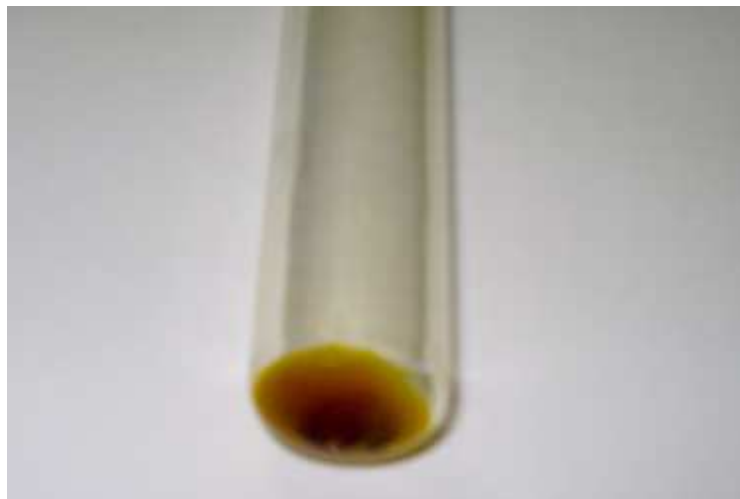
**Figura 31** – Coluna recheada com carvão ativado para separação dos lipídios neutros.

A Figura 32 apresenta o extrato, dissolvido em hexano, antes e depois de passar pela coluna de carvão ativado. Pode-se verificar, qualitativamente, a alta eficiência na remoção dos pigmentos do extrato contendo os lipídios totais, quando este foi passado pela coluna contendo carvão ativado.



**Figura 32** – Extrato diluído em hexano: a) antes; e b) depois de passar pela coluna recheada com carvão ativado.

O solvente hexano, utilizado para eluir o extrato pela coluna, foi recuperado em um evaporador rotativo e os lipídios neutros obtidos foram secos em estufa a 60 °C, para a completa remoção do solvente. Obteve-se, assim, um extrato lipídico, mostrado na Figura 33, semelhante ao encontrado por Brian *et al.* (2011) na extração de óleo de microalgas *D. tertiolecta* e *N. oculata*.



**Figura 33** – Lipídios neutros.

Nos experimentos realizados para quantificar os lipídios neutros obtidos pela extração por solvente foi observada uma grande variabilidade nos resultados para uma mesma batelada de amostra, indicando que nem todo lipídio alimentado no topo da coluna estava sendo recuperado, mesmo após lavagens sucessivas da coluna com o solvente hexano. Para analisar a hipótese de que a coluna estava adsorvendo fortemente lipídios, foram realizados experimentos (em triplicata), em que uma quantidade conhecida de óleo de soja diluída em hexano, na razão óleo:solvente de 1:100 (g/mL), foi passada pela coluna. Com isto, foi possível verificar se todo o óleo alimentado na coluna era recuperado. Os resultados obtidos neste experimento mostraram que aproximadamente 5% do óleo alimentado na coluna ficaram retidos na coluna de leito fixo, durante o processo de adsorção seletiva com carvão ativado. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 26.

**Tabela 26** – Quantidade de óleo retido na coluna de leito fixo de carvão ativado.

% de óleo retido		
Coluna A	Coluna B	Coluna C
5,28	5,13	4,20

As proporções de lipídios neutros retidas na coluna atingem valores superiores aos utilizados em testes de significância, contribuindo de forma significativa para variabilidade observada nos resultados. Outro fator, não menos importante, que pode ter contribuído para a variabilidade dos resultados está associado às pequenas quantidades de biomassa utilizadas nos experimentos e, conseqüentemente, de óleo.

A extração de lipídios a partir de biomassa algácea representa uma tarefa árdua, que exige, na maioria das vezes, abordagens novas ou modificadas, gerando desafios não encontrados anteriormente com sementes de outras oleaginosas (HU *et al.*, 2008). Geralmente, a metodologia utilizada na análise dos lipídios de algas é baseada na extração com solventes e análise gravimétrica do óleo extraído. Porém, esta técnica não foi ainda padronizada para a matéria-prima algácea. Desta maneira, de acordo com Xu e Mi (2011), os valores publicados na literatura devem ser considerados, na melhor das hipóteses, apenas como uma estimativa do conteúdo lipídico. De fato, a extração do óleo da biomassa de microalgas se tornou um grande “degrau” tecnológico, sendo que

grande parte dos trabalhos encontrados na literatura, que trazem o rendimento na extração de óleo da biomassa algácea, também não fazem nenhuma distinção entre lipídios totais e/ou neutros (MANDAL e MALLICK, 2009; SOARES *et al.*, 2009; SPECTOR *et al.*, 2008).

#### **V.4. CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO EXTRAÍDO**

##### **V.4.1. Perfil dos ácidos graxos no óleo das microalgas.**

Como a eficiência na extração de cada classe lipídico responde de forma diferente frente ao solvente, a determinação da composição lipídica é essencial para a validação e desenvolvimento dos métodos de extração (SMEDES e ASKLAND, 1999). Assim, o perfil dos ácidos graxos no óleo da biomassa algácea foi obtido por meio da extração com os solventes hexano, éter etílico e diclorometano, frequentemente utilizados na literatura (WAHLEN *et al.*, 2011; EHIMEN *et al.*, 2010; MIAO E WU, 2006, ZHANG *et al.*, 2003, XIONG *et al.*, 2008; SPECTOR *et al.*, 2008, UMDU *et al.*, 2009; MOLINA GRIMA *et al.*, 2003).

Existem três tipos principais de ácidos graxos que podem estar presentes em um triacilglicerídeo, os saturados (Cn: 0), os monoinsaturados (Cn: 1) e os poli-insaturados com duas ou três ligações duplas (Cn: 2,3). A porcentagem mássica destes compostos foi determinada utilizando-se a metodologia de derivatização do óleo, seguida de cromatografia em fase gasosa (VISENTAINER e FRANCO, 2006), para as microalgas *Scenedesmus* sp. e *Spirulina* sp.

##### **- *Scenedesmus* sp.**

Os resultados obtidos do perfil de ácidos graxos do óleo para a microalga *Scenedesmus* sp. são apresentados na Tabela 27.

**Tabela 27** - Perfil de ácidos graxos do óleo da microalga *Scenedesmus* sp.

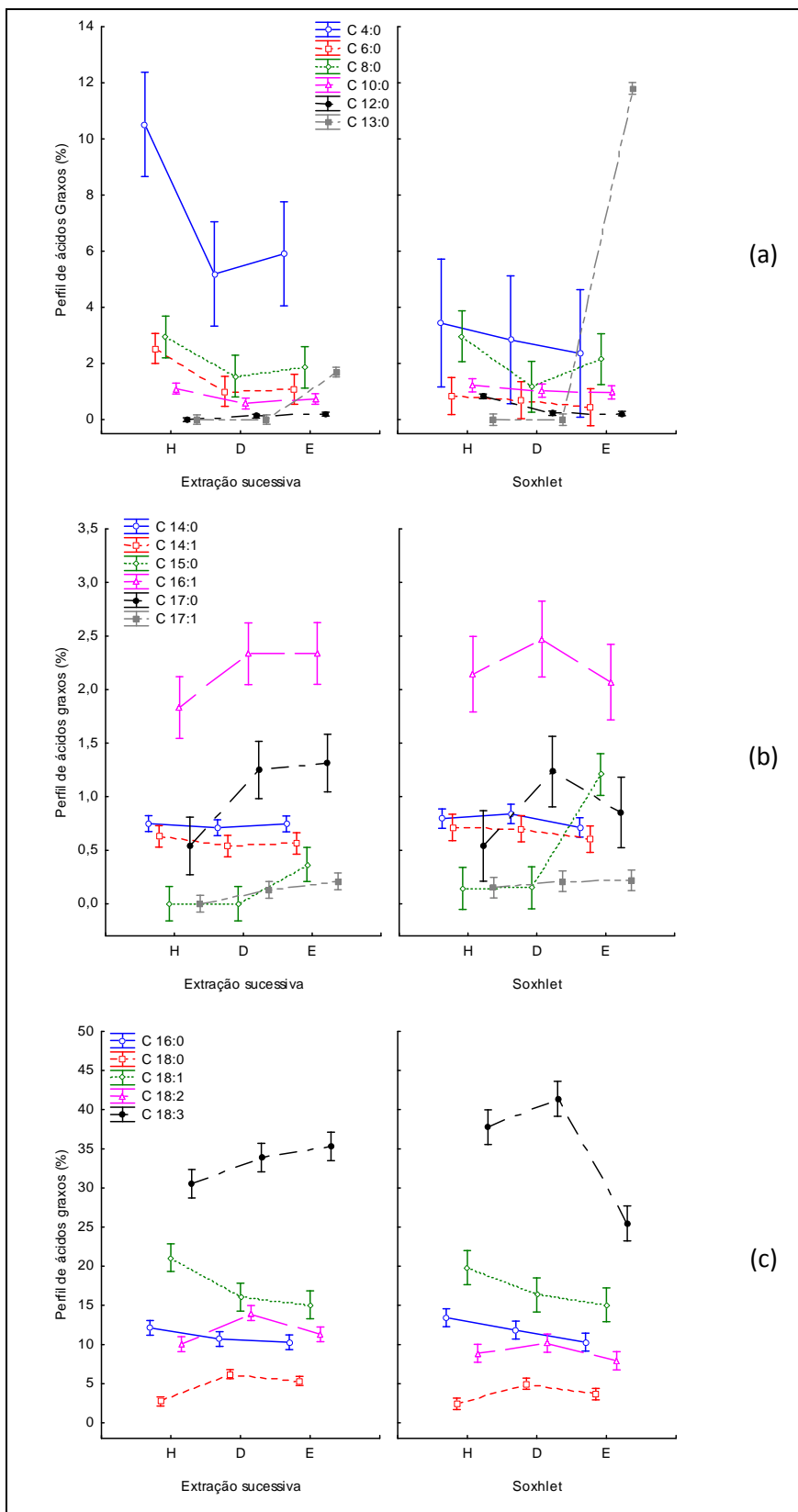
Ácidos Graxos	Hexano		Eter Etilico		Diclorometano	
	Extração sucessiva	Soxhlet	Extração sucessiva	Soxhlet	Extração sucessiva	Soxhlet
C 4:0	10,5 <sup>* **</sup>	3,44b	5,91b	2,36b	5,19b	2,84b
C 6:0	2,54a	0,84b	1,08b	0,44b	1,01b	0,70b
C 8:0	2,94a	2,97a	1,86a	2,15a	1,55a	1,17a
C 10:0	1,11a	1,22a	0,73b	0,97ab	0,57b	1,04ab
C 12:0	0,00c	0,83a	0,20b	0,22b	0,12bc	0,23b
C 13:0	0,00c	0,00c	1,70b	11,8a	0,00c	0,00c
C 14:0	0,75a	0,79a	0,75a	0,71a	0,71a	0,84a
C 14:1	0,63a	0,71a	0,56a	0,60a	0,54a	0,7a
C 15:0	0,00c	0,14bc	0,37b	1,21a	0,00c	0,15bc
C 16:0	12,1ab	13,4a	10,3b	10,3b	10,7b	11,8ab
C 16:1	1,83a	2,14a	2,34a	2,07a	2,33a	2,47a
C 17:0	0,54b	0,54b	1,31a	0,85ab	1,25a	1,23a
C 17:1	0,00b	0,15ab	0,21a	0,22a	0,13ab	0,21a
C 18:0	2,71c	2,42c	5,34a	3,66bc	6,21a	4,99ab
C 18:1	21,1a	19,8ab	15,07b	15,1b	16,0b	16,3b
C 18:2	10,1bc	8,87c	11,3b	7,9c	14,0a	10,2bc
C 18:3	30,5c	37,8ab	35,3b	25,5d	33,9bc	41,4a
C 20:1	0,81d	2,23c	2,53bc	12,8a	3,29b	2,91bc
C 20:3	0,00b	0,00b	0,00b	0,30a	0,00b	0,36a
C 20:4	0,00b	0,00b	0,92a	0,00b	0,47a	0,00b
C 20:5	0,00c	0,00c	0,87a	0,00b	0,43b	0,00c
C 22:0	0,00b	0,22a	0,00b	0,26a	0,00b	0,00b
C 22:1	1,85a	0,00c	0,40b	0,00c	0,74b	0,00c
C 22:2	0,00b	0,34a	0,00b	0,20a	0,00b	0,20a
C 24:0	0,00b	0,68a	0,58a	0,43a	0,53a	0,00b
C 22:6	0,00b	0,49a	0,39a	0,00b	0,26ab	0,25ab

\* Composição do óleo em porcentagem mássica.

\*\* Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente ao nível de 5%.

A partir do perfil de ácidos graxos da microalga *Scenedesmus* sp., observou-se que as maiores proporções de ácidos graxos extraídos (mais de 70%), em ordem decrescente, foram de C 18:3, C 18:1, C 16:0 e C 18:2. Quatro dos ácidos graxos (C 8:0; C 14:0; C 14:1 e C 16:1) não diferiram em relação ao método de extração (sucessiva ou Soxhlet). Assim, com o uso destes solventes foi observado que 10 ácidos graxos (C 4:0, C 6:0, C 8:0; C 14:0; C 14:1, C 16:0, C 16:1, C 18:1, e C 18:2 e C 18:3) apresentaram, em média, maiores concentrações mássicas em relação a todos os 27 ácidos graxos identificados na análise, conforme pode ser observado na Figura 34. De maneira geral, há a predominância de ácidos graxos insaturados, dentre os quais se destaca a elevada concentração de poli-insaturados (C 18:3). Assim, espera-se que o biodiesel produzido a partir do óleo destas microalgas apresente uma menor estabilidade oxidativa (RAMOS *et al.*, 2009). Por outro lado, haveria um ganho nas propriedades de fluxo a frio e viscosidade, devido à contribuição não desprezível no perfil de ácidos graxos dos componentes de cadeia menor (C4 a C8).

Para a determinação da melhor metodologia a ser utilizada no processo de extração do óleo *Scenedesmus* sp, sucessiva ou Soxhlet, fez-se necessária a análise do perfil de ácidos graxos em função do solvente utilizado. Desta maneira, quando foi utilizada a extração em Soxhlet observaram-se que as maiores proporções de ácidos graxos foram C 18:3 (37,8%), C 18:1 (19,8%) e C 16:0 (13,4%), quando foi utilizado hexano como solvente. Quando se utilizou éter etílico como solvente as maiores proporções de ácidos graxos foram C 18:3 (25,5%), C 18:1 (15,1%), C 20:1 (12,2%), C 13:0 (11,8%) C 16:0 (10,3%). Com a utilização de diclorometano como solvente as maiores proporções de ácidos graxos foram C 18:3 (41,4%), C 18:1 (16,3%), C 16:0 (11,8%) e C 18:2 (10,2%).



**Figura 34** – Perfil de ácidos graxos, em % mássica, do óleo da microalga *Scenedesmus sp.*: a) C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C12:0 e C13:0; b) C14:0, C14:1, C15:0, C16:1, C17:0 e C17:1; e c) C:16, C18:0, C18:1, C18:2 e C18:3. Os solventes utilizados foram: H – hexano, D – diclorometano e E – éter etílico.

A metodologia de extração sucessiva utilizando hexano como solvente apresentou as maiores proporções de ácidos graxos para C 18:3 (30,5%), C 18:1 (21,1%), C 16:0 (12,1%), C 4:0 (10,5%) e C 18:2 (10,0%). Quando foi utilizado éter etílico como solvente as maiores proporções de ácidos graxos foram C 18:3 (35,3%), C 18:1 (15,1%), C 18:2 (11,3%) e C 16:0 (10,3%). Com a utilização de diclorometano como solvente as maiores proporções de ácidos graxos foram C 18:3 (33,9%), C 18:1 (16,0%), C 18:2 (14,0%) e C 16:0 (10,7%).

A análise dos resultados apresentados acima, pelo teste de Tukey, mostrou que há uma influência do tipo de solvente nas quantidades relativas extraídas de cada ácido graxo, que compõem o perfil do óleo da microalga *Scenedesmus* sp. Assim, a metodologia de extração sucessiva levou a um perfil em que há a presença tanto de ácidos graxos de cadeia curta quanto os ácidos graxos predominantes na faixa de C 16 a C 18, característico da maioria das oleaginosas classicamente utilizadas para a produção de biodiesel. Conforme discutido anteriormente, este maior equilíbrio na composição do óleo de microalga *Scenedesmus* sp. pode levar a ganhos significativos na qualidade final do biodiesel. Portanto, pode-se sugerir que a melhor metodologia utilizada consiste na extração sucessiva, tendo como solvente o hexano.

Por outro lado, a Tabela 25 mostrou que as maiores quantidades de óleo de microalga *Scenedesmus* sp. foram obtidas com o solvente polar diclorometano, para as duas metodologias utilizadas. No entanto, cabe lembrar que junto com os lipídios neutros, também, foram extraídas quantidades significativas de pigmentos, característico da extração com este tipo de solvente (polar), o que pode levar a uma conclusão equivocada. De fato, os resultados apresentados na Figura 32 corroboram a presença significativa de pigmentos nas amostras de óleo extraídas. Embora os resultados da Figura 32 tenham sido obtidos com o solvente apolar hexano, de menor afinidade com os pigmentos, as amostras de óleo extraídas com os solventes polares diclorometano e éter etílico apresentaram uma coloração muito mais intensa, indicando, assim, uma quantidade de pigmentos muito maior do que a observada com hexano.

#### **- *Spirulina* sp.**

Os resultados obtidos para o perfil de ácidos graxos do óleo para a microalga *Spirulina* sp. são apresentados na Tabela 28.



**Tabela 28** - Perfil de ácidos graxos do óleo da microalga *Spirulina* sp.

Ácidos Graxos	Hexano		Éter etílico		Diclorometano	
	Extração sucessiva	Soxhlet	Extração sucessiva	Soxhlet	Extração sucessiva	Soxhlet
C4:0	6,52 <sup>* **</sup>	2,45b	2,70b	0,92b	2,64b	1,28b
C8:0	3,40a	0,00c	0,47bc	1,56b	0,62bc	1,84b
C10:0	38,7a	33,6ab	32,9ab	30,9ab	23,8b	31,1ab
C16:0	11,5b	15,6a	16,9a	15,9a	18,3a	16,0a
C16:1	0,00b	2,05ab	2,49a	3,52a	3,54a	3,47a
C18:0	2,66a	2,19ab	1,32b	1,64ab	2,16ab	1,67ab
C18:1	14,0a	7,27b	6,87b	6,80b	12,5a	6,98b
C18:2	13,7a	7,06b	6,92b	6,03b	14,6a	6,31b
C18:3	9,56c	28,0a	29,4a	30,9a	21,9b	30,4a
C20:3	0,00b	0,00b	0,00b	0,84a	0,00b	0,98a
C20:5	0,00c	1,79a	0,00c	0,97b	0,00c	0,00c

\* Composição do óleo em porcentagem mássica.

\*\* Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente ao nível de 5%.

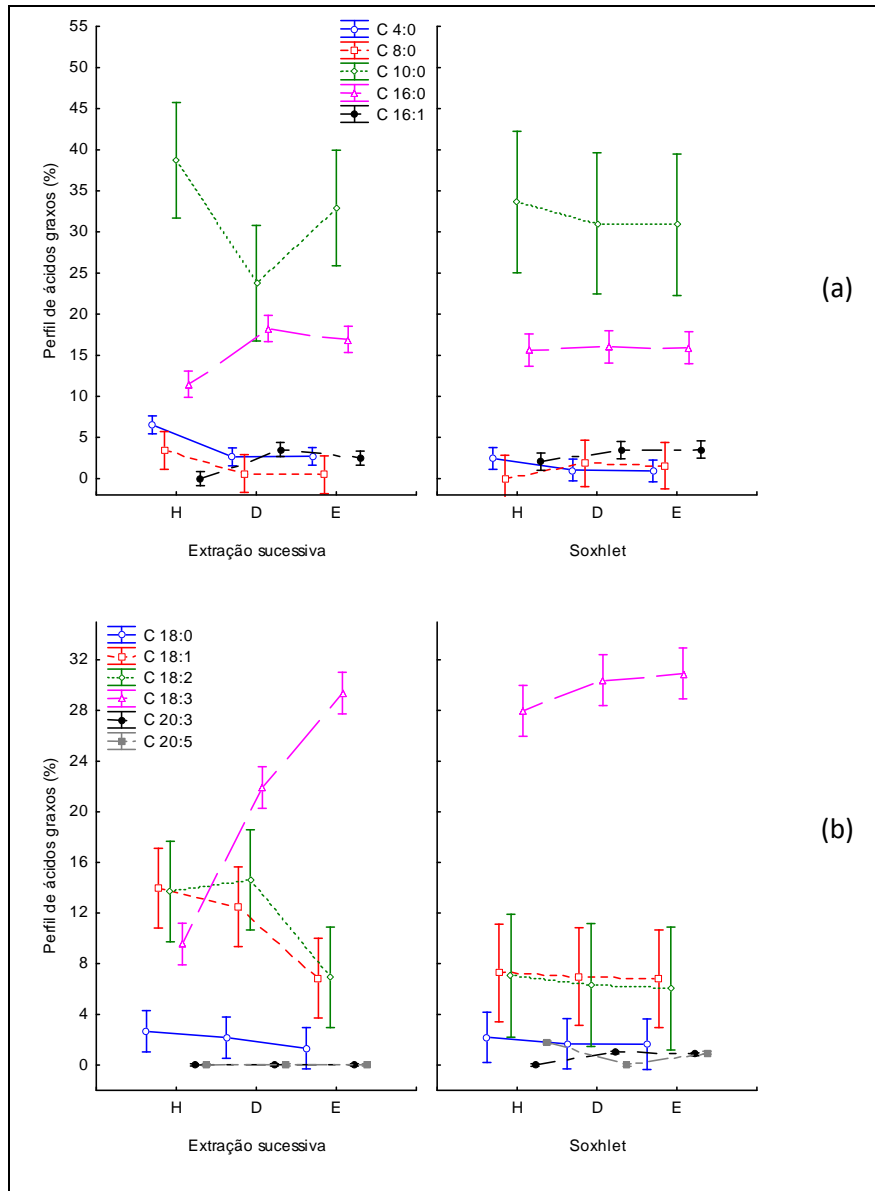
A partir do perfil de ácidos graxos da microalga *Spirulina* sp. (Tabela 28) observou-se que as maiores proporções de ácidos graxos extraídos (mais de 90%), em ordem decrescente, foram de C 10:0, C 18:3, C 16:0, C 18:1 e C 18:2. Assim, com o uso destes solventes foi observado que estes seis ácidos graxos apresentaram, em média, maiores concentrações mássicas em relação a todos os onze ácidos graxos identificados na análise, conforme pode ser observado na Figura 35. De maneira geral, há a predominância de ácidos graxos saturados, dentre os quais se destaca a elevada concentração de C 10:0. Assim, espera-se que o biodiesel produzido a partir do óleo desta microalga apresente maiores estabilidade oxidativa e número de cetano (RAMOS *et al.*, 2009), além de menor viscosidade. Em relação às propriedades de fluxo a frio torna-se difícil definir qual seria a tendência, pois o óleo apresenta-se mais saturado e, por outro lado, também possui quantidades maiores de ácidos graxos de cadeia menor.

Para a metodologia Soxhlet, não foi possível observar diferença significativa entre os solventes testados pelo teste de Tukey, conforme mostrado na Tabela 28 e na Figura 34. As maiores proporções de ácidos graxos obtidos, quando se utilizou hexano como solvente, foram C 10:0 (33,6%), C 18:3 (28,0%) e C 16:0 (15,6%). Quando éter

etílico foi utilizado como solvente as maiores proporções de ácidos graxos foram de C 10:0 (30,9%), C 18:3 (30,9%) e C 16:0 (15,9%) e quando foi utilizado diclorometano como solvente as maiores proporções de ácidos graxos foram de C 10:0 (31,0%), C18:3 (30,4%) e C 16:0 (16,0). Estes resultados mostram que, independente do solvente utilizado, apolar ou polar, a composição, ou seja, a quantidade relativa e tipo de ácidos graxos, foi praticamente a mesma, indicando o mesmo perfil para o óleo extraído.

Quanto à metodologia de extração sucessiva, o teste de Tukey mostrou que o solvente influenciou de forma significativa a extração lipídica, gerando perfis diferenciados para os diferentes solventes, conforme pode ser visto na Tabela 28 e na Figura 35. Para essa metodologia, então, as maiores proporções de ácidos graxos encontrados, quando se utilizou hexano como solvente, foram C 10:0 (38,7%), C 18:1 (14,0%), C 18:2 (13,7%), C 16:0 (11,5%) e C 18:3 (9,56%). Quando foi utilizado o solvente éteretílico, as maiores proporções de ácidos graxos foram C 10:0 (32,9%), C 18:3 (29,4%) e C 16:0 (16,9%) e quando foi utilizado o solvente diclorometano, as maiores proporções de ácidos graxos foram C 10:0 (23,8%), C 18:3 (21,9%), C 16:0 (18,3%), C18:2 (14,6%) e C 18:1 (12,5%). A partir destes resultados é possível observar que os solventes hexano e éteretílico levam a perfis semelhantes. No entanto, os resultados apresentados na Tabela 25 mostram que as quantidades de lipídios totais foram muito maiores para a extração sucessiva com o solvente éteretílico do que as alcançadas com os outros solventes utilizados e, também, maiores do que a metodologia utilizando Soxhlet. Portanto, pode-se sugerir que a melhor metodologia utilizada consiste na extração sucessiva, tendo como solvente o éteretílico.

Por fim, cabe destacar que o perfil de ácidos graxos obtidos tanto para a microalga *Scenedesmus* sp. como para a microalga *Spirulina* sp. estão de acordo com os resultados encontrados na literatura (RADMANN e COSTA, 2008; MORAIS e COSTA, 2008) para estas microalgas, indicando a compatibilidade de resultados obtida no presente trabalho, independente da metodologia utilizada na extração dos lipídios totais.



**Figura 35** – Perfil ácidos graxos, em % mássica, do óleo da microalga *Spirulina sp.*: a) C4:0, C8:0, C10:0, C16:0 e C16:1; e b) C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C20:3 e C20:5. Os solventes utilizados foram: H – hexano, D – diclorometano e E – éter etílico.

#### V.4.2. Acidez e massa molar.

A partir dos resultados do perfil dos ácidos graxos das microalgas estudadas, foram calculadas a massa molar média dos ácidos graxos obtidos e a massa molar média para o óleo. A Tabela 29 apresenta os valores obtidos para as microalgas *Scenedesmus sp.* e *Spirulina sp.*, além dos valores do índice de acidez, que é definido como o número de mg de hidróxido de potássio necessário para neutralizar os ácidos graxos livres em

uma grama de óleo. Esta propriedade, geralmente, é importante na definição da rota de obtenção de biodiesel.

**Tabela 29** – Características do óleo obtido das microalgas estudadas.

Microalga	Massa molar média dos ácidos graxos (g/mol)	Massa molar média do óleo (g/mol)	Acidez (mg KOH/g)	Acidez (%)
<i>Scenedesmus</i> sp.	263	827	4,9	2,5
<i>Spirulina</i> sp.	235	742	14,3	7,2

A partir dos dados apresentados na Tabela 29, pode-se observar que a massa molar média para o óleo da microalga *Scenedesmus* sp. é mais alta do que aquela obtida para o óleo de *Spirulina* sp., o que reflete a maior proporção de ácidos graxos de cadeia mais curta apresentado por esta microalga, conforme discutido anteriormente. Além disso, verifica-se que a acidez do óleo das microalgas *Scenedesmus* sp. e *Spirulina* sp. é maior do que 0,5% (m/m). Esta característica de acidez indica que o melhor processo para a produção de ésteres, visando à produção de biodiesel, é via esterificação/transesterificação ácida, na qual pode ser utilizado como catalisador o ácido clorídrico, conforme sugerido por Lewis *et al.* (2000).

## V.5. PRODUÇÃO DE ÉSTERES A PARTIR DE MICROALGAS

Para a produção de ésteres foram realizadas as reações de esterificação/transesterificação ácida do óleo de biomassa extraído por solvente e, também, as reações *in situ* com biomassa algácea seca.

A biomassa utilizada em todas as reações foi cultivada em ambiente controlado. Devido à necessidade de vários cultivos para se obter uma quantidade suficiente de biomassa seca, esta foi macerada manualmente, até formar um pó fino, e posteriormente misturada, formando um lote único de biomassa seca.

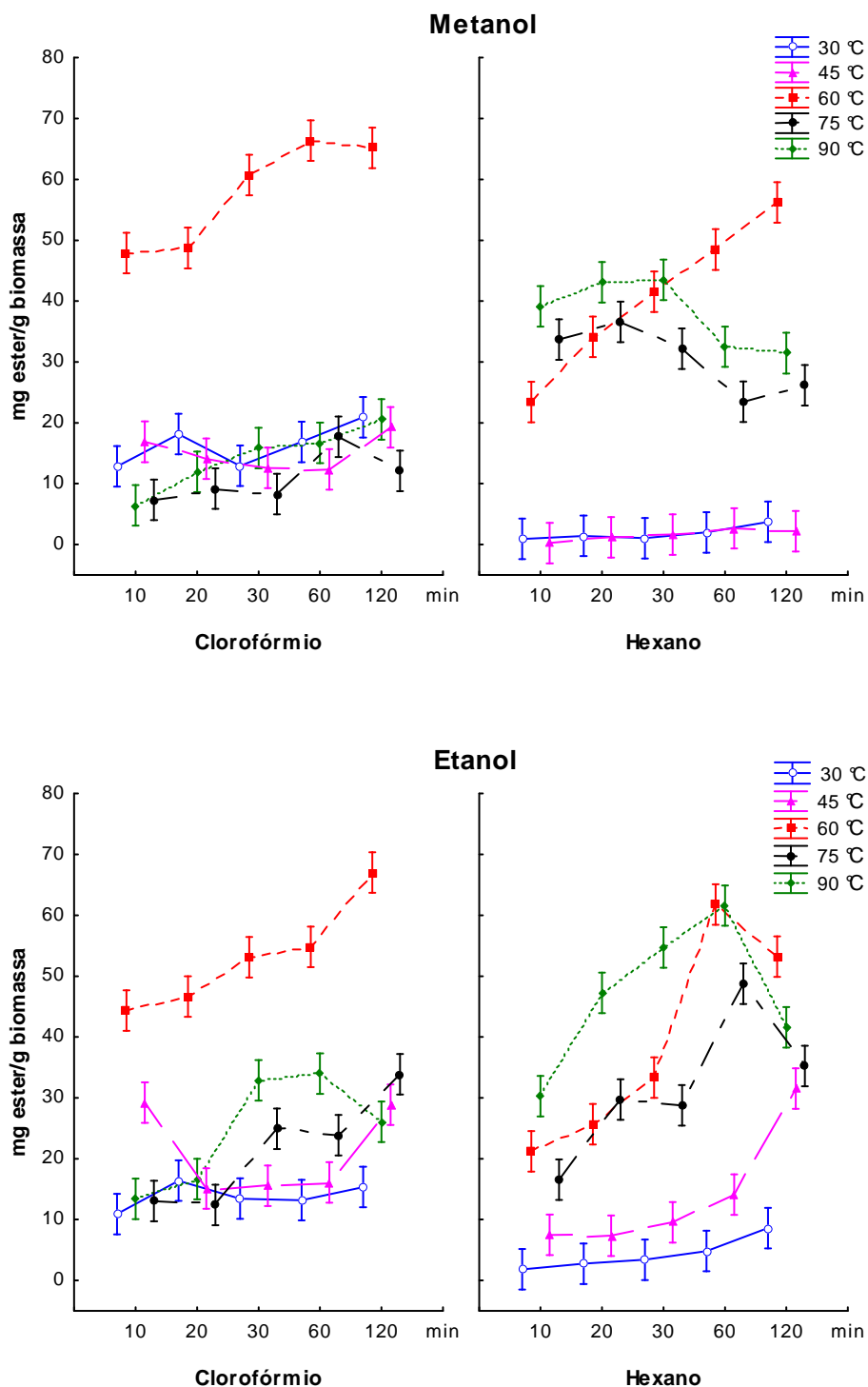
### V.5.1. Reação *in situ*

O processo de produção de ésteres *in situ* pode ser mais vantajoso que os processos clássicos devido, principalmente, à redução do tempo de reação e à diminuição do volume de solventes utilizado, que esta rota oferece (LEWIS *et al.*, 2000; HAAS e WAGNER, 2011; EHIMEN *et al.*, 2010). Além disso, tem sido relatado o aumento na recuperação de ácidos graxos, por meio das técnicas de transesterificação/esterificação ácida direta, para diversas matérias-primas (HAAS *et al.*, 2007).

Desta maneira, foi avaliada neste trabalho a produção de ésteres via transesterificação e/ou esterificação ácida *in situ* para a biomassa das microalgas *Scenedesmus* sp. e *Spirulina* sp. Para o estudo foram avaliados dois álcoois (etanol e metanol) e dois solventes (hexano e clorofórmio), baseado no procedimento para a síntese de ésteres *in situ* proposto por Lewis *et al.* (2000). A reação foi realizada em cinco temperaturas diferentes, quais sejam: 30, 45, 60, 75 e 90 °C. Também, foi avaliado o tempo de reação, sendo estes de 10, 20, 30, 60 e 120 minutos, conforme descrito no capítulo anterior.

#### - *Scenedesmus* sp.

A Figura 36 mostra a quantidade de éster (mg) em relação à quantidade de biomassa seca utilizada como uma função do tempo de reação, para o diferentes álcoois e solventes utilizados. Visando à discussão dos resultados a massa de ésteres produzidos (mg) por massa de biomassa seca (g) será chamada de rendimento em ésteres.



**Figura 36** – Quantidade de éster metílico/etílico obtido na reação *in situ* com *Scenedesmus sp.* em função do tempo de reação, para os solventes clorofórmio e hexano, em diferentes temperaturas.

A partir dos resultados obtidos nas reações *in situ*, para a microalga *Scenedesmus sp.*, observou-se que, quando foi utilizado o solvente clorofórmio, os rendimentos em ésteres mais altos (67,04 e 66,39 mg de éster/g biomassa para etanol e

metanol, respectivamente) foram obtidos para a temperatura de 60 °C, independente do álcool utilizado. Quando o solvente utilizado foi o hexano, os rendimentos mais altos, também, foram obtidos na temperatura de 60 °C (61,79 e 60,74 mg de éster/g de biomassa para etanol e metanol, respectivamente), porém, somente para tempos superiores a 60 minutos de reação. Para esse mesmo solvente, foi ainda observado que temperaturas inferiores a 60 °C levaram a baixos rendimentos em ésteres (1 e 1,7 mg de éster/g de biomassa para metanol e etanol, respectivamente), independentemente do álcool ou do tempo da reação. O aumento do tempo de reação de 60 para 120 minutos não acarretou aumento no rendimento em ésteres, com exceção às reações realizadas a 60 °C, combinando metanol e hexano ou etanol e clorofórmio.

Com exceção aos rendimentos em ésteres obtidos a 60 °C, nas demais condições o aumento da temperatura leva a um aumento nos rendimentos em ésteres, sendo isto mais evidente para a combinação etanol e clorofórmio. O fato das reações a temperaturas acima de 60 °C não mostrarem rendimentos em ésteres mais altos se deve, aparentemente, a problemas reacionais relacionados com a volatilidade dos reagentes. Qualitativamente, notou-se que no acompanhamento das reações nas temperaturas de 75 e 90 °C houve uma incidência maior de vazamentos nos tubos de reação. Quando isto acontecia, o tubo era descartado e substituído, porém, pequenos vazamentos podem ter sido imperceptíveis e ter influenciado as reações. Além disso, outro fator que pode ser levado em consideração é o fato de que nessas reações uma parte significativa dos reagentes se encontrava na fase vapor. Como a reação ocorre devido ao contato da biomassa (sólida) com o reagente (líquido), este menor contato entre as fases pode ter conduzido, conseqüentemente, a uma diminuição no rendimento em ésteres.

Com o objetivo de encontrar qual a melhor combinação álcool, solvente, temperatura e tempo que possa levar a rendimentos mais altos em ésteres, a partir de biomassa de *Scenedesmus* sp., foi realizada uma análise de variância fatorial, levando-se em conta estes quatro fatores, com posterior teste de médias.

Nas reações realizadas com a microalga *Scenedesmus* sp., a análise de variância fatorial revelou que houve interação entre os quatro fatores ( $p < 0,05$ ): temperatura, tempo, álcool e solvente. Assim, a interação entre os fatores foi utilizada para o teste de médias (*post-hoc*). A partir do teste de Tukey, aplicado para a produção de ésteres nas reações *in situ*, seis combinações de interações levaram, em média, aos rendimentos em ésteres por biomassa algácea mais altos, conforme mostrado na Tabela 30. Embora suas médias apresentem valores numericamente diferentes, as interações não apresentaram

diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ), podendo qualquer uma delas ser indicada para a produção de ésteres a partir de biomassa algácea seca, sem a perda significativa no rendimento em ésteres.

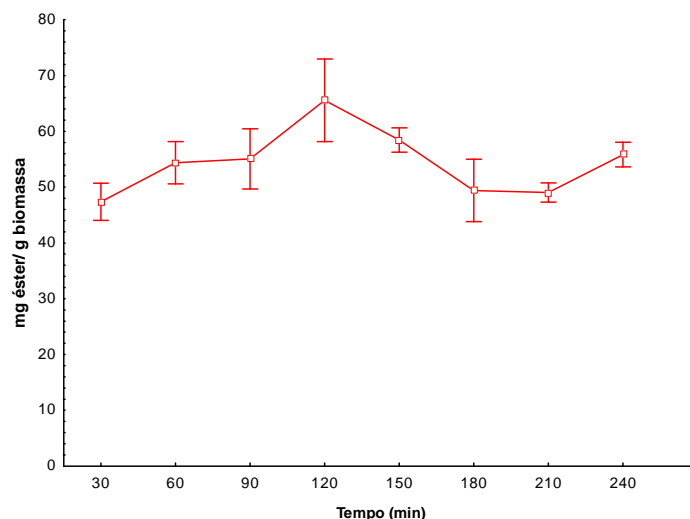
**Tabela 30** – Valores mais altos de rendimentos em ésteres por grama de biomassa de *Scenedesmus* sp.

Álcool	Solvente	Temperatura (°C)	Tempo (min)	mg éster/g biomassa
Etanol	clorofórmio	60	120	67,04 ± 1,67
Metanol	clorofórmio	60	60	66,39 ± 1,12
Metanol	clorofórmio	60	120	65,19 ± 1,80
Etanol	hexano	60	60	61,79 ± 0,59
Etanol	hexano	90	60	61,60 ± 0,22
Metanol	clorofórmio	60	30	60,70 ± 1,18

Pode-se observar, também, que ambos os álcoois utilizados podem levar a rendimentos altos, bem como ambos os solventes, porém, suas combinações exigem condições de temperatura e tempos específicos para a reação (Tabela 30). Deste modo, os melhores rendimentos em ésteres ocorreram a temperaturas de reação de 60 °C, excetuando-se a reação realizada com etanol e hexano a 90 °C, durante 60 minutos. Somente uma combinação entre os fatores mostrou rendimento mais alto com tempo de 30 minutos, que foi a reação realizada utilizando metanol e clorofórmio, a temperatura de 60 °C, durante 30 minutos.

Em particular, a combinação etanol e clorofórmio parece conduzir a rendimentos em ésteres levemente superiores (67,04 mg de éster/ g biomassa), para os tempos de reação maiores. Porém, para verificar esta hipótese, foram realizadas outras reações para esta condição, considerando-se um tempo final de reação de 4 horas. O resultado obtido neste teste é apresentado na Figura 37. Assim, verifica-se que o rendimento em ésteres etílicos mais alto foi obtido com um tempo de reação de 120 minutos.





**Figura 37** – Massa de éster etílico produzida, por tempo de reação *in situ*, para a microalga *Scenedesmus sp.*, utilizando o solvente clorofórmio.

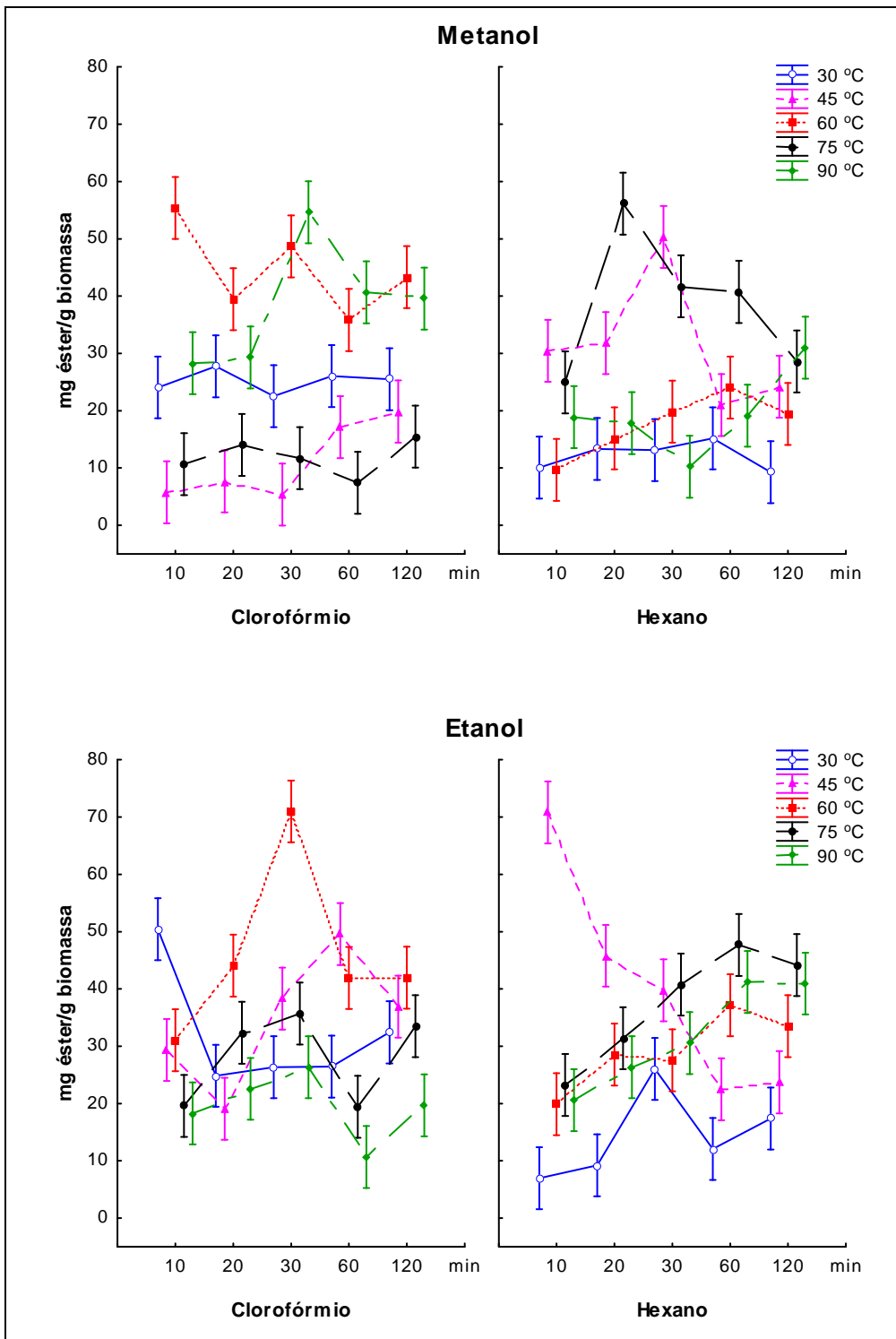
#### - *Spirulina sp.*

A Figura 38 mostra a massa de éster (mg) em relação à quantidade de biomassa seca utilizada como uma função do tempo de reação, para os diferentes álcoois e solventes utilizados.

Ao contrário do que foi observado para a microalga *Scenedesmus sp.*, a reação *in situ* para a microalga *Spirulina sp.* não apresentou nenhuma tendência com o aumento da temperatura. Aparentemente, as reações com metanol apresentaram-se mais estáveis ao longo do tempo do que quando utilizado o etanol, com rendimentos em ésteres próximos nos diversos tempos de reação. Na combinação metanol e clorofórmio as temperaturas que conduziram aos maiores rendimentos em ésteres foram a 60 e 90 °C (59,4 e 57,0, respectivamente). Quando foi utilizado o solvente hexano os melhores rendimentos em ésteres foram obtidos nas temperaturas de 45 e 75 °C (70,8 e 56,4, respectivamente). Com a utilização de metanol, a indicação dos tempos necessários para a reação é dependente do solvente e da temperatura utilizados, podendo estes ser de 10 ou 120 minutos, quando utilizado clorofórmio a 60 °C, de 20 minutos para hexano a 75 °C, de 30 minutos para clorofórmio a 90 °C e de 60 minutos para hexano a 60 °C, conforme pode ser verificado na Figura 38.

Nas reações realizadas com etanol e clorofórmio não foram observados padrões nítidos de influência da temperatura. No entanto, os melhores rendimentos em ésteres foram observados para a temperatura de 60 °C (Figura 38). Além disso, também é

possível observar rendimentos em ésteres altos a 30 °C, após decorridos somente 10 minutos da reação.



**Figura 38** – Massa de éster metílico/etílico obtido na reação *in situ* com *Spirulina sp.* em função do tempo de reação, para os solventes clorofórmio e hexano em diferentes temperaturas.

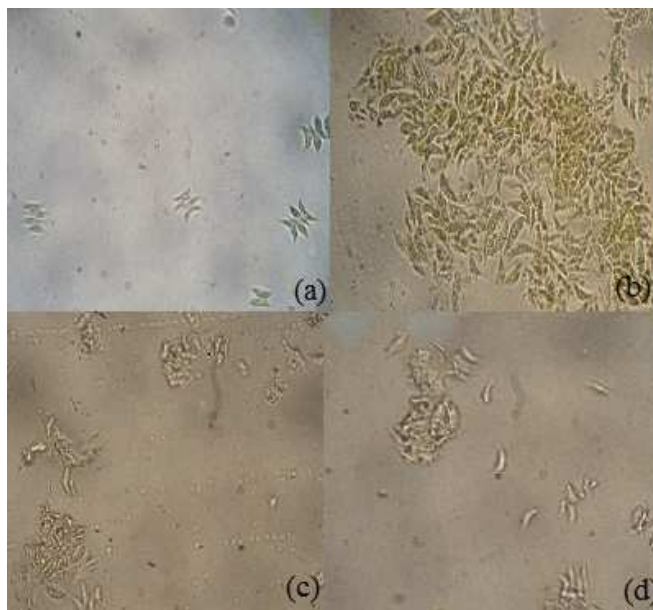
Quando utilizado etanol e hexano foi observado um aumento do rendimento em éster com o aumento do tempo da reação, excetuando-se as reações a temperatura de 45 °C, que apresentaram os melhores rendimentos em tempos de reação menores.

Para a microalga *Spirulina* sp. a análise de variância fatorial também mostrou que houve interação entre os quatro fatores ( $p < 0,05$ ): temperatura, tempo, álcool e solvente. Desta forma, foram utilizadas as interações entre os fatores para o teste de médias. A partir do teste de Tukey aplicado aos rendimentos em ésteres nas reações *in situ* com *Spirulina* sp., pode-se observar que os melhores rendimentos foram obtidos com as combinações etanol e clorofórmio a 60 °C, durante 30 minutos, e etanol e hexano a 45 °C, durante somente os 10 primeiros minutos de reação. Estes resultados são apresentados na Tabela 31. Embora não haja diferença estatística entre as duas condições apresentadas na Tabela 31, a condição de reação utilizando a combinação etanol e hexano, na temperatura de 45 °C e tempo de 10 min parecer ser mais atrativa.

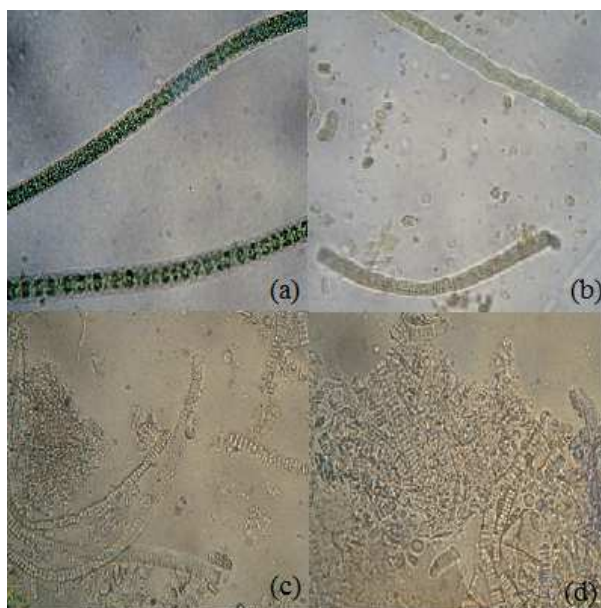
**Tabela 31** – Valores mais altos de rendimentos em ésteres por grama de biomassa de *Spirulina* sp.

Álcool	Solvente	Temperatura (°C)	Tempo (min)	mg éster/g biomassa
Etanol	clorofórmio	60	30	70,99 ± 2,10
Etanol	hexano	45	10	70,83 ± 1,15

É notável a diferença de comportamento observado nas reações de esterificação *in situ* para as duas microalgas analisadas. De acordo com Lewis *et al.* (2000), esta diferença pode ser devido à estrutura celular dos dois tipos de biomassa. Como já visto, a microalga *Scenedesmus* sp. é uma alga verde e a colônia sempre é formada por 2 ou 4 células, ou mais, enquanto a *Spirulina* sp. é uma alga verde-azulada formada por filamentos. As Figuras 39 e 40 trazem as fotos microscópicas das microalgas *Scenedesmus* sp e *Spirulina* sp, respectivamente, antes e após a reação *in situ*. É possível observar, comparando-se as fotos microscópicas para ambas as condições, que durante a reação há o rompimento da parede celular das microalgas.



**Figura 39** – Microalga *Scenedesmus* sp.: a) no cultivo; b) biomassa seca; c) 10 min de reação, utilizando etanol e clorofórmio a 60 °C; e d) 120 min de reação.



**Figura 40** – Microalga *Spirulina* sp.: a) no cultivo; b) biomassa seca; c) 10 min de reação, utilizando etanol e clorofórmio a 60 °C; e d) 120 min de reação.

Ficou evidente, para as duas microalgas, a diferença no perfil das reações quando se utilizou o solvente hexano ou o clorofórmio para um mesmo álcool. A adição de um solvente no processo, de acordo com Xu e Mi (2011), é um dos pontos chaves para o sucesso da transesterificação *in situ*, visto que este ajuda a formar um sistema homogêneo entre o óleo da biomassa, o álcool e o catalisador. Os autores relatam, ainda,

que a miscibilidade dos triacilglicerídeos no solvente permite uma extração eficiente do óleo das microalgas e que a miscibilidade do solvente no álcool favorece que a reação *in situ* ocorra em um ambiente homogêneo, sem a necessidade de agitação. Em concordância com estas observações, Wahlen *et al.* (2011) também verificaram que o solvente pode auxiliar na extração da matéria-prima e, assim, aumentar a produção de ésteres durante a transesterificação *in situ*.

No processo de transesterificação *in situ* o álcool desempenha um papel vital, atuando na extração de lipídios da biomassa e, também, na conversão dos ésteres de ácidos graxos (STAMENKOVIC *et al.*, 2011). Nas reações *in situ*, observa-se que quando foi utilizado o etanol a cinética da reação foi mais lenta, dados estes condizentes com os encontrados na literatura (DEMIRBAS, 2005; PISARELLO *et al.*, 2010). Tal fato pode ser explicado pela maior reatividade dos radicais metóxidos, quando comparados a radicais etóxidos, pois, como o comprimento da cadeia de carbono aumenta para o etanol, a nucleofilicidade do ânion alcóxido diminui, levando a uma diminuição da sua reatividade (STAMENKOVIC *et al.*, 2011).

Porém, o metanol foi mais ativo que o etanol apenas nas temperaturas de 30, 45 e 60 °C. Para as reações realizadas a 75 e 90 °C o etanol se mostrou mais ativo. Devido ao ponto de ebulição do metanol ser mais baixo do que o do etanol, este pode ser usado em temperaturas mais elevadas sem um aumento significativo da pressão autógena do sistema, em comparação ao metanol. Segundo Pisarello *et al.* (2010), a taxa de reação de esterificação com etanol a 70 °C apresentou um aumento significativo, seguindo uma curva de conversão em função tempo quase igual à do metanol a 60 °C.

Pode ser observado que nas reações *in situ* com a biomassa algácea (Figuras 36 e 38), a produção de ésteres passa por um máximo seguido de uma diminuição e estabilização com o tempo de reação. Isto indica que outras reações ocorrem, além da reação de transesterificação/esterificação ácida. É conhecido que a reação para a formação de ésteres via catálise ácida é reversível, porém, a quantidade de álcool em excesso tende a limitar a reação reversa, deslocando o sentido da reação para a formação dos produtos (Figura 9). Porém, nestas condições de reação, em que se tem triacilglicerídeos, água, álcool e catalisador ácido num mesmo sistema, as reações secundárias, como a hidrólise dos triacilglicerídeos juntamente com a hidrólise dos ésteres produzidos, podem estar acontecendo. Na reação de hidrólise dos triacilglicerídeos, di- e monoacilgliceróis e ácidos graxos livres são formados, enquanto na reação de hidrólise dos ésteres, ácido carboxílico e álcool são produzidos. Até que

este equilíbrio seja atingido no sistema, conseqüentemente, a cinética de reação de esterificação sofre alterações em função do tempo, como pode ser visto claramente no comportamento das reações realizadas neste trabalho (Figuras 36 e 38) (BRUICE, 2006; PISARELLO *et al.*, 2010).

### V.5.2. Reação de esterificação do óleo de microalgas

Devido à dificuldade de se obter uma quantidade suficiente de óleo para o processo de reação de esterificação/transesterificação ácida do óleo em condições clássicas. Além disso, como o óleo das microalgas apresentou alta acidez, a produção de ésteres a partir do óleo de microalgas foi realizada em uma única temperatura (100 °C), num tempo fixo de 3 horas de reação, utilizando-se etanol, 3% m/m de ácido clorídrico e razão molar álcool:óleo de 20.

A massa de ésteres etílicos obtida na reação do óleo de microalgas, via esterificação/transesterificação ácida, nas condições descritas, é mostrada na Tabela 32.

**Tabela 32** – Ésteres etílicos produzidos a partir do óleo de microalga.

Microalga	mg éster/g óleo *	mg éster/g biomassa **
<i>Scenedesmus</i> sp.	4,99 ± 0,10	0,3
<i>Spirulina</i> sp.	23,20 ± 5,23	1,1

\* Reações realizadas em duplicata. \*\* baseado nos dados da Tabela 25.

Observa-se que houve um rendimento em ésteres etílicos muito maior para a reação a partir do óleo da microalga *Spirulina* sp. do que para o óleo da microalga *Scenedesmus* sp. Porém, considerando o valor teórico de lipídios totais obtidos na extração, conforme mostrado na Tabela 25, o rendimento teórico de ésteres a partir da reação *in situ* é de 10 a 15 vezes maior do que no processo de extração seguido de esterificação, obtido em tempo de reação menor. Estes resultados estão de acordo com valores encontrados na literatura (LEWIS *et al.*, 2000; EHIMEN *et al.*, 2010).

De acordo com Wahlen *et al.* (2011), no processo de esterificação *in situ*, não apenas os triacilglicerídeos e ácidos graxos livres, mas também parte da molécula de fosfolipídios, podem reagir com o álcool formando ésteres, fornecendo desta maneira

rendimentos em ésteres mais altos, quando comparados aos processos convencionais que utiliza óleo neutro de microalga.

A abordagem da transesterificação/esterificação *in situ* para a formação de ésteres, visando à produção biodiesel a partir de biomassa de microalgas, incorpora uma dinâmica não convencional no uso desta matéria-prima. O processo de transesterificação/esterificação *in situ* apresentou resultados promissores e pode vir a despontar como uma nova rota para a produção de biodiesel. Desta maneira, fica evidente a importância no desenvolvimento desta tecnologia, que pode conduzir a uma rota economicamente competitiva em relação às abordagens existentes e/ou às mais recentes, dentro da indústria de combustíveis renováveis (HAAS e WAGNER, 2011).

# CAPÍTULO VI

## CONCLUSÕES

O cultivo de microalgas em ambiente com controle de temperatura forneceu uma produtividade de biomassa maior do que quando o cultivo foi realizado sem este controle. Nessa última forma de cultivo, foi possível atingir elevadas concentrações de biomassa, porém demandando maior tempo de cultivo. Com isso, é possível evidenciar que diferentes formas de cultivo podem ser utilizadas para a produção de biomassa algácea. Na recuperação da biomassa da solução, a adição de flocculante possibilitou máxima recuperação da biomassa celular, com menor perda das células.

Na extração do óleo, foi observado que, a polaridade do solvente é um fator que pode ter ocasionado a variação na quantidade de lipídios totais extraídos por grama de amostra de microalga, assim, a determinação do perfil dos ácidos graxos no óleo da biomassa algácea foi necessária para a validação e desenvolvimento do método de extração. Para as duas microalgas estudadas a metodologia de extração sucessiva mostrou-se melhor, sendo que, para a microalga *Scenedesmus* sp., o solvente hexano, levou a um perfil de ácidos graxos que podem levar a ganhos significativos na qualidade final do biodiesel. Já, para a microalga *Spirulina* sp., os solventes hexano e éter etílico levaram a perfis semelhantes.

Com relação à retirada dos pigmentos no extrato de lipídios totais, o uso da coluna com carvão ativado foi eficiente, fornecendo um óleo límpido na cor amarelo claro. No entanto foi constatado que um pouco de óleo fica retido na coluna.

De acordo com a acidez obtida para o óleo das microalgas *Scenedesmus* sp e *Spirulina* sp., a produção de ésteres a partir destes foi utilizando catalisadores ácidos.

Nas reações *in situ* para a microalga *Scenedesmus* sp., os melhores rendimentos foram conseguidos com o solvente clorofórmio na temperatura de 60 °C, independente



do uso de etanol ou metanol como álcool no processo. O aumento do tempo da reação de 60 para 120 minutos não apresentou maiores rendimentos, sendo então o tempo de reação de 60 minutos suficiente para se obter os maiores rendimentos.

A reação *in situ* para a microalga *Spirulina* sp. não apresentou nenhuma tendência com o aumento da temperatura. Quando o metanol foi utilizado as reações se apresentaram mais estáveis ao longo do tempo, com rendimento de ésteres semelhantes nos diversos tempos de reação. A grande diferença encontrada, no perfil das reações de transesterificação/esterificação ácida *in situ*, entre as microalgas analisadas, pode ser devido à estrutura celular dos dois tipos de biomassa.

A produção de ésteres etílicos a partir do óleo da biomassa de microalgas, via esterificação/transesterificação ácida, forneceu baixos rendimentos, sendo que a reação *in situ* apresentou-se mais vantajosa devido à redução de custos relacionados ao tempo de reação e ao uso de solventes quando comparada ao processo de extração e/ou purificação do óleo, sendo evidenciados na reação *in situ* elevados rendimentos em ésteres.

# CAPÍTULO V

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, M. R., COSTA, J. A. V. Culture of Microalga *Spirulina platensis* in Alternative Sources of Nutrients. *Ciência e agrotecnologia*, Lavras, 2008, Vol. 32, n° 5, p.1551-1556.

ANDRADE, M. R., CAMERINI, F. V., COSTA, J. A. V. Perda Química de Carbono e Cinética do Crescimento Celular em Cultivos de *Spirulina*. *Química Nova*, 2008, Vol. 31, n°. 8, p. 2031-2034,

ANP – Agência Nacional do Petróleo, disponível em: [www.anp.gov.br](http://www.anp.gov.br). Consultado em: 09/2011.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Boletim Mensal do Biodiesel, disponível em: [www.anp.gov.br](http://www.anp.gov.br). Consultado em: 11/2011

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

BENEMAN, J. R. Microalgae Products and Production: an Overview. *Journal of Industrial Microbiology*, 1990, Vol.31, n° 5, p.247-256,

- BERTOLDI, F. C. SANT'ANNA, E., OLIVEIRA, J. L. B. Revisão: Biotecnologia de Microalgas. *B. CEPPA*, Curitiba, 2008, Vol. 26, n. 1, p. 9-20
- BERTOLIN, T. B. P., COSTA, J. A. V., BERTOLIN, T. E., COLLA, L. M., HEMKEMEIER, M. Cultivo da cianobactéria *Spirulina platensis* a partir de efluente sintético de suíno. *Ciências e Agrotecnologia*, Lavras, 2005, Vol. 29, n.º. 1, 118-125.
- BICUDO, C. E. M. e MENEZES, M. Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil: Chave para Identificação e Descrições. São Carlos: Editora RiMa, 2005, 580p.
- BIODIESEL NO BRASIL, 2008, disponível em: [www.biodieselbr.com](http://www.biodieselbr.com). Acesso em 11/2008.
- BLIGH E G., DYER W J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959, 37: 911-917.
- BRIAN, J. G. The economics of producing biodiesel from algae. *Renewable Energy*, 2011, Vol. 36, 158-162.
- BRUM, A. A. S., ARRUDA, L. F., REGITANO-D'ARCE, M A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. *Química Nova*, 2009, Vol. 32, n.º. 4, 849-854.
- BRUCE, A. Y. 2006, Organic Chemistry. Four Edition, Pearson education do Brasil, 1228p.
- CARTILHA DO BIODIESEL – SEBRAE, 2008, disponível em: [www.biodieselbr.com](http://www.biodieselbr.com), acesso em 11/2008.
- CHISTI, Y. Biodiesel from Microalgae. *Biotechnology Advances*, 2007, Vol. 25, 294–306.

- COZZA, K. L.; COSTA, J. A. V. Lípidios em Spirulina. *Vetor*, 2000, Vol. 10, p.53-68.
- CRESTANA, S. 2005, Matérias-primas para produção do biodiesel: priorizando alternativas. Disponível em: <http://www.embrapa.br>. Consultado em 11/2009.
- DANTAS, M. B. 2006, “Obtenção, Caracterização e Estudo Termoanalítico de Biodiesel de Milho (*Zea mays L.*)”. Dissertação de MSc – Universidade Federal do Paraíba-João Pessoa-PB.
- DEMIRBAS, A. Biodiesel Production from Vegetable Oils Via Catalytic and Non-Catalytic Supercritical Methanol Transesterification Methods. *Progress in Energy and Combustion Science*, 2005, Vol. 31, p. 466–487.
- DEMIRBAS A, Progress and Recent Trends in Biodiesel Fuels, *Energy Conversion and Management*, 2008, doi:10.1016/j.enconman.2008.09.001.
- DERNER, R. B., OHSE, S., VILLELA, M., CARVALHO, S. M., FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, Santa Maria, 2006, Vol.36, n°. 6, 1959-1967.
- D’OCA, M.G.M., VIÊGAS, C. V. e MACHADO, D. O. Extração de Óleo da Microalga *Chlorella pyrenoidosa* Visando à Produção de Biodiesel. In *XVI Encontro de Química da Região Sul, FURB*, 13 a 15 de novembro de 2008.
- D’OCA, M. G. M., VIÊGAS, C. V., LEMÕES J. S., MIYASAKI E. K., MORON-VILLARREYES, J. A., PRIMEL, E. G., ABREU, P. C. Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. *Biomass and bioenergy*, 2011, Vol. 35,1533-1538.
- DUARTE, M. M. M. B.; SILVA, J. E.; PASSAVANTE, J. Z. O.; PIMENTEL, M. F.; BARROS NETO, B.; SILVA, V. L. Macroalgae as Lead Trapping Agents in Industrial Effluents - A Factorial Designs Analysis. *Journal Brazilian Chemistry Society*, 200, Vol. 12, 409-506.

- EHIMEN, E. A., SUN, Z. F., CARRINGTON, C. G. Variables Affecting the *in situ* Transesterification of Microalgae Lipids. *Fuel*, 2010, Vol. 89, 677–684.
- FOLCH, J., LEES, M., STANLEY, G. H. S. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 1956, 497-509.
- FREEDMAN, B., PRYDE, E. H., MOUNTS, T.L. Variables Affecting the Yields of Fatty Esters from Transesterified Vegetable Oils. *JAOCS*, 1984, 61, n°. 10, 1375-1380.
- FREEDMAN, B., BUTTERFIELD, R. O., PRYDE, E. H. Transesterification Kinetics of Soybean Oil. *JAOCS*, 1986, 63, n°.10, 1638-1643.
- FREITAS, L., BUENO, T., PÉREZ, V. H., SANTOS, J. C., CASTRO, H. F. Produção de Ácidos Graxos Poliinsaturados por Via Enzimática: Revisão dos Princípios Tecnológicos do Processo Parte 1: Aspectos Nutracêuticos e Características da Tecnologia Atual de Hidrólise. *Ciência e Cultura - Revista Científica Multidisciplinar da Fundação Educacional de Barretos*, 2006a, Vol. 1, n° 1, 43-49.
- FREITAS, L., BUENO, T., PÉREZ, V. H., SANTOS, J. C., CASTRO, H. F. Produção de Ácidos Graxos Poliinsaturados por Via Enzimática: Revisão dos Princípios Tecnológicos do Processo Parte 2: Importantes Aspectos da Alternativa Biotecnológica. *Ciência e Cultura - Revista Científica Multidisciplinar da Fundação Educacional de Barretos*, 2006b, Vol. 1, n° 1, 50-60.
- FUKUDA, H., KONDO, A., NODA, H. B, Biodiesel Fuel Production by Transesterificaion of Oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, 92, n°5, p.405-416.
- FUKUDA, H., KONDO, A., TAMALAMPUDI, S. Bioenergy: Sustainable Fuels from Biomass by Yeast and Fungal Whole-Cell Biocatalysts. *Biochemical Engineering Journal*. 2009, vol.44. p.2–12.

- GERPEN, J. V. Biodiesel processing and production. *Fuel Processing Technology*, 2005, 86, 1097– 1107
- GEORGOGIANNI, K. G., KONTOMINAS, M. G., TEGOU, E., AVLONITIS, D., GERGIS, V. *Energy & Fuels*, 2007, 21, 3023-3027.
- GOUVEIA, L., OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology.*, 2009, vol. 36, p. 269–274.
- HARTMANN, L.; LAGO, R.C.A.. Rapid Preparation of Fatty Acid Methyl Esters From Lipids. *Laboratory Practices*, 1973, Vol. 22: 475-477
- HAAS, M. J., SCOTT, K. M., FOGLIA, T. A., MARMER, W. N. The General Applicability of *in Situ* Transesterification for the Production of Fatty Acid Esters from a Variety of Feedstocks. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2007, Vol. 84:963–970. DOI 10.1007/s11746-007-1119-4.
- HAAS, M. J., WAGNER, K. M. Substrate Pretreatment can Reduce the Alcohol Requirement During Biodiesel Production Via *in Situ* Transesterification. *J Am Oil Chem Soc*, 2011, Vol. 88:1203–1209. DOI 10.1007/s11746-011-1773-4.
- HU, Q., SOMMERFELD, M., JARVIS, E., GHIRARDI, M., POSEWITZ, M., SEIBERT, M., DARZINS, A. Microalgal Triacylglycerols as Feedstocks for Biofuel Production: Perspectives and Advances. *The Plant Journal*, 2008, Vol. 54, 621–639.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Câmara Brasileira do Livro-SP, 3ª Edição, Vol. 1. São Paulo, 1985.
- JOHNSON, M., WEN, Z. Production of Biodiesel Fuel From the Microalga *Chlorella limacina* by Direct Transesterification of Algal Biomass. *Energy fuels*, 2009, Vol.23, 5179–5183.

- KHALIL, C. N. As Tecnologias de Produção de Biodiesel - O Futuro da Indústria: Biodiesel – Coletânea de Artigos. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior – MDIC, 2006, disponível em: [www.biodiesel.gov.br](http://www.biodiesel.gov.br)
- KNOTHE, G. Dependence of Biodiesel Fuel Properties on the Structure of Fatty Acid Alkyl Esters. *Fuel Processing Technology*, 2005, 86: 1059-1070.
- KNOTHE, G., GERPEN, J. V., KRAHL, J., RAMOS, L. P., Manual do Biodiesel. Editora Edgard Blücher, São Paulo-SP, 2006.
- KNOTHE, G. “Designer” Biodiesel: Optimizing Fatty Ester Composition to Improve Fuel Properties. *Energy & Fuels*, 2008, 22: 1358-1364.
- KOH, L. P., GHAZOUL J. Biofuels, Biodiversity, and People: Understanding the Conflicts and Finding Opportunities. *Biological Conservation*, 2008, vol. 141, p. 2450-2460
- KUCEK, K. T. 2004, “Otimização da transesterificação etílica do óleo de soja em meio alcalino.” Dissertação de MSc. UFPR. Curitiba – PR.
- LARDON, A., HÉLIAS, A. SIALVE, B., STEYER, J- P. BERNARD, L. Life-Cycle Assessment of Biodiesel Production from Microalgae. *Environmental Science & Technology*, 2009, Vol. 43, N° 17, 6475-6481.
- LEWIS, T., NICHOLSB, P. D., MCMEEKINA, T. A. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, Vol. 43, 107–116
- LI, Q., DU, W., LIU, D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, Vol. 80, 749–756.
- LIMA, P. C. R., 2005, “Biodiesel: um novo combustível para o Brasil”, Consultoria legislativa. Disponível em: <http://bd.camara.gov.br>, acessado em 11/2009.

- LOURENÇO, S. O. 2006. Cultivo de Microalgas Marinhas - Princípios e Aplicações. Rima, 606p.
- MA, F., HANNA, M. A. Biodiesel Production: A Review. *Bioresource Technology*, 1999, 70, 1-15.
- MANDAL, S., MALLICK, N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009. DOI 10.1007/s00253-009-1935-6.
- MASIERO, G., LOPES, H. Etanol e biodiesel como recursos energéticos alternativos: perspectivas da América Latina e da Ásia *Revista Bras. Polít. Int.*, 2008, 51 (2), 60-79.
- MENDES-BURAK, J. A.; NUNES, A. ; BAUMGARTNER, T. R. S. ; EGASHIRA, C.; ARROYO, P.A. Caracterização Físico-Química d Óleo de Pinhão-Manso (*Jatropha Curcas*) para a Produção de Biodiesel. *In: IX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - Iniciação Científica*, 2011, Maringá. COBEQ-IC 2011, 2011.
- MEHER, L.C., SAGAR, D. V., NAIK, S. N. Technical Aspects of Biodiesel Production by Transesterification - A Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2006, Vol, 10, 248–268.
- MIAO, X., WU, Q. Biodiesel Production from Heterotrophic Microalgal Oil *Bioresource Technology*, 2006, Vol. 97, p. 841–846.
- MIAO, X., WU, Q. High Yield Bio-Oil Production From Fast Pyrolysis by Metabolic Controlling of *Chlorella protothecoides*. *Journal of Biotechnology*, 2004, Vol. 110, 85–93.
- MILINSK, M. C., 2007. “Análise Comparativa entre Oito Métodos de Esterificação na Determinação Quantitativa de Ácidos Graxos em Óleo Vegetal.” Tese de Doutorado UEM. Maringá – PR.



- MOLINA GRIMA, E., BELARBI, E.-H., ACIÉN FERNÁNDEZ, F.G., ROBLES MEDINA, A., YUSUF CHISTI. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*, 2003, 20: 491–515.
- MOLINA GRIMA, E., ACIÉN FERNÁNDEZ, F.G., GARCIA, F. C., YUSUF CHISTI. Photobioreactors: Light Regime, Mass Transfer, and Scaleup. *Journal of Biotechnology*, 1999, 70: 231–247.
- MORAIS, M. G., COSTA, J. A. V. Perfil de Ácidos Graxos de Micro algas Cultivadas com Dióxido de Carbono. *Ciência e Agrotecnologia, Lavras*, 2008, Vol. 32, n° 4, 1245-1251.
- MORAIS, M. G., COSTA, J. A. V.. Biofixation of Carbon Dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cCultivated in a Three-Stage Serial Tubular Photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, 2007, Vol. 129, 439–445.
- MOREIRA A. B. R., PEREZ, V. H., ZANIN, G. M., CASTRO, H. F.. Biodiesel Synthesis by Enzymatic Transesterification of Palm Oil with Ethanol Using Lipases from Several Sources Immobilized on Silica–PVA Composite. *Energy & Fuels*, 2007, Vol. 21, 3689–3694.
- MORESCO, C.; BUENO, N.C. Scenedesmaceae (Chlorophyceae – Chlorococcales) de um lago artificial urbano: *Desmodesmus* e *Scenedesmus*. *Acta Scientiarum. Biological Sciences - Maringá*, 2007, Vol. 29, n° 3, p. 289-296.
- MORGADO, C., R.V.; BORSCHIVER, S.; ARAÚJO, O. Q. F. Um Modelo de Ecologia Industrial Centrado em Biomassa de Microalgas. In. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Recife – PE, 2008.
- MULITERNO, A.; MOSELE, P. C.; COSTA, J. A. V.; HEMKEMEIER, M.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L.M. Cultivo Mixotrófico da Microalga *Spirulina platensis* em Batelada Alimentada. *Ciência e Agrotecnologia, Lavras*, 2005, Vol. 29, n. 6, p. 1132-1138.

O FUTURO DA INDÚSTRIA: Biodiesel: Coletânea de Artigos/coordenadores José Rincon Ferreira, Carlos Manuel Pedroso Neves Cristo. – Brasília : MDIC-STI/IEL, 2006. 145 p., disponível [www.biodiesel.gov.br/documentos](http://www.biodiesel.gov.br/documentos), acessado em: 11/2008.

OBIBUZOR, J., ABIGOR, R., OKIY, D. Recovery of oil via acid-catalyzed transesterification. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2003, Vol. 80, 77–80.

OIL PRODUCTION. Disponível:<<http://www.fao.org/docrep/w7241e/w7241e0h.htm>, acessado em 22/10/2008.

OGBONNA, J.C. E TANAKA, K. Light Requirement and Photosynthetic Cell Cultivation – Development of Processes for Efficient Light Utilization in Photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 2000, 12, 207–218.

PINTO, A. C., GUARIEIRO, L. L. N., REZENDE, M. J. C., RIBEIRO, N. M., TORRES, E. A., LOPES, W. A., PEREIRA, P. A. P., ANDRADE, J. B.. Biodiesel: An Overview. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2005, Vol. 16, 1313-1330.

PISARELLO, M. L., DALLA COSTA, B., MENDOW, G., QUERINI, C. A. Esterification with ethanol to produce biodiesel from high acidity raw materials Kinetic studies and analysis of secondary reactions. *Fuel Processing Technology*, 2010, Vol. 91, 1005–1014

RADMANN, E. M., COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e NO. *Química Nova*, 2008, Vol. 31, n° 7, 1609-1612.

RAMOS, L. P., KUCEK, K. T., DOMINGOS, A. K., WILHELM, H. M. Biodiesel: Um projeto de Sustentabilidade Econômica e Sócio-Ambiental Para o Brasil. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 2003, 31:28-37.

- RAMOS, M. J., FERNÁNDEZ, C. M., CASAS, A., RODRÍGUEZ, L., PÉREZ, A. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource Technology*, 2009, 100:261-268.
- REVISTA BIODIESEL BR. 2008, Biodiesel de algas. Ano 1, n°.6. Agosto/Setembro.
- 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*, 2009, 37: 44-51.
- RODOLFI, L., ZITTELLI, G. C., BASSI, N., PADOVANI, G., BIONDI, N., BONINI, G., TREDICI, M. R. Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, Vol. 102, n°. 1, 100-112.
- ROSENBERG J.N., OYLER, G. A., WILKINSON, L., BETENBAUGH, M. J. A Green Light for Engineered Algae: Redirecting Metabolism to Fuel a Biotechnology Revolution, *Current Opinion in Biotechnology*, 2008, doi:10.1016/j.copbio.2008.07.008
- SCHUCHARDT, U., SERCHELIA, R., VARGAS, R. M. Transesterification of Vegetable Oils: a Review. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 1998, Vol. 9, n°. 1, 199-210.
- SCHENK, P. M., THOMAS-HALL, S. R., STEPHENS, S., MARX, U. C., MUSSGÜNGER, J.H., POSTEN, C., KRUSE, O., HANKAMER, B. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *Bioenerg. Res.* 2008, n°. 1:20–43. DOI 10.1007/s12155-008-9008-8
- SEBASTIEN, N. Y. GRANJA, R. P. Cultivo de *Scenedesmus*: Alimento Vivo para a Manutenção de Organismos Planctônicos e Implementação na Dieta Humana. *Revista Varia Scientia*, 2005, Vol. 05, n°. 10, 113-121.

- SINGH, A. NIGAM, P. S., MURPHY, J. D. Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels. *Bioresource Technology*, 2011, Vol. 102, 10–16.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O. Produção de Plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para Alimentação de Organismos Aquáticos. São Carlos: Editora RiMa, 2001, 106p.
- SMEDES, F., ASKLAND, T. K. Revisiting the Development of the Bligh and Dyer Total Lipid Determination Method. *Marine Pollution Bulletin*. 1999, Vol. 38, N°. 3, 193-201.
- SPECTOR C., GOBBI, C. N., CONCEIÇÃO, R. C., ARAÚJO O. Q. F., CHALOUB, R. M. Cultivo de Microalgas para Seqüestro de CO<sub>2</sub>. In. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Recife – PE, 2008.
- SOARES, D., BECKER, A. G., JÚNIOR, L. F. L. L., MARIANO, A. B., VARGAS, J. V. C., NOSEDA, M. D., MITCHELL, D. A. Metodologias para obtenção de biomassa e extração de lipídeos de microalgas marinhas. In: 4º Congresso Internacional de Bioenergia e 1º Congresso Brasileiro de Geração Distribuída e Energias Renováveis, 2009, Curitiba, Paraná, Brasil. Anais do 4º Congresso Internacional de Bioenergia, 1º Congresso Brasileiro de Geração Distribuída e Energias Renováveis. Curitiba, Paraná, Brasil : Editora FUPEF - Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná, 2009.
- STAMENKOVIC', O. S., VELICKOVIC', A. V., VELJKOVIC', V. B., The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: Current state and perspectives. *Fuel*, 2011, Vol. 90, 3141–3155.
- SUAREZ, P. A. Z., MENEGHETTI, S. M. P., MENEGHETTI, M. R., Wolf, C. R. Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. *Química Nova*, 2007, Vol. 30, n°. 3, 667-676.

- SUAREZ, P. A. Z., SANTOS, A. L. F., RODRIGUES, J. P., ALVES, M. B. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. *Química Nova*, 2009, Vol. 32, nº 3, 768-775.
- TANAMATI, A. 2005, “*Estudo comparativo de nove métodos de Extração de lipídios totais em bife (longissimus) Usando métodos com solventes clorados e Métodos com solventes de baixa toxicidade*”. Tese de Doutorado UEM. Maringá – PR.
- TEIXEIRA, C. M. L. L.; MORALES, E. – Microalga como Matéria-Prima para a Produção de Biodiesel. In: *II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel*, 2006, Brasília, DF: MCT/ABIPTI, 2008, 91-96.
- TEIXEIRA, P. C. N., TEIXEIRA, C. M. L. L. Potencial de geração de biocombustíveis a partir de microalgas. CONAE – Conferência Internacional de Agroenergia, Londrina, 2006.
- TEIXEIRA, C. M. L. L., TEIXEIRA, P. C. N., ROCHA, H., ALMEIDA, Á. G., BRITO, G. F. C. Um Novo Sistema de Cultivo de Microalgas para a Produção de Biodiesel. Disponível: [www.biodiesel.gov.br/documentos](http://www.biodiesel.gov.br/documentos), acessado em 09/2008.
- TIBURCIO, P. C., GALVEZ, F. C. F., CRUZ, L. J., GAVINO, V. C. Optimization of Low-Cost Drying Methods to Minimize Lipid Peroxidation in *Spirulina platensis* Grown in the Philippines. *Journal Applied Phycology*, 2007, Vol.19, p. 719–726.
- TORRENS, J. C. L., VARGAS, J. C. V., MARIANO, A. B. Estimação das propriedades de biodieseis baseada no perfil de ácidos graxos. In: 4º Congresso Internacional de Bioenergia e 1º Congresso Brasileiro de Geração Distribuída e Energias Renováveis, 2009, Curitiba, Paraná, Brasil. Anais do 4º Congresso Internacional de Bioenergia, 1º Congresso Brasileiro de Geração Distribuída e Energias Renováveis. Curitiba, Paraná, Brasil : Editora FUPEF - Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná, 2009.

- UMDU, E. S., TUNCER, M., SEKER, E. Transesterification of *Nannochloropsis Oculata* Microalga's Lipid to Biodiesel on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Supported CaO and MgO Catalysts *Bioresource Technology*, 2009, Vol. 100, p. 2828–2831.
- URIOSTE, D., CASTRO, M. B. A., BIAGGIO F. C., CASTRO, H.F. Síntese de padrões cromatográficos e estabelecimento de método para dosagem da composição de ésteres de ácidos graxos presentes no biodiesel a partir do óleo de babaçu. *Química Nova*, 2008, Vol. 31, n<sup>o</sup>. 2, 407-412.
- VICENTE, G., MARTÍNEZ, M., ARACIL, J. Integrated Biodiesel Production: a Comparison of Different Homogeneous Catalysts Systems. *Bioresource Technology*, 2004, Vol. 92, p.297–305.
- VISENTAINER, J. V., FRANCO, M. R. B., 2006, Ácidos Graxos em Óleos e Gorduras: Identificação e Quantificação, Ed. Varela, São Paulo, 120p.
- VILCHEZ, C., GARBAYO, I., LOBATO M. V., VEGA, J. M. Microalgae-mediated chemicals production and waste removal. *Enzyme Microbial Technology*, 1997, 20: 562-72.
- XU, H., MIAO, X., WU, Q. High Quality Biodiesel Production from a Microalga *Chlorella protothecoides* by Heterotrophic Growth in Fermenters. *Journal of Biotechnology*, 2006, Vol. 126, p. 499–507.
- XU, R., MI, Y. Simplifying the Process of Microalgal Biodiesel Production Through In Situ Transesterification Technology. *J Am Oil Chem Soc.*, 2011, Vol. 88, pp.91–99. DOI 10.1007/s11746-010-1653-3
- ZHANG, Y., DUB, M. A., McLEAN, D. D., KATES, M. Biodiesel Production from Waste Cooking Oil: Process Design and Technological Assessment *Bioresource Technology*, 2003, Vol. 89, p. 1–16, doi:10.1016/S0960-8524(03)00040-3

- ZHANG, X. W.; ZHANG, Y. M.; CHEN, F. Application of mathematical models to the determination optimal glucose concentration and light intensity for mixotrophic culture of *Spirulina platensis*. *Process Biochemistry*, 1999, 34: 477-481.
- XIONG, W., Li, X., XIANG, J., WU, Q. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 78:29–36.
- WAHLEN, B. D., WILLIS, R. M., SEEFELDT, L. C. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. *Bioresource Technology*, 2011, Vol.102, 2724–2730
- WATANABE, A. List of algal strains in collection at the institute of applied microbiology, University of Tokyo. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 1960, Vol. 6, n°. 4, 1960.
- WIDJAJA, A., CHIEN, C-C., JU, I-H. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2009, Vol. 40, 13–20.