

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – UNIOESTE
CENTRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA – MESTRADO

**PRODUÇÃO DE ÉSTER ETÍLICO VIA REAÇÃO *IN SITU* A PARTIR
DA BIOMASSA DA *Chlamydomonas reinhardtii***

SIMONE CRISTINA RODRIGUES

TOLEDO - PR
Setembro de 2016

SIMONE CRISTINA RODRIGUES

**PRODUÇÃO DE ÉSTER ETÍLICO VIA REAÇÃO IN SITU A PARTIR DA
BIOMASSA DA *Chlamydomonas reinhardtii***

Dissertação de Mestrado, submetida à Universidade Estadual do Oeste do Paraná como parte integrante dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Bioenergia para obtenção do título de Mestre em Bioenergia, área de concentração em Biocombustíveis

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tatiana Rodrigues da Silva Baumgärtner

TOLEDO – PR
Setembro de 2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

R696p

Rodrigues, Simone Cristina

Produção de éster etílico via reação in situ a partir da biomassa da *Chlamydomonas reinhardtii*./Simone Cristina Rodrigues. Toledo, 2016.
80 f.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tatiana Rodrigues da Silva Baumgärtner

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná,
Campus de Toledo. Centro de Engenharia e Ciências Exatas, 2016
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Bioenergia

1.*Chlamydomonas reinhardtii*. 2. Microalgas. 3. Biodiesel. I.Baumgärtner,
Tatiana Rodrigues da Silva. II. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. III.
Título.

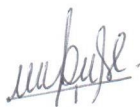
CDD 20.ed. 662.88
CIP-NBR 12899

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio – CRB 9ª/965

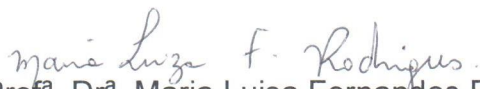
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA

Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por SIMONE
CRISTINA RODRIGUES perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em
Bioenergia em 09 de setembro de 2016

COMISSÃO JULGADORA

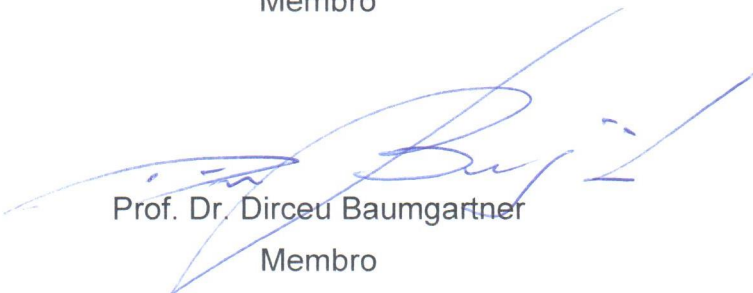


Prof.ª. Dr.ª. Tatiana Rodrigues da Silva Baumgartner
Orientador



Prof.ª. Dr.ª. Maria Luisa Fernandes Rodrigues

Membro



Prof. Dr. Dirceu Baumgartner

Membro

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por me guiar, me abençoar e me fortalecer sempre e a Maria, minha mãe aparecida que passa na frente e guia seus filhos. Obrigado mãe por nunca me desamparar.

Aos meus pais, minha mãe, companheira, âncora e fortaleza Maria Elizete Eduardo e meu pai Paulo Rodrigues por terem dedicado sua vida à minha criação e me ensinarem o caminho para busca à minha formação profissional. Agradeço pelo amor incondicional, por terem me apoiado isso inclui as ajudas nos momentos de dificuldades tornando-se biólogos por “tabela”.

Ao meu namorado, melhor amigo e futuro marido, Ivair Fábio Valcarengi, por todo carinho, amor, compreensão. Obrigado por me incentivar e me apoiar sempre.

Agradeço as minhas amigas em especial Camila Mitiko Inohue e Mariana Carbonaro pela ajuda com o projeto, meu amigo Jonatan Carlos Migloreto pelas ajudas tecnológicas de sempre e todas os outros que não vou citar nomes para não ser injusta, que sempre me apoiaram.

A minha Teacher Rosiane de Andrade Gomes, pelo incentivo e grande ajuda com a Proficiência em Inglês, e minhas colegas de classe de Inglês Marisiane Takase e Vânia Flóis que com sua experiência analítica puderam me auxiliar muito.

A minha orientadora Tatiana Rodrigues da Silva Baumgärtner por contribuir para a minha formação e ajudar a construir e desenvolver em mim o espírito de pesquisadora. Graças a você e a todos os professores do programa consegui entender o verdadeiro sentido da pesquisa.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, alunos e colaboradores do Gerpel, InPAA, laboratórios de Engenharia Química, meus colegas de mestrado, em especial aos meus colegas de trabalho da empresa Prati-Donaduzzi que estiveram me apoiando enquanto estive ausente.

Aos Prof. Edson Antônio da Silva e Prof. Dr. Nyamien Yahaut Sebastien pela disponibilização de toda a estrutura necessária para o desenvolvimento desse estudo. À Unioeste e ao Programa de Pós-Graduação em Bioenergia pela oportunidade de Mestrado.

Muito obrigada

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Biodiesel	4
3.1.1. Biodiesel de Microalga.....	5
3.2 Microalgas.....	7
3.2.1 Características da microalga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	10
3.3 Recuperação da Biomassa e Secagem	11
3.4 Clorofilas.....	13
3.5 Proteínas e Carboidratos Totais de Microalgas	14
3.6 Extração do Óleo em Microalgas	17
3.7 Produção de Ésteres.....	18
3.8 Transesterificação/Esterificação ácida - Reações <i>in situ</i>	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 Cultivo da microalga	22
4.2 Cinética de crescimento	25
4.3 Recuperação e Secagem da biomassa.....	26
4.4 Teor de clorofila <i>a</i> e <i>b</i>	28
4.5 Determinação de proteínas totais.....	29
4.6 Determinação de carboidratos totais	30
4.7 Teor de lipídios – Extrato Etéreo	30
4.7.1 Teor de lipídios.....	31
4.8 Determinações de matéria seca, mineral e umidade.....	32
4.9 Determinação das fibras totais	33
4.10 Produção de Ésteres.....	34
4.10.1 Reação <i>in situ</i> - Transesterificação/Esterificação Ácida	35

4.11 Caracterização do óleo	36
4.12 Análises Cromatográficas	36
4.12.1 Quantificação dos produtos da reação	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Cultivo da Microalga – <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> em escala de bancada e avaliação dos parâmetros de cultivo.....	40
5.2 Recuperação e Secagem da Biomassa	42
5.3 Teor de Clorofila da biomassa DE <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	43
5.4 Determinação de Proteínas e Carboidratos Totais da biomassa de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	44
5.5 Extrato etéreo para obtenção de lipídios da biomassa de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	45
5.5.1 Teor lipídico da biomassa de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	46
5.6 Reação <i>in situ</i> - Reação de Esterificação do Óleo de Microalgas.....	46
6. CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXOS	67
A ₁ - Gráfico 1 – Curva de calibração de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	67
A ₂ - Laudo analítico de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da microalga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	10
Figura 2 - Reação de transesterificação e formação de ésteres	19
Figura 3 - Etapas da Reação de transesterificação	20
Figura 4 - Cultivo em erlenmeyers de 1 L.....	24
Figura 5 - Cultivo em erlenmeyers de 2 L e garrafas plásticas de 5 L	25
Figura 6 - Cultivo em erlenmeyers de 2 L e garrafas plásticas de 5 L	25
Figura 7 - Recuperação da biomassa e filtragem	27
Figura 8 - Secagem em estufa a 60 °C	27
Figura 9 - Biomassa seca triturada	28
Figura 10 - Biomassa triturada, armazenada em potes plásticos	28
Figura 11 - Reação <i>in situ</i> - Transesterificação/Esterificação Ácida.....	36
Figura 12 - Curva de crescimento entre os dois meios MC e TAP	40
Figura 13 - Concentração de éster obtido nos diferentes tempos e temperaturas da reação	47
Figura 14 - Média e desvio da média das concentrações de ésteres para as diferentes temperaturas de reação – Análise de Variância	49

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Vantagens com relação a plantas superiores como uma fonte de biocombustíveis de transporte.....	6
Tabela 2 - Composição geral de proteínas de diferentes fontes de alimentação humana e microalgas % de matéria seca	15
Tabela 3 - Meio MC para cultivo de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	22
Tabela 4 - Solução Sal.....	23
Tabela 5 - Solução Fosfato	23
Tabela 6 - Elemento Traço	23
Tabela 7- Produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) da microalga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> cultivada com meio MC e meio TAP.	41
Tabela 8 - Resultado da Análise de Teor de clorofila	43
Tabela 9 - Resultado da Análise de Teor de Proteína.....	44
Tabela 10 - Resultado da Análise de Extrato Etéreo	45
Tabela 11 - Resultado da Análise de Teor Lipídico	46
Tabela 12 - Quantidade de ésteres obtidos.....	46
Tabela 13 -% de perfil de ésteres etílicos obtidos (média)	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GEE – Gases de Efeito Estufa

% – Porcentagem

min – Minuto

°C – Celsius

CO₂ – Dióxido de carbono

InPAA – Instituto de Pesquisa e Aquicultura Ambiental

NO_x – Óxido de Nitrogênio

O₂ – Oxigênio

mol – Quantidade de matéria (unidade de medida)

µm – Micrômetro

nm – Nanômetro

UV-vis – Ultravioleta visível

SFE – Extração com fluido supercrítico

KOH – Hidróxido de Potássio

mL – mililitro

g – grama

L – litro

KNO₃ – Nitrato de potássio

MgSO₄.7H₂O – Sulfato de Magnésio Hepta-hidratado

CaCl₂.2H₂O – Cloreto de cálcio di-hidratado

H₃BO₄ – Ácido Bórico

FeSO₄.7H₂O – Sulfato de Ferro Hepta-hidratado

ZnSO₄.7H₂O – Sulfato de Zinco Hepta-hidratado

NaCl – Cloreto de Sódio

CuSO₄.5H₂O – Sulfato de Cobre Penta-hidratado

Ca(NO₃).26H₂O – Nitrato de Cálcio Hexacos-hidratado

MnCl₂.4H₂O – Cloreto de Magnésio Tetra-hidratado

EDTA – Edetato dissódico

NH₄Cl – Cloreto de Amônio

TAP – Tri acetato fosfato

K₂HPO₄ – Fosfato de Potássio Dibásico

KH_2PO_4 – Fosfato de Potássio Monobásico

$\text{CoCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ – Cloreto de cobalto Hexa-hidratado

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}.4\text{H}_2\text{O}$ – Molibidato de amônio Tetra-hidratado

MJ – mega Joule

PCS – Poder Calorífico Superior

mg – miligrama

rpm – Rotação por minuto

Gerpel – Grupo de Pesquisas em Recursos Pesqueiros e Limnologia

NaOH – Hidróxido de Sódio

FAME Mix – Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos

PI – Padrão interno

FCE – Fator de correção experimental

FCT – Fator de correção teórico

C* – Carbonos ativos

KJ – quilo Joule

LQA – Laboratório de Qualidade de Alimentos

ATP – Adenosina tri-fosfato

Chl a – Clorofila a

Chl b – Clorofila b

Chl c – Clorofila c

Chl d – Clorofila d

H₂O – Água

lx – Lux

PRODUÇÃO DE ÉSTER ETÍLICO VIA REAÇÃO IN SITU A PARTIR DA BIOMASSA DA *Chlamydomonas reinhardtii*

AUTORA: SIMONE CRISTINA RODRIGUES

ORIENTADORA: PROF.^a DR.^a TATIANA R. DA SILVA BAUMGARTNER¹

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Bioenergia; Universidade Estadual do Oeste do Paraná; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 – Toledo – PR – Brasil, defendida em 09 de Setembro de 2016. 80 p.

RESUMO

O meio ambiente há alguns anos vem sendo uma das principais preocupações da população mundial. A necessidade de fontes alternativas de energia e de práticas ecologicamente corretas, assim como os biocombustíveis, surgem como uma opção que se ajusta ao desenvolvimento sustentável. Na busca por matérias primas com alto teor de óleo, as microalgas têm sido consideradas como uma fonte útil e promissora de biodiesel. Desta forma, o trabalho teve como objetivo a avaliação da produção de ésteres etílicos via reação *in situ* da biomassa obtida no cultivo da microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, determinar o melhor meio de cultivo baseado na produtividade, desenvolver o cultivo de microalga para a produção de biomassa, determinar o teor de lipídios, a reação *in situ* para a produção de ésteres etílicos caracterizar e quantificar os ésteres obtidos. A partir dos resultados obtidos com a extração, observou-se que as características dos solventes podem favorecer a extração lipídica da biomassa. A microalga *Chlamydomonas reinhardtii* foi cultivada em meio TAP, com luz artificial e temperatura contraladas. Após houve a recuperação da biomassa, esta foi analisada quanto ao teor de clorofila *a* e *b* proteínas e carboidratos totais e por fim, foi obtido e quantificado o teor lipídico presente na biomassa, analisando-se o perfil de ésteres etílicos presentes por cromatografia gasosa. O teor de clorofila, proteína e carboidratos encontrados foram: 54,136 mg./L⁻¹, 29,39% e 14,92%, respectivamente, e o maior teor de lipídeo foi de 4,03% o rendimento do cultivo de biomassa foi de 0,646 g.L⁻¹. A partir dos resultados obtidos com a extração, observou-se que, a polaridade do solvente influencia na produtividade de lipídios. Na produção de ésteres o que predomina na reação *in situ* é a temperatura e o tempo de reação, apresentando maiores rendimentos a temperatura de 60°C (1,504 mg de éster/g de biomassa em 30, 1,518 mg de éster/g de biomassa em 45 minutos e 1,509 mg de éster/g de biomassa em 60 minutos). Na produção de ésteres, a análise fatorial revelou que houve interação entre temperatura e tempo, em média, os melhores rendimentos em número de cetanos C15 e C16 sendo C16 (76,97% em 30°C, 58,21% em 45C°, 64,05% em 60C° e 56,79% em 75C°C) perfil de ésteres obtidos, propícios para a produção de biodiesel. Os resultados obtidos demonstram que a biomassa microalga *Chlamydomonas reinhardtii* apresenta potencial para produção de biodiesel, quando cultivada nas condições testadas neste estudo.

ETHYL ESTER PRODUCTION VIA REACTION *IN SITU* FROM *Chlamydomonas reinhardtii* BIOMASS

AUTHOR: SIMONE CRISTINA RODRIGUES

SUPERVISOR: PROF^a DR^a TATIANA R. DA SILVA BAUMGARTNER¹

Masters dissertation; Post-Graduate Program in Bioenergy; State University of Western Paraná (UNIOESTE); Rua da Faculdade St, 645; Zip CODE: 85903-000 - Toledo - PR - Brazil, defended on September 09th, 2016. 80 p.

ABSTRACT

For some years, the environment has been one of the main concerns of the global population. The need for alternative sources and ecologically friendly practices, as well as biofuels, is an option that fits sustainable development. In search for high oil content raw materials, microalgae have been considered as a useful and promising source of biodiesel. Thus, the paper aimed to evaluate the production of ethyl esters via *in situ* reaction of the biomass obtained in the cultivation *Chlamydomonas reinhardtii* microalgae, to determine the best cultivation medium based on productivity, to develop microalgae cultivation for biomass production, to determine lipid content, the *in situ* reaction for ethyl esters production characterize and quantify the obtained esters. From the results obtained with the extraction, it was observed that the characteristics of the solvents can promote the lipid extraction of the biomass. *Chlamydomonas reinhardtii* microalgae was cultivated in TAP medium, with controlled artificial light and temperature. Then, there was the recovery of the biomass, which analyzed for chlorophyll a and b proteins and total carbohydrates and finally, the lipid content in the biomass was obtained and quantified by analyzing the ethyl esters present by gas chromatography. The chlorophyll, protein and carbohydrate contents were: 54.136 mg / L⁻¹, 29.39% and 14.92%, respectively, and the highest lipid content was 4.03%. The yield of the biomass culture was of 0.646 gL⁻¹. From the results obtained with the extraction, it was observed that, the polarity of the solvent influences the productivity of lipids. In the production of esters the predominant *in situ* reaction is the temperature and reaction time, with the highest yields at 60°C (1.504 mg of ester/g of biomass in 30, 1.518 mg of ester/g of biomass in 45 and 1.509 mg of ester/g of biomass in 60 minutes). In the production of esters, the factor analysis showed that there was interaction between temperature and time, on average, the best yields in number of C15 and C16 cetanes being C16 (76.97% at 30°C, 58.21% at 45°C, 64.05 % In 60°C and 56.79% in 75°C) profile of esters obtained, suitable for the production of biodiesel. The obtained results showed that the *Chlamydomonas reinhardtii* microalgae biomass presents potential for biodiesel production, when cultivated under the conditions tested in this study.

1 INTRODUÇÃO

O meio ambiente há alguns anos vem sendo uma das principais preocupações da população mundial. Segundo Mata; Martins e Caetano, (2010), a necessidade de fontes alternativas de energia e as práticas ecologicamente corretas contribuem para a melhoria do meio ambiente, assim os biocombustíveis surgem como uma opção que se ajusta ao desenvolvimento sustentável.

A temperatura global vem aumentando nos últimos 40 anos, devido ao uso de combustíveis fósseis, que são os maiores responsáveis por emissões de gases que provocam o efeito estufa (GEE). Por conta disso, alternativas ecológicas estão sendo estudadas e viabilizadas com vários intuitos, entre eles, os efeitos relacionados às emissões de GEE. Dentre as alternativas podemos citar, a energia eólica, os biocombustíveis, também os de terceira geração a partir da biomassa seca de microalgas ou mesmo até os co-produtos de outros combustíveis renováveis (BORGES et al., 2005; DEDÊ e SALES, 2010; PALOMINO; ESTRADA e LÓPEZ, 2010).

Na busca por matérias primas com alto teor de óleo, as microalgas têm sido consideradas como uma fonte útil e promissora de biodiesel, porque elas são organismos fotossintetizantes muito eficientes no processo de conversão da luz em energia química, contêm lipídios e ácidos graxos, produtos de armazenamento, metabólitos e fontes de energia (PEREIRA et al., 2012). Cada espécie de microalga produz diferentes proporções de lipídios, carboidratos e proteínas. Ainda, se destacam por apresentar alta produtividade, superior ao de qualquer planta produzida comercialmente no mundo.

Microalgas têm um ciclo de vida de poucos dias e utilizam CO₂ para fotossíntese, sendo um processo capaz de diminuir a emissão destes gases na atmosfera o que contribui para o balanço favorável do ciclo biogeoquímico do carbono. Além disso elas podem ser cultivadas em águas residuais como, por exemplo, efluentes de esgoto doméstico e industrial, sendo assim, as microalgas podem contribuir significativamente para a matriz energética global (BAUMGARTNER, 2013).

As microalgas têm a capacidade de crescer rapidamente, sintetizarem e acumularem grandes quantidades (aproximadamente 20-50 % de peso seco) de lipídios neutros armazenado em corpos lipídicos (DE HOLANDA, 2011).

A partir do óleo vegetal, têm sido relatados vários métodos para a produção de biodiesel dentre eles o uso direto e de mistura, pirólise e transesterificação. A transesterificação é uma técnica atraente e amplamente aceita. O objetivo do processo de transesterificação é o de diminuir a viscosidade do óleo (DEMIRBAS, 2009)

Alguns parâmetros afetam a formação dos ésteres na reação de transesterificação, como temperatura, relação molar álcool:óleo, tipo de catalisador, etc. (SCHUCHARDT; SERCHELIA e VARGAS, 1998). Nesta reação o rendimento também é afetado pela razão molar de álcool para óleo vegetal e quando a temperatura aumenta consequentemente o rendimento é maior (DEMIRBAS, 2009).

Desta maneira, este trabalho busca estudar o processo de produção de ésteres etílicos pela reação *in situ* na biomassa da microalga *Chlamydomonas reinhardtii* em diferentes temperaturas e tempos de reação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O trabalho tem como objetivo geral, avaliar a produção de ésteres etílicos via reação *in situ* da biomassa obtida do cultivo da microalga *Chlamydomonas reinhardtii*.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar o melhor meio de cultivo da microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, baseado na melhor produtividade;
- Produzir a biomassa a partir do melhor meio obtido.
- Determinar o teor de clorofilas, proteínas e carboidratos, extrato etéreo e lipídios da biomassa
- Produzir ésteres etílicos via reação *in situ*.
- Caracterizar o perfil de ésteres obtidos.
- Quantificar os ésteres obtidos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biodiesel

Biodiesel é um combustível composto de alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa de ácidos graxos, produzidos por uma reação de transesterificação e/ou esterificação de matérias graxas, de gorduras de origem vegetal ou animal (Lei nº 14, de 11 de maio de 2012).

As reações de transesterificação, podem ocorrer com catalisadores ácidos ou básicos, dependendo principalmente da origem da matéria prima do óleo a ser produzido. Nas catálises básicas as reações são mais rápidas, por isso são mais utilizadas que as ácidas. Ainda existem o uso de lipases que oferecem vantagens muito importantes, porém como apresentam um custo ainda muito alto, tornam-se inviáveis (FUKUDA et al., 2011).

Os ésteres mais comuns mundialmente produzidos são os metílicos por serem mais barato, mais reativo, implicando em menos tempo de reação, porém no Brasil o etanol é o álcool mais barato, desta maneira, os combustíveis são produzidos a partir de ésteres etílicos, menos tóxico, renovável, este produz biodiesel com mais cetonas e lubricidade, entretanto, o etanol promove dispersão da glicerina tornando difícil sua separação. Assim como etanol e metanol outros álcoois de peso molecular mais baixo, também foram introduzidos para a produção de biodiesel a partir de óleos vegetais e gorduras animais (KNOTHE, et al., 2005 e LÔBO e FERREIRA, 2009).

Com relação a qualidade do biodiesel um número de cetanos baixos está relacionado a uma alta quantidade de insaturações (RAMOS et al., 2009). E com o aumento do teor de ésteres poli-insaturados a estabilidade, à oxidação diminui, assim como as propriedades de fluxo a frio são degradadas pela presença de ésteres de cadeia saturada e longa, além disso, aumenta-se a estabilidade oxidativa na presença destes ésteres (KNOTHE, 2008; RAMOS et al., 2009). Portanto leva-se à necessidade de se obter biodiesel sintetizado a partir de óleos com alto teor de ésteres monoinsaturados, e composições que apresentem bom desempenho em ambas as condições, apresentando propriedades globais melhores (KNOTHE et al., 2005).

Abaixo seguem algumas vantagens distintas do biodiesel em comparação com diesel de origem fóssil, além a ser totalmente competitivo na maioria dos aspectos técnicos com diesel de origem fóssil (KNOTHE, et al., 2005):

- Evita a dependência e mantém a preservação do petróleo, por sua origem ser de um recurso interno renovável;
- Biodegradabilidade;
- Redução na maioria da emissão de gases de exaustão (com exceção NO_x);
- Superior ponto de fulgor, manipulação e armazenamento mais seguros;
- Apresenta boa capacidade de lubrificação, devido a este fato, vem sendo adicionado ao diesel derivado de petróleo com baixo teor de enxofre, em níveis baixos (1-2%) para restaurar a lubrificação.

Alguns problemas associados com biodiesel:

- Preço mais elevado, que em muitos países é compensada por incentivos legislativos/regulamentares e/ou subsídios;
- Aumento nas emissões NO_x;
- Baixa estabilidade oxidativa quando exposta ao ar (estabilidade oxidativa);

O preço elevado pode ser reduzido quando se utiliza matérias primas como gorduras residuais por exemplo ou redução em incentivos legislativos, marcos regulatórios e subsídios do governo como redução fiscal (KNOTHE, et al., 2005).

3.1.1. Biodiesel de Microalga

Um dos grandes desafios dos processos de produção de é dispor de matérias-primas capazes de atender às expectativas dos programas biocombustíveis energéticos sem impactar de forma significativa a produção de alimentos (SUAREZ et al., 2009), para colaborar com este cenário surgem as microalgas que não disputam terras produtivas com as espécies alimentícias (RODOLFI et al., 2008).

A Tabela 1 apresenta vantagens com relação a plantas superiores como fonte de biocombustíveis de transporte.

Tabela 1 - Vantagens com relação a plantas superiores como uma fonte de biocombustíveis de transporte

Número	Descrição
1	Produção de óleo por área de culturas de microalgas poderia exceder em muito o rendimento das melhores culturas oleaginosas
2	Crescem em ambiente aquático médio, mas precisam de menos água do que as culturas terrestres
3	Podem ser cultivadas em água do mar ou água salobra em terras não aráveis, e não competir por recursos com a agricultura convencional;
4	Produção de biomassa de microalgas pode ser combinada com bio-fixação direta de resíduos de CO ₂ (1 kg de biomassa de algas secas exigindo cerca de 1,8 kg de CO ₂)
5	Fertilizantes para o cultivo de microalgas (especialmente nitrogênio e fósforo) pode ser obtido a partir de águas residuais
6	O cultivo de algas não precisa ou herbicidas pesticidas
7	A biomassa de algas residual após a extração de óleo pode ser utilizado como alimento ou fertilizantes, ou fermentado para produzir etanol ou metano
8	A composição bioquímica de biomassa de algas pode ser modulado através da variação das condições de crescimento e o teor de óleo pode ser altamente melhorada

Fonte: Autor, (2016) adaptada de Rodolfi et al., (2008)

O biodiesel a partir de microalgas tem sido considerado um enorme potencial para estudo como biocombustível para fins energéticos, nos Estados Unidos já existe um programa com espécies aquáticas desde a década de 70 (FAO, 2010).

A versatilidade da produção de biocombustíveis a partir de algas pode fornecer respostas a ambas as barreiras econômicas e dos desafios do ciclo de vida enfrentado na produção de energia renovável. Ao extrair mais de um tipo de biocombustível a

partir da biomassa de algas ou um coproduto adicional, o valor da biomassa aumenta e ao mesmo tempo, oferece compensações adicionais (JONES e MAYFIELD, 2012).

Tanto a nível mundial como nacional, diversas pesquisas começaram a surgir com o objetivo de cultivar esses organismos para uma produção em larga escala de biomassa para fins energéticos, principalmente o biodiesel (CHISTI, 2007).

Segundo Ahmad et al., (2011), microalgas são fonte de realidade potenciais de produção de biodiesel, porque não causam grandes impactos ao meio ambiente.

3.2 Microalgas

As microalgas fazem parte de um grupo heterogêneo de micro-organismo onde existem cerca de 100.000 espécies, sendo estas com predominância aquáticas e na maioria das vezes microscópicos, realizam fotossíntese encontrados tanto em ambientes marinhos, quanto em água doce (SCHMITZ; DAL MAGRO e COLLA, 2012).

Pode-se dizer que muito pouco se sabe sobre as microalgas, isso é uma característica interessante do ponto vista de pesquisadores, pois muito ainda pode descobrir sobre ela. Algumas mil linhagens são mantidas em coleções ao redor do mundo, dentre as espécies de microalgas que se acredita existirem. E a respeito de seu conteúdo químico somente algumas centenas foram investigadas além disso somente uma pequena parte tem sido cultivada em escala industrial (BERTOLDI; SANT'ANNA e OLIVEIRA, 2008).

As principais linhagens de microalgas em termos de abundância são descritas por (SHEEHAN, 1998 e SCHMITZ; DAL MAGRO e COLLA, 2012)

a) Diatomáceas (Bacillariophyta), da qual existem aproximadamente 100.000 espécies, sendo considerada a espécie que domina o fitoplâncton dos oceanos, podendo ser encontrada em ambientes de água doce. Apresenta sílica como constituinte da parede celular. Estocam carbono na forma de lipídios ou carboidratos.

b) Algas Verdes (Chlorophyceae), deram origem aos vegetais superiores, são encontradas em sua grande maioria em água doce. Sua produção energética se dá principalmente, em forma de amido, porém em certas condições podem produzir lipídeos.

c) Algas azuis (Cyanophyta), conhecidas por desempenharem papel importante na atmosfera: a fixação de nitrogênio. Compreende cerca de 2.000 espécies, podendo ser encontrados em diversos ambientes;

d) Algas Douradas (Chrysophyceae) que possuem cerca de 1.000 espécies, com habitat predominantemente doce, possuem coloração amarela, marrom alaranjada e pigmentos com sistemas mais complexos. Produzem lipídios e carboidratos como produtos de reserva.

As clorofilas são responsáveis pela absorção da luz e auxiliar na fotossíntese, possuem funções nas indústrias de alimentos, cosméticas e farmacêuticas e sua proporção nas microalgas variam em função da intensidade luminosa. (DANESI, et al., 2011)

Conforme o tipo de matérias-primas utilizadas e a destinação da biomassa de microalgas, recomenda-se que os meios de cultura para microalgas possam ser agrupados em três tipos, a) meio sintético completo; b) aqueles que são baseados em água natural enriquecida com suplementação mineral; e c) as de águas residuais como efluentes de estações de tratamento, industriais, etc. (BECKER, 1994)

No cultivo de microalgas para a produção de biomassa seu conteúdo e 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; DU e LIU, 2008; MIAO e WU, 2006).

Para cultivo das microalgas, vêm sendo avaliados meios de cultura alternativos entre eles estão: os efluentes industriais, efluentes de biodigestores, lodo digerido, esgoto doméstico e resíduos de suinocultura (PIPES e GOTAAS, 1960; WONG & LAY, 1980; JUSSIÁK et al., 1984; RODRIGUES e BELLÍ FILHO, 2004; SÁNCHEZ et al., 2001).

Um dos principais fatores para o crescimento microalgal é a luz, pois atua como fonte de energia no processo de produção de biomassa (BECKER, 1994; BERTOLDI; SANT'ANNA, E., OLIVEIRA, 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 (BECKER, 1994; BERTOLDI; SANT'ANNA, e OLIVEIRA, 2008).

A agitação da cultura torna-se muito importante para otimizar e 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, torna o cultivo homogêneo (BECKER, 1994; BERTOLDI; SANT'ANNA e OLIVEIRA, 2008).

As algas, assim como toda planta que faz fotossíntese, produzem oxigênio como produto de reação na qual cada mol de CO₂ consumido, um mol de O₂ 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, evita-se a foto-oxidação pela eliminação do oxigênio supersaturado no meio (BECKER, 1994; BERTOLDI; SANT'ANNA e OLIVEIRA, 2008).

Os cultivos podem apresentar-se de maneira contínua ou semicontínua. No contínuo pode ocorrer de duas formas: diluindo ou concentrando as culturas (controle da densidade celular das microalgas no meio) ou mantendo o fornecimento de quantidades predeterminadas de nutrientes (controle da taxa de crescimento das microalgas). Já no semicontínuo, consiste em realizar a colheita periódica da cultura microalgal desenvolvida (em sistemas internos ou externos) e, posteriormente, reajustar a cultura remanescente para que as microalgas cresçam novamente e possam ser colhidas quando atingirem o nível de crescimento desejado. Desta forma pode-se observar o cultivo de microalgas em diversas literaturas, sendo executado em diversos sistemas, com volumes e características diferentes. Dentre os sistemas abertos, destacam-se *raceway ponds* (tanques de recirculação a céu aberto), lagos e lagoas naturais ou artificiais e sistema *turf scrubber*. O fotobiorreator é o principal sistema fechado de cultivo de microalgas (MULBRY et al., 2008).

As microalgas sintetizam diversas substâncias, e muitas espécies podem ser induzidas a acumular concentrações de lipídios, proteínas e carboidratos (DERNER et al., 2006).

3.2.1 Características da microalga *Chlamydomonas reinhardtii*

Chlamydomonas reinhardtii, a microalga escolhida para este estudo, é citada por vários autores, por além de ser de fácil adaptação à ambientes para cultivo, mantém grande reserva de amido, ainda, através de engenharia genética pode ser modificada para facilitar a grande para obtenção de lipídios, o que viabiliza a produção de biodiesel (REDA et al., 2011, SIAUT et al., 2011 e JONES e MAYFIELD, 2012).

A célula mais ou menos oval de tamanho aproximado de 10 µm, possui uma membrana e um cloroplasto contendo pigmento geralmente em forma de copo e uma estrutura eucariótica acompanhada de cílios (flagelos) (MERCHANT, 2007). A figura 1 demonstra o esquema da microalga *Chlamydomonas reinhardtii*.

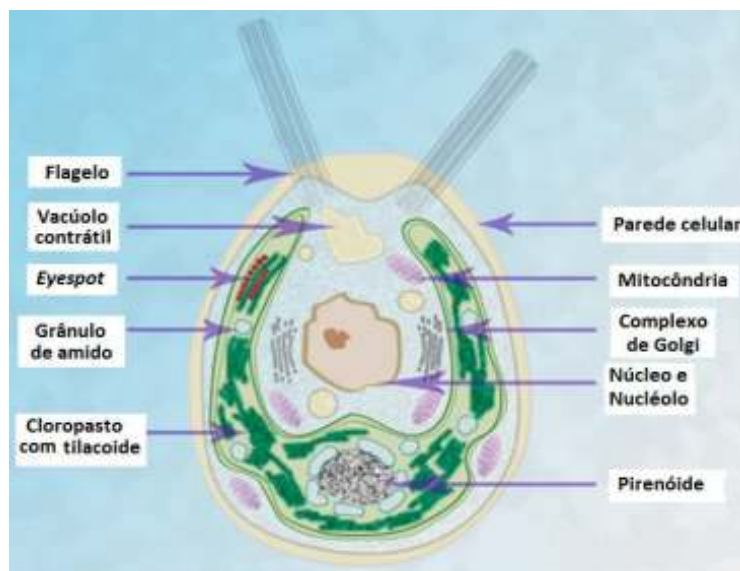


Figura 1 - Esquema da microalga *Chlamydomonas reinhardtii*

Fonte: Villela, 2014

A reprodução assexuada é de zoósporos e a sexual é por formação de gametas. Os gametas aglutinam suas estruturas flagelares, esta aglutinação produz um sinal intracelular. A resposta a esta aglutinação são alterações morfológicas e fisiológicas conhecidas nas células que as preparam para a uma fusão dos gametas (PIJST et al., 1984).

Estudos recentes indicaram que a microalga *Chlamydomonas sp.* pode ser utilizada para a produção de biodiesel, por possuir uma elevada taxa de crescimento

e de teor de lipídios necessitando apenas de um meio de cultivo simples e barato (MOROWVAT; RASOUL-AMINI; e GHASEMI, 2010).

Estudos com a produção de ésteres a partir da biomassa de *Chlamydomonas* para produção de biodiesel estão sendo desenvolvidos. Martins (2012), pelo método de extração de lipídios totais da biomassa de *Chlamydomonas* sp. pelo método de Lepage e Roy (1984) e posterior transformação em biodiesel, demonstraram que o teor lipídico desta espécie é concordante com o teor de lipídeos que pode estar presente na composição química microalgas do mesmo gênero, como a *Chlamydomonas reinhardtii*, com teor lipídico na ordem dos 21 % (biomassa seca) (DEMIRBAS e DEMIRBAS, 2011).

Por cromatografia gasosa analisou-se os ésteres metílicos produzidos, revelando a predominância de C16:0 (palmitato) e C18:1 (oleato) considerados ideais para a produção de biodiesel de alta qualidade, estando também presentes C14:0 (miristato) e C18:0 (estearato) (MARTINS, 2012).

3.3 Recuperação da Biomassa e Secagem

A recuperação da biomassa é uma parte do cultivo mais complexa e importante, pois nesta fase os métodos convencionais tornam-se ineficientes. Com base nas informações citadas acima, as microalgas são removidas através dos métodos de: centrifugação, filtração ou, em alguns casos, por sedimentação. Estes podem ser precedidos por uma etapa de floculação. Ainda existem os métodos de pré-oxidação, coagulação e clarificação (MOLINA GRIMA et al., 2003; ROCHA, GARCIA e HENRIQUES, 2003; HENDERSON; PARSONS e JEFFERSON, 2008).

A maioria destas técnicas têm várias desvantagens, além de altos custos, muitas vezes baixos ganhos de eficiência de separação e a qualidade inaceitável do produto colhido. Uma técnica de separação que parece apresentar muitas vantagens sobre as técnicas convencionais é a de separação por floculação eletrolítica ou “eletrólise”, embora tenha-se apresentado testes apenas de pequena escala. Para um processo de separação algal ser eficiente ele deve ser aplicável para todas as espécies de algas, exigir poucos investimentos em energia, manutenção e de recursos hídricos e sua produção dever ter uma elevada percentagem de peso seco (BUSTOS

ARAGÓN; BORJA PADILLA e FIESTAS ROS DE URSINOS, 1992; POELMAN; PAUW e JEURISSEN, 1997; XIONG et al., 2015).

O crescimento no cultivo da biomassa pode ser verificado pela turbidez da amostra ou 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 (MULITERNO et al., 2005; ANDRADE e COSTA, 2008; MENEZES et al., 2015).

A secagem é o processo posterior a recuperação da biomassa da solução. Com a remoção da água das amostras, a biomassa se mantém conservada, pois a umidade é crucial no processo deterioração de materiais biológicos embora este processo ocorra cause a morte celular. Níveis baixos de umidade permitem longevidade às amostras.

O processo de secagem é responsável por 30% do custo total da produção de microalgas, portanto este é um dos passos mais importantes da produção, seleção de um determinado método de secagem depende da escala de operação e do destino final do produto seco (BECKER, 1994).

A secagem em sua forma mais simples é feita mediante o tratamento das amostras com calor, (estufas ou exposição à luz solar). A temperatura utilizada depende do propósito posterior da biomassa algácea, porém temperaturas altas como 80 °C, pode danificar a amostra. As amostras expostas à luz solar também podem ser danificadas, pois temperaturas moderadas (exemplo 40 °C) por um longo período, podem estimular o crescimento bacteriano. A liofilização é o melhor processo de conservação de amostras de microalgas a seco, a remoção da água por seu processo é feita sob baixas temperaturas. Através de um forte vácuo em um dos compartimentos do liofilizador a água é retirada de amostras congeladas que são dispostas em outro compartimento do aparelho. No entanto, o que inviabiliza o uso deste aparelho é o alto custo, mesmo sendo baixos os custos associados à liofilização das amostras (LOURENÇO, 2006).

O processo de peroxidação lipídica, pode ser evitado com a secagem rápida o tempo de exposição ao calor e ao oxigênio é desejada. Assim, a otimização do

processo de secagem por luz solar pode fornecer produtos com alta qualidade (TIBURCIO et al., 2007).

Economicamente o processo de floculação tem sido o mais atraente para separação da biomassa microalgal de seu meio de cultivo, devido à menor demanda energética e redução nos custos das etapas subsequentes (UGWU; AOYAGI; UCHIYAMA, 2007). Ainda a sobre este processo de recuperação, Tenney et al., (1969), em seus estudos com remoção de biomassa de sistemas de tratamento de efluentes utilizou polieletrólitos catiônicos. Estes reduzem e neutralizam as cargas negativas das superfícies das células das microalgas e formam pontes que agregam as "partículas" fisicamente, desta forma, foi possível verificar que os polímeros catiônicos induzem a floculação (TENNEY et al., 1969).

3.4 Clorofilas

A clorofila é o pigmento mais abundante na natureza, ela se subdivide em clorofila a que corresponde a 75% dos pigmentos verdes totais cujo principal papel é a absorção da luz solar e a sua conversão para energia química durante a fotossíntese e clorofila b, que é um pigmento suplementar (BORRMANN, 2009).

A clorofila e outros pigmentos das células fotossintetizantes através das reações luminosas, absorvem a energia luminosa e a conservam na forma química de dois produtos ricos em energia, o ATP e o NADPH. Em seguida, produzem O₂. Nas reações de fixação de carbono, o ATP e o NADPH são utilizados para reduzir o CO₂ para formar glicose e outros compostos orgânicos (BORRMANN, 2009).

Os plastídios são organelas subcelulares que sustentam as clorofilas, e por serem verdes são chamados cloroplastos (BORRMANN, 2009).

Cada espécie de planta possui seus tipos de pigmentos fotossintéticos e sua variedade. A clorofila a (Chl a) está presente em todos os organismos que realizam fotossíntese oxigênica. No caso das bactérias fotossintetizantes a bacterioclorofila é que age no lugar da clorofila já que elas não possuem clorofila e atua como pigmento fotossintético. A Chl a é o pigmento utilizado para realizar a fotoquímica (o primeiro estágio do processo fotossintético), enquanto que os demais pigmentos auxiliam na

absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação, sendo assim chamados de pigmentos acessórios (SCHWARTZ e LORENZO, 1990; TAIZ e ZIEGER, 2004).

Ainda existem os pigmentos acessórios, entre eles as clorofilas: Chl b, presente em vegetais superiores, algas verdes e algumas bactérias; Chl c, em feófitas e diatomáceas; e Chl d, em algas vermelhas (SCHWARTZ e LORENZO, 1990; TAIZ e ZIEGER, 2004)

A produção de oxigênio singlete (alta energia de oxigênio) gerada pelas clorofilas, não é restrita a extratos de pigmentos aquosos, mas também ocorre em solventes menos polares como o óleo. Por essa razão, um óleo contendo um alto conteúdo de clorofilas ou produtos da degradação deve ser estocado no escuro e em temperatura reduzida, isso se deve ao fato das clorofilas serem relativamente instáveis e sensíveis à luz, aquecimento, oxigênio e a degradação química (SCHOEFS, 2002).

As moléculas de clorofilas possuem uma longa cadeia de duplas ligações conjugadas dessa forma reagem facilmente com ácido, base, oxigênio e luz. Essas moléculas reagem facilmente com O₂ sob luz formando espécies de oxigênio ativas (foto-oxidação), que oxidam outras moléculas, incluindo lipídios e proteínas e, por esta razão, devem ser monitoradas durante a extração e análises (SCHOEFS, 2002).

3.5 Proteínas e Carboidratos Totais de Microalgas

Segundo Darnell; Lodish, e Baltimore, (1990) e Ganong, (1995), as proteínas desempenham papéis extremamente importantes, na maioria dos processos biológicos, atuando como enzimas, hormônios, neurotransmissores, transportadores através das membranas celulares e outros.

Estudos realizados aproximadamente 50 anos atrás, considerou a produção em massa de algumas microalgas ricas em proteína como uma possibilidade para fechar o chamado "gap proteína"(BECKER, 2007).

As proteínas de algas se comparadas com as de outros vegetais convencionais em análises abrangentes e nutricionais demonstraram que estas proteínas são de alta qualidade e podem ter valores iguais ou superiores (BECKER, 2007).

Para se ter vantagens técnicas e econômicas no emprego de microalgas como fonte de proteínas é preciso a propagação de toda a biomassa algal. O material de microalgas, tem uma amplitude incomun de qualidade nutricional quando comparado às outras plantas e se utilizadas em substituição as dietas convencionais consiste, além de proteína, outros compostos nutritivos: peptidos, carboidratos, lípidios, vitaminas, pigmentos, minerais e outras elementos valiosos (BECKER, 2007).

Teores dos componentes, variam amplamente entre as espécies de microalgas com predominância de proteínas (BROWN et al., 1997; BECKER, 2007; CAMPOS; BARBARINO e LOURENÇO, 2010). Na Tabela 2 adaptada de Becker, (1994) e Richmond, (2004), verifica-se esta relação em peso seco de cada espécie de oleaginosas.

Tabela 2 - Composição geral de proteínas de diferentes fontes de alimentação humana e microalgas % de matéria seca

Commodity	Proteínas	Carboidratos	Lípidios
Fermento	39	38	1
Carne	43	1	34
Leite	26	38	28
Arroz	8	77	2
Soja	37	30	20
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11

Fonte: Adaptada de Becker, (1994) e Richmond, (2004)

Segundo Becker, (2007) estudos estão sendo desenvolvidos para inserir a proteína algal na nutrição humana e animal, só que isso ainda sofre muitas barreiras sócio-etnológicas, um exemplo são os países em desenvolvimento, que tem a necessidade de proteína, porém, por serem contra à ingredientes alimentares desconhecidos, só podem adquirir alimentos conservadores. Além disso, os custos de produção de microalgas permanecem muito elevados para competir com fontes de proteínas convencionais (BECKER, 2007)

Através do processo de fotossíntese as microalgas podem acumular carboidratos devido a fixação de CO₂. A fotossíntese é o processo biológico no qual organismos fotossintetizantes podem converter CO₂ e H₂O, na presença de luz, em glicose e outros açúcares por via metabólica, processo esse conhecido como ciclo de Calvin (LIBESSART et al., 1995; WEYER et al., 2010; BENEMANN, 2013).

Segundo Becker, (1994); Hall e Rao, (1994); Libessart et al., (1995); Hirano et al., (1997); Vidotti e Rollemberg (2004); Lourenço (2006), no caso de microalgas da divisão *Chlorophyta*, como as microalgas do gênero *Chlamydomonas reinhardtii* o produto de reserva das cianobactérias é um polissacarídeo formado por monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo α -1,4 encontrado nas paredes celulares, conhecido como amido das cianofíceas. Esta substância difere do amido por apresentar ramificações mais abundantes em relação à cadeia principal de polissacarídeo. Portanto, o amido das cianofíceas é muito semelhante ao glicogênio encontrado em animais e tem uma forte semelhança estrutural e funcional ao amido de armazenamento de plantas superiores. Algumas espécies de microalgas como *Chlorella*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus*, *Spirulina* têm altos teor de carboidratos, principalmente amido > 50 % de seu peso seco (UEDA et al., 1996).

Recentemente, os carboidratos de biomassa de microalgas estão sendo considerados como uma matéria-prima barata e promissora para a produção de biocombustíveis por fermentação de microrganismos. O principal obstáculo do processo é o pré-tratamento das microalgas e a extração de carboidratos a partir de células das algas (ZHAO et al., 2013).

Na produção de biocomustíveis os carboidratos a partir de microalgas podem ser hidrolisados e convertidos em glicose, que é um substrato muito significativo, por micro-organismos heterotróficos (como leveduras, bactérias e fungos) (CHOI; NGUYEN e SIM, 2010).

Segundo Choi; Nguyen e Sim, (2010), por exemplo, num estudo de *Chlamydomonas* pôde-se verificar cerca de 60% de carboidratos (dos quais 44% era o amido que foi hidrolizado e convertido em glicose).

3.6 Extração do Óleo em Microalgas

Existem diversas formas de se conseguir lipídios a partir da extração, uma delas é a química com a utilização de solventes orgânicos (KUMAR; RAO e ARUMUGAM, 2015), mas existem outras por meio de homogeneização, choque osmótico, e enzimas ultrassom, porém não é aplicado para larga escala (MOLINA GRIMA et al., 2003; RICHMOND, 2004; DERNER et al., 2006; EL-SHEEKH e HAMOUDA, 2016).

Carelli et al., (2011) menciona o método de extração com fluido supercrítico (SFE), utilizando dióxido de carbono (CO₂) como solvente. Mata; Martins; Caetano, (2010) comprovou que o método de extração de lipídios com fluido supercrítico (SFE) comparado à extração de lipídios com solvente é mais eficiente e proporciona menor impacto ambiental.

Por se tratar de uma determinação importante a extração da fração lipídica deve ser realizada com extrema exatidão. Algumas amostras requerem cuidados especiais para a obtenção da fração lipídica, devido a fatores que podem influenciar a qualidade final da fração lipídica como coextração dos componentes não-lipídicos e a oxidação indesejada (BRUM; ARRUDA e REGITANO-D'ARCE, 2009).

Apesar da extração lipídica para determinação do teor de lipídios de microalgas ser comum em escala laboratorial, as variáveis que afetam a extração de lipídios a partir de microalgas não são bem compreendidas, assim a produção comercial de biodiesel de microalgas fica difícil. E ainda a maioria dos estudos que investigam a composição lipídica de microalgas não conseguem avaliar a adequação dos lipídios extraídos para a produção de biodiesel (HALIM et al., 2011).

A fração lipídica inclui os triacilglicerídeos, os ácidos graxos livres, os hidrocarbonetos, os esteróis, os ésteres de esteróis e os álcoois livres (GALLAGHER, 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. Os lipídios podem incluir, lipídios neutros, lipídios polares, cera ésteres, esteróis e hidrocarbonetos, assim como derivados tais como tocoferóis, caroteno, terpenos e as clorofilas. No entanto, não se pode confundir a produtividade em lipídios totais com o rendimento em biodiesel a partir das algas, pois somente os triglicerídeos e os ácidos graxos livres, que fazem parte dos lipídios neutros, devem ser considerados para a produção de biodiesel puro (HU et al., 2008; GALLAGHER, 2011; WAHLEN; WILLIS e SEEFELDT, 2011).

A eficiência da extração de lipídios a partir de microalgas está relacionada ao tipo de solvente e método de extração utilizado (EL-SHEEKH e HAMOUDA, 2016).

3.7 Produção de Ésteres

Para a produção de ésteres alquílicos, com intuito de produção de biodiesel, a rota tecnológica com maior frequência de utilização é a de transesterificação mostrada o esquema da figura 2, 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).

Em uma reação de transesterificação exige-se, 1 mol de um triglicerídeo e 3 mols de um álcool para se obter 3 mols de ésteres graxos e 1 mol de glicerol. Para a melhora da reação de transesterificação, é necessário utilizar um grande excesso do álcool ou para remover um dos produtos a partir da mistura de reação. A remoção de um destes dos produtos da reação é preferível sempre que possível, uma vez que assim, a reação pode ser conduzida à conclusão. A velocidade da reação é mais elevada, quando 100 % de excesso de metanol é utilizado, uma proporção molar de 6:1 é normalmente utilizada em processos industriais para se obter rendimentos de

éster de metil superior a 98 % em peso (SCHUCHARDT; SERCHELIA e VARGAS, 1998; SRIVASTAVA e PRASAD, 2000)

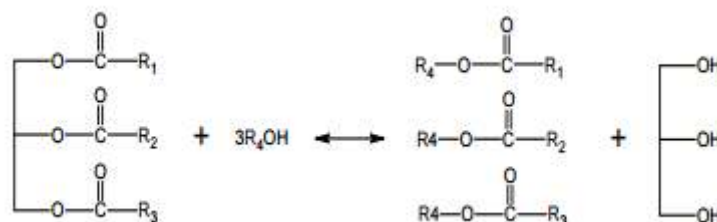


Figura 2 - Reação de transesterificação e formação de ésteres

Fonte: (ARAÚJO et al., 2012)

Na etapa de transesterificação, podem ser separados glicerol e os ésteres por decantação ou centrifugação, devido à insolubilidade 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 pode reduzir a velocidade de separação. Porém, o excesso de álcool só será removido, quando o glicerol e os ésteres alquílicos estiverem devidamente separados, pois há a preocupação com a reação reversa. A água acrescentada à mistura, tem objetivo de melhorar a separação do glicerol depois que a reação de transesterificação estiver terminada (GERPEN, 2005). Os produtos de reação de transesterificação são uma mistura de ésteres, glicerol, álcool, catalisador e tri-, di- e monoacilglicerídeos (MA e HANNA, 1999).

Há a preferência de álcoois simples para a preparação de ésteres graxos da reação de transesterificação de óleos vegetais. Estes ésteres são um bom potencial como uma alternativa de combustível para substituir óleo diesel em tratores agrícolas. Devido a este potencial, a atenção sobre as variáveis que afetam o rendimento destes ésteres vem sendo estudada (FREEDMAN; BUTTERFIELD e PRYDE, 1986).

O máximo rendimento de ésteres ocorre entre as temperaturas de (50°C a 80°C) a uma razão molar (Álcool para óleo) de 6:1 (FEUGE e GROSS, 1949; FILLIÈRES; BENJELLOUN-MLAYAH e DELMAS, 1995).

3.8 Transesterificação/Esterificação ácida - Reações *in situ*

A esterificação e/ou transesterificação *in situ* refere-se à conversão simples de ésteres alquílicos a partir de ácidos graxos livres e triacilglicerídeos presentes em um material biológico, envolvem a adição de um álcool, um catalisador, a pressão atmosférica e podem ocorrer a temperaturas baixas a moderadas. Nestas reações é possível a recuperação dos ésteres, pois ao serem produzidos se difundem para a fase líquida (HAAS e WAGNER, 2011).

A transesterificação é uma reação que ocorre em várias etapas, porém três delas são principais: 1) os triglicerídeos são convertidos em diglicerídeos, 2) os diglicerídeos são convertidos em monoglicerídeos, e 3) monoglicerídeos são então convertidos a ésteres (biodiesel) e glicerol (coproduto) conforme ilustrado na figura 3 (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

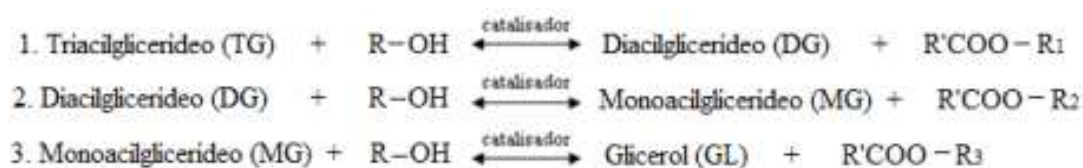


Figura 3 - Etapas da Reação de transesterificação

Fonte: (BAUMGARTNER, 2013)

A presença do excesso de metanol na transesterificação é essencial para romper a ligação glicerol/ácido graxo. Porém, um excesso de metanol (70:1 e 84:1) reduz a velocidade de separação das duas fases produzidas. Segundo Miao e Wu, (2006) a melhor combinação do processo de transesterificação ácida de óleo de microalgas foi de 100 % de catalisador, com uma razão molar de metanol:óleo 56:1, temperatura de 30 °C, para o biodiesel da microalga *Chlorella protothecoides*.

O processo mais comum para a produção de biodiesel é o da reação de transesterificação metálica de óleos vegetais em meio alcalino homogêneo (RAMOS et al., 2011)

Freedman; Pryde, e Mounts, (1984) estudando sobre a influência da razão álcool:óleo na reação de transesterificação do óleo de soja verificaram que, quantidades significativas de mono- e diglicerídeos estão presentes no produto final

quando a razão álcool:óleo é muito baixa. Para se obter formação máxima de éster por transesterificação de óleos vegetais é preferível a utilização de álcool anidro, a razão molar de álcool para óleo de 6:1 dá uma conversão ótima para o éster. Neste estudo utilizou-se uma razão de 6:1 álcool:óleo para que a reação fosse completa, ou seja, que todos os triglicerídeos tivessem reagidos formando ésteres alquílicos.

Devido sua fácil cristalização, os mono e diacilglicerídeos de ácidos graxos saturados presentes no biodiesel podem causar obstrução do filtro de combustível e outros problemas de desempenho nos motores automotivos (GERPEN, 2005).

A conversão de ésteres alquílicos simples de ácidos graxos livres e ácidos graxos ligados a ésteres glicéricos existentes em um material biológico, é chamada reação "*In situ*". Estas reações são simples, envolvendo a incubação de um álcool, de um catalisador inorgânico e um material de suporte de lipídeo à pressão ambiente e temperaturas moderadas. Os ésteres do produto difundem-se na fase líquida da reação e podem ser facilmente recomprados (HAAS e WAGNER, 2011).

A esterificação de óleos com elevado teor de acidez, apresenta problemas por conter, além de triacilglicerídeos, quantidades variáveis de ácidos graxos livres, bem como mono- e diacilglicerídeos. A preparação de ésteres metílicos com catalisadores ácidos e metanol em excesso proporciona tanto uma conversão rápida e essencialmente completa dos ácidos graxos livres, quanto alcoólise lenta dos glicerídeos. Por outro lado, a alcoólise de óleos na esterificação de ácidos graxos direta em catálise alcalina é muito lenta. Por esta razão, a conversão rápida e eficiente de óleos de elevado teor de acidez a ésteres metílicos por um processo único ainda não é prática (OZGÜIL e TÜRKEY, 1993).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultivo da microalga

A cepa da microalga *Chlamydomonas reinhardtii* foi fornecida pelo laboratório de Limnologia, Ecotecnologia e Biomanipulação da Universidade Estadual de Oeste do Paraná - UNIOESTE, coordenado pelo Professor Dr. Nyamien Yahaut Sebastien. Esta cepa obtida é considerada uma cepa selvagem pelo fato de ter sido isolada no presente laboratório.

Para a microalga *Chlamydomonas reinhardtii* foram testados dois meios de cultivo diferentes meio MC utilizado no laboratório do InPAA de Toledo e o meio TAP propostos na literatura para este tipo de alga (WATANABE, 1960; DEL CAMPO e PATIÑO, 2013). 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. (v:v:v). As Tabelas 3 a 6 apresentam os nutrientes que compõem os meios testados no cultivo da microalga *Chlamydomonas reinhardtii*.

O meio de cultivo utilizado foi o TAP, com os macronutrientes e micronutrientes nutrientes apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6

Tabela 3 - Meio MC para cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii*

Reagente	Quantidade (g/L)
KNO ₃	1,250
KH ₂ PO ₄	1,250
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,000
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,084
H ₃ BO ₄	0,114
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,050
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,014
NaCl	0,007

Fonte: Autor, (2016)

Meio de Cultivo TAP: Para cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii*

Tabela 4 - Solução Sal

Reagente	Quantidade (g/L)
NH ₄ Cl	15,000
MgSO ₄ .7H ₂ O	4,000
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,000

Fonte: Autor, (2016)

Tabela 5 - Solução Fosfato

Reagente	Quantidade (g/L)
K ₂ HPO ₄	57,600
KH ₂ PO ₄	28,800

Fonte: Autor, (2016)

Tabela 6 - Elemento Traço

Reagente	Quantidade (g/L)
ZnSO ₄ .7H ₂ O	22,000
MnCl ₂ .4 H ₂ O	5,060
CoCl ₂ .6 H ₂ O	1,610
H ₃ BO ₄	11,400
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	4,990
CuSO ₄ .5 H ₂ O	1,570
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4 H ₂ O	1,100
EDTA	50,000

Fonte: Autor, (2016)

Os cultivos foram executados, contendo 800 mL de água, 5 mL de solução de Sal, 4 mL da solução de fosfatos e 1 mL de Elemento traço e por fim 10 mL do inóculo, para o meio TAP e 800 mL de água, 10 mL de meio e 10 mL do inóculo, para o meio MC.

Os cultivos foram alimentados com as soluções a cada 7 dias. As figuras 4, 5 e 6 demonstram o cultivo da microalga.

Com os dois meios, foi possível definir o período de cultivo pela da curva de crescimento, realizada através da análise de turbidez.

Com os dois meios, foi possível definir o período de cultivo através da curva de crescimento.

As microalgas foram cultivadas em erlenmeyers de 1 e 2 litros, garrafas plásticas de 5 litros e aquário de vidro de 40 litros com luz artificial constante, seladas com plástico filme e a agitação feita através de mangueiras com aeração ligadas a um compressor de ar, também de forma contínua. Figuras 4, 5 e 6.



Figura 4 - Cultivo em erlenmeyers de 1 L
Fonte: Autor, (2016)



Figura 5 - Cultivo em erlenmeyers de 2 L e garrafas plásticas de 5 L
Fonte: Autor, (2016)



Figura 6 - Cultivo em erlenmeyers de 2 L e garrafas plásticas de 5 L
Fonte: Autor, (2016)

4.2 Cinética de crescimento

O aumento da biomassa e/ou densidade celular nos cultivos foi monitorado diariamente, pela concentração celular, utilizando-se uma correlação pré-determinada (curva-padrão) entre a massa seca da biomassa, pela absorbância a 670 nm, determinada utilizando-se um espectrofotômetro Shimadzu UV-vis 1203 e, também, por turbidez, utilizando-se um turbidímetro - modelo AP 2000P.

Para obter a curva de crescimento celular, foram realizadas medidas diárias da turbidez de ambos os cultivos, obtendo-se a biomassa em função dos dias para cada meio.

A produtividade (P em g.L⁻¹.dia⁻¹) da biomassa é dada por:

$$P = \frac{(X_t - X_0)}{(t - t_0)} \quad (\text{Equação 1})$$

sendo que: X_t é a densidade celular no tempo t em (g.L⁻¹)

X_0 é a densidade celular no tempo t_0 em (g.L⁻¹)

t é o tempo (dia).

4.3 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 flocculante Tanfloc-SG por litro de cultivo de alga, para que houvesse a decantação da biomassa. Assim, após a decantação a biomassa foi filtrada em telas de 20 mesh conforme figura 7, e então recolhida e colocada em estufa para a secagem, na temperatura de 60 °C, por 24 horas conforme Figura 8 (BAUMGARTNER, 2013 e BECKER, 1994). De acordo com os dados da literatura, temperaturas em torno de 60 °C mantém a composição de lipídios na biomassa algácea (WIDJAJA; CHIEN e JU, 2009).

Depois de seca a biomassa da microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, foi triturada, armazenada em potes plásticos e mantida em freezer à temperatura (-8 °C (freezer)), para a manutenção e conservação de suas propriedades conforme figura 8 (MOLINA GRIMA et al., 2003; WIDJAJA; CHIEN e JU, 2009).



Figura 7 - Recuperação da biomassa e filtragem
 Fonte: Autor, (2016)



Figura 8 - Secagem em estufa a 60 °C
 Fonte: Autor, (2016)

Depois de seca, a biomassa da microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, foi triturada Figura 9, armazenada em potes plásticos e mantida em freezer à temperatura (-8°C), para a manutenção e conservação de suas propriedades, conforme Figura 10 (MOLINA et al., 2003; WIDJAJA; CHIEN e JU, 2009).



Figura 9 - Biomassa seca triturada
 Fonte: Autor, (2016)



Figura 10 - Biomassa triturada, armazenada em potes plásticos
 Fonte: Autor, (2016)

4.4 Teor de clorofila *a* e *b*

A concentração de clorofilas *a* e *b* foi estimada por método colorimétrico, por meio da substituição dos valores de absorbâncias das amostras lidas em diferentes comprimentos de ondas, conforme as equações 1, 2 e 3, da metodologia proposta por Becker (1994) adaptada.

$$\text{Clorofila } a \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = (16,5 \times A_{665}) - (8,3 \times A_{650}) \quad (1)$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = (33,8 \times A_{650}) - (12,5 \times A_{665}) \quad (2)$$

$$\text{Clorofila } a + b \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = (4,0 \times A_{665}) + (25,5 \times A_{650}) \quad (3)$$

Para a realização das leituras de absorbâncias, cerca de 0,5 g de biomassa seca, proveniente do cultivo (TAP) em triplicata, foram suspendidas em 3 ml de álcool etílico em tubos do tipo Falcon e centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos. Em seguida, foram recolhidos os sobrenadantes, transferidos para novos tubos Falcon (15 mL) as amostras foram levadas ao banho maria, a 90° C por álcool etílico 5 minutos.

Após este período, o volume da solução foi completado, adicionando-se mais 3 mL de álcool etílico e as amostras foram submetidas às leituras em espectrofotômetro (Spectro Vision versão 5.05) nos respectivos comprimentos de onda, conforme a equação para avaliação do teor de clorofila.

4.5 Determinação de proteínas totais

As proteínas da biomassa proveniente do cultivo (TAP) foram determinadas por análises em triplicatas, de acordo com a metodologia proposta pelo (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). As análises foram realizadas no Laboratório de Qualidade de Alimentos – LQA, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Campus Toledo.

Para tanto, 100 mg de biomassa foram adicionadas em um tubo de ensaio com bordas e está suspendida com 5 mL da solução digestora. Em seguida o tubo foi levado ao bloco digestor a 50° C, aumentando a temperatura do mesmo até que atingir 450° C.

Constatou-se que houve digestão completa da amostra, quando a mesma adquiriu cor esverdeada, sem presença de grumos no tubo.

Na sequência foram adicionados nos tubos cerca de 15 mL de água destilada. A destilação foi realizada acoplando-se o tubo de ensaio com a amostra digerida no equipamento destilador. A destilação foi finalizada quando o erlenmeyer completou 75 mL da solução destilada.

A titulação da amostra foi realizada com ácido sulfúrico (0,05 M), a amostra passa de verde a rosa, deve-se anotar o volume de ácido gasto no procedimento.

O cálculo das proteínas totais foi realizado de acordo com a equação 6:

$$\% \text{ de } N = \frac{V \times N \times \text{Fator do ácido} \times 14 \times 100}{P_{\text{amostra}} \text{ (mg)}} \quad (6)$$

Onde:

V = volume ácido gasto

N = normalidade do ácido

P_{amostra} = peso amostra

$\% \text{ de Proteína Bruta} = \% \text{ de } N \times 6,25$

4.6 Determinação de carboidratos totais

A quantidade de carboidratos totais foi calculada através dos dados obtidos nas análises de umidade, cinzas, proteínas, lipídios e fibras presentes na biomassa. Neste trabalho, os dados de percentual lipídico para a determinação dos carboidratos totais foram obtidos pelo método Soxhlet, utilizando-se como solvente éter, conforme metodologia proposta pelo (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

O cálculo dos carboidratos totais foi realizado de acordo com a equação 13:

$$\text{Carboidratos (\%)} = 100 - (\% \text{ umd.} + \% \text{ cinz.} + \% \text{ prot.} + \% \text{ lip.} + \% \text{ fibr.}) \quad (13)$$

Onde: $\% \text{ umd.}$ = umidade

$\% \text{ cinz.}$ = cinzas

$\% \text{ prot.}$ = proteínas

$\% \text{ lip.}$ = lipídios

$\% \text{ fibr.}$ = fibras

4.7 Teor de lipídios – Extrato Etéreo

Foi realizada pelo método de Soxhlet – Instituto Adolfo Lutz (1988) a extração de lipídios da biomassa.

Neste método, primeiramente, coloca-se o balão de extração na estufa à temperatura de 105 °C por 2 horas, posteriormente, resfria-se a amostra no

dessecador, sendo pesada a gordura no balão. Após a pesagem, separa-se 2,0 g da microalga para posterior pesagem em balança analítica. Em seguida, a amostra é colocada em pacote de papel filtro.

Em seguida, os balões são colocados no bloco de gordura, suspendendo-se o pacote de amostra na cestinha e adicionando-se éter de petróleo suficiente para cobrir a amostra, deixando a amostra imersa no éter por 15 minutos à 75°C (sem esquecer de ligar a água). Eleva-se a temperatura a 90°C e erguendo a amostra (para que esta seja lavada) durante 1 hora e meia.

Fecha-se para que o éter seja recolhido e posterior reutilização e os balões são levados para estufa até evaporação total do éter. Após a retirada da estufa e os balões são levados ao dessecador para esfriar, e posterior pesagem dos balões já frios (peso do balão com gordura);

$$L = \frac{P_{BG} - P_B}{P_A} \times 100 \quad (4)$$

Em que:

L = Teor lipídico em relação à biomassa seca (%);

P_{BG} = Peso do balão com gordura (g);

P_A = biomassa seca utilizada (0,3 g).

P_B = Peso do balão (g);

4.7.1 Teor de lipídios

O teor de lipídios foi determinado de acordo com adaptações do método Bligh e Dyer (1959) realizadas por Ryckebosch, Muylaert e Foubert (2012). Foram pesados 50 mg de biomassa seca de cada estirpe em tubo Falcon (15 mL). Em seguida, foram adicionados 3 mL de metanol e submetido em agitados manualmente por 30 segundos. Após agitação, foram adicionados 4 mL de clorofórmio, 1 mL de metanol e 2,4 mL de água destilada. Em seguida, o tubo foi deixado em repouso por 1 hora para separação das fases e então foi realizada centrifugação por 10 minutos a 2.000 rpm.

A parte inferior (clorofórmio) foi pipetada e transferida para um novo tubo Falcon (15 mL). O conteúdo resultante foi re-extraído adicionando-se 2 mL de

metanol seguido de agitação por 30 segundos. Após agitação, foram adicionados 3 mL de clorofórmio, 1 mL de metanol e 2,4 mL de água destilada.

Novamente o tubo foi deixado em repouso por 1 hora, centrifugado nas mesmas condições e a parte inferior foi transferida para o tubo Falcon (20 mL) combinando-se com a amostra da primeira extração.

As fases de solvente combinadas foram filtradas através de uma camada de sulfato de sódio anidro depositada ao fundo de um papel filtro que envolvia um funil de vidro. Em seguida, foram adicionados 2 mL do filtrado em microtubos secos em estufa e previamente pesados em balança analítica. Estes microtubos contendo as amostras foram encaminhados novamente à estufa para secagem a 60 °C até que estes adquirissem peso constante. A porcentagem de lipídios foi determinada conforme a Equação 5.

$$L = \frac{mpe.vtotal.100}{vamostra.bs} \quad (5)$$

Em que:

L = Teor lipídico em relação à biomassa seca (%);

mpe = massa de lipídeo da amostra após evaporação (g);

$vtotal$ = volume total de clorofórmio utilizado para extração de 0,05 g de biomassa seca de microalga (mL);

$vamostra$ = volume de amostra com clorofórmio a evaporar (mL);

bs = biomassa seca utilizada (0,05 g).

4.8 Determinações de matéria seca, mineral e umidade

A determinação da matéria seca e das cinzas, proveniente do cultivo (TAP) foi realizada por análises em triplicatas, de acordo com a metodologia proposta pelo (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). As análises foram realizadas no Laboratório de Qualidade de Alimentos – LQA, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Campus Toledo.

Para determinar a matéria seca, cadinhos (250 mL) foram levados a estufa por 2 horas na temperatura de 105°C. Passado este tempo, os cadinhos foram deixados no dessecador até esfriarem, para posterior pesagem dos mesmos. Em seguida 2,0 g de biomassa foram adicionados aos cadinhos e posteriormente estes

foram levados para estufa numa temperatura de 105°C, por 8 horas. Após este procedimento, os cadinhos foram levados novamente ao dessecador até esfriar e por fim pesados para obter o peso final da amostra.

O cálculo da matéria seca foi realizado de acordo com as equações 7 e 8:

$$\text{Peso seco} = (\text{peso a } 105^{\circ} \text{ C} - \text{peso do cadinho}) \quad (7)$$

$$\text{Matéria seca definitiva (\%)} = \frac{\text{peso seco} \times 100}{\text{peso amostra}} \quad (8)$$

Para determinação da matéria mineral (cinzas), os cadinhos (250 mL) contendo as amostras provenientes da determinação da matéria seca, foram levados para a mufla a 550°C até queima total da matéria orgânica, por aproximadamente 4 horas, até ficarem com as cinzas nas cores (branca ou cinza claro).

O cálculo da matéria seca foi realizado de acordo com as equações 9, 10 e 11:

$$\text{Peso seco} = (\text{peso a } 105^{\circ} \text{ C} - \text{peso do cadinho}) \quad (9)$$

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{\text{peso seco } 550^{\circ} \text{ C} \times 100}{\text{peso seco a } 105^{\circ} \text{ C}} \quad (10)$$

A umidade da biomassa foi calculada de acordo com a equação 11:

$$\text{Umidade (\%)} = (100 - \% \text{ matéria seca definitiva}) \quad (11)$$

4.9 Determinação das fibras totais

A determinação das fibras totais, proveniente de ambos os cultivos (com e sem nitrogênio) foram realizadas por análises em triplicatas, de acordo com a

metodologia proposta pelo (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). As análises foram realizadas no Laboratório de Qualidade de Alimentos – LQA, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Campus Toledo.

Pacotes plásticos (200 mL) foram pesados e em seguida adicionados aos mesmos 1,0 g de biomassa, que ficaram em repouso por 5 minutos em 200 mL de hexano. Passado este tempo, álcool etílico foi burrificado dentro dos pacotes. Os pacotes foram levados para estufa à 105°C até secagem total das amostras. Na sequência os pacotes foram selados e acondicionados nas bandejas do aparelho determinador de fibras, as quais foram totalmente cobertas com ácido sulfúrico (1,25%). Os pacotes permaneceram no aparelho dissecador por 30 minutos à 90°C.

Posteriormente a este procedimento, foram realizadas 2 lavagens sucessivas nos pacotes com água deionizada fervente. Novamente foram adicionados ácido sulfúrico ao aparelho, seguidas de mais duas lavagens com água deionizada, igualmente o procedimento inicial, permanecendo por mais 30 minutos em reação. Em seguida, os pacotes foram suspensos dentro de um béquer contendo álcool etílico, retirados e secados com auxílio de papel toalha.

Por fim, os pacotes foram levados para estufa à 105°C por 3 a 4 horas e após retira-los, deixados esfriar em dessecador e posterior pesagem dos mesmos.

O cálculo da fibra total foi realizado de acordo com a equação 12:

$$Fibra Bruta (\%) = \frac{A - T \times 100}{P} \quad (12)$$

Onde: A = peso do pacotinho + resíduo, em grama

T = peso do pacote

P = peso da amostra (g)

4.10 Produção de Ésteres

A produção de ésteres alquílicos da biomassa da microalga *Chlamydomonas reinhardtii* por reação *in situ*, foi realizada no laboratório Gerpel com os reagentes/solventes disponíveis no laboratório da Unioeste – Toledo – PR. Foi utilizada, a metodologia de processo de transesterificação/esterificação ácida *in*

situ, ou seja, utilizando a biomassa seca na reação. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

4.10.1 Reação *in situ* - Transesterificação/Esterificação Ácida

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

Primeiramente, pesaram-se 0,5 g 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), catalisador (HCl) e solvente (hexano) 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 em (30°C, 45°C, 60°C e 75°C). Os tempos de reação estudados foram de 15, 30, 45, 60 minutos.

Depois de decorrido o tempo de reação, o tubo foi retirado do banho e resfriado até a temperatura ambiente, em banho com água em temperatura ambiente. Depois de frio, foi adicionado 1 mL de água destilada, 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 conforme figura 11. 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* foi avaliado o álcool (etanol) e dois solventes (hexano e clorofórmio). A reação foi realizada em quatro temperaturas diferentes, quais sejam: 30, 45, 60 e 75°C. Também, foi avaliado o tempo de reação, sendo estes 15, 30, 45, 60 minutos.



Figura 11 - Reação *in situ* - Transesterificação/Esterificação Ácida

Fonte: Autor, (2016)

4.11 Caracterização do óleo

Após extração do óleo, foram realizados os seguintes testes para caracterização dos óleos: determinação de perfil de ácidos graxos e determinação da massa molar do óleo (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

4.12 Análises Cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a gás, modelo (PERKINELMER – CLARUS 680), com detector de ionização de chama (DIC), contendo uma coluna capilar específica para separação de ácidos graxos (Elite-WAX de 30 m x 0,25 mm x 0,5 μ m). Como gás de arraste utilizou-se o hélio, em uma 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/minutos. A temperatura do detector 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.

4.12.1 Quantificação dos produtos da reação

A quantificação dos produtos será realizada em um cromatógrafo gasoso, segunda a metodologia proposta por (VISENTAINER e FRANCO, 2006). No laboratório de Engenharia Química da Unioeste Toledo – PR.

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 heptadecanoato de metila. 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 (FCE), cujo valor é determinado experimentalmente, e o fator de correção teórico (FCT), 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 (heptadecanoato de metila), bem como do éster a ser determinado. Desta forma, tem-se a equação 14:

$$FCT = \frac{P_r}{P_x} \quad (14)$$

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 $MM_{\text{estereato de etila}} = 312,50$ 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 $MM_{\text{ácido palmítico}} = 284,48$ 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 na equação 15:

$$FCT = \frac{73,03\%}{71,78\%} = 1,0174 \quad (15)$$

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 relação da equação 16:

$$FCEA = \frac{MM_{\text{éster}}}{MM_{\text{ácido graxo}}} \quad (16)$$

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 relação da equação 17:

$$M_x = \frac{A_x \cdot M_p \cdot FCT}{A_p \cdot M_a} \quad (17)$$

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 (17), 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).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cultivo da Microalga – *Chlamydomonas reinhardtii* em escala de bancada e avaliação dos parâmetros de cultivo

Primeiramente, foi realizado um estudo em escala de bancada para o preparo, cultivo e a manutenção dos inóculos. No laboratório foi realizado um meio padrão denominado como MC e um meio TAP, conforme descrito no capítulo anterior. O crescimento do cultivo foi monitorado pela turbidez. Este parâmetro foi determinado por meio de uma curva padrão, turbidez conforme Anexo (A₁)

Para a microalga *Chlamydomonas reinhardtii* foram testados dois meios de cultivo diferentes propostos na literatura para microalga (WATANABE, 1960; DEL CAMPO e PATIÑO, 2013). 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 a melhor produtividade após a fase de adaptação, no período de 1-15 dias, foi o meio TAP, conforme pode ser observado na curva de crescimento da figura 12 e Tabela 7 apresentadas abaixo:

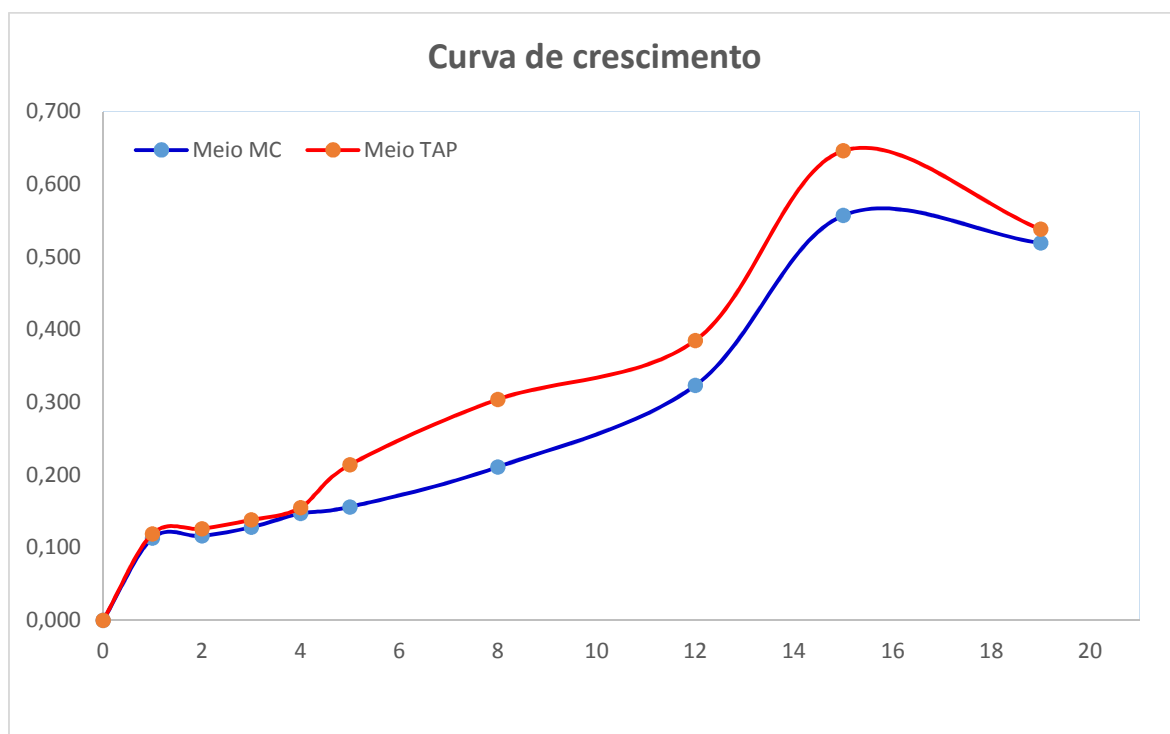


Figura 12 - Curva de crescimento entre os dois meios MC e TAP

Fonte: Autor, (2016)

Tabela 7- Produtividade (g.L⁻¹.dia⁻¹) da microalga *Chlamydomonas reinhardtii* cultivada com meio MC e meio TAP.

Intervalo (dia)	Meio MC	Meio TAP
1 – 2	0,113	0,119
2 – 3	0,116	0,126
3 – 4	0,128	0,138
4 – 5	0,147	0,155
5 – 7	0,156	0,214
7 – 8	0,211	0,304
9 – 12	0,323	0,385
12 – 15	0,557	0,646
17 – 19	0,519	0,538

Fonte: Autor, (2016).

Os resultados indicam que as maiores taxas de crescimento de *Chlamydomonas reinhardtii* ocorreram nos dias de cultivo 12º ao 15º. Da mesma forma que a produtividade, a taxa de crescimento também apresentou valores maiores quando cultivada no meio TAP.

Após este período a curva diminui porque devido a degradação natural das clorofilas ocorre a morte celular.

Resultados parecidos utilizando a mesma dinâmica de crescimento foram encontrados por Mou et al., (2012) e Villela (2014), quando cultivaram *Chlamydomonas reinhardtii* em erlenmeyers, utilizando meios variados e também o meio TAP como fonte de nutrientes, o pico ocorreu no 16º dos 24 dias de cultivo e 4º dos 8 dias respectivamente.

A microalga cultivada por Villela (2014), *C. reinhardtii* transgênica, criada com intuito de aumentar a produção de lipídios, acelerou o crescimento da espécie, visando a produção de biocombustíveis. A espécie em questão apresentou crescimento em oito dias, aproximadamente metade do observado neste trabalho, entrando em fase exponencial e estacionária após três dias de cultivo, reduzindo sua taxa de crescimento após seis dias de cultivo.

Devido ao melhor resultado obtido na produtividade de *Chlamydomonas reinhardtii* com o meio de cultivo TAP (0,646 g.L⁻¹), este foi utilizado como meio de cultivo único na produção de biomassa algácea, necessária para a fase experimental de extração de lipídios e produção de biodiesel.

Observa-se que tanto a produtividade quanto a taxa de crescimento da biomassa algácea manteve-se em ascensão devido ao fato das condições de cultivo terem sido controladas, atingindo assim o objetivo esperado para este trabalho.

Porém, estes resultados não excluem a possibilidade de o cultivo de microalgas ser realizado em ambientes naturais, sem controle de temperatura e iluminação, pois para um sistema em grande escala tais controles poderiam elevar o custo de produção de forma relevante.

5.2 Recuperação e Secagem da Biomassa

Trabalhos de alguns autores citam a centrifugação como um meio eficiente para a recuperação de microalgas. (MOLINA GRIMA et al., 2003; SCHENK et al., 2008). Porém encontra-se dificuldade quanto a recuperação é dada em escalas maiores das algas cultivadas em bancada. A inviabilidade vem do porte das centrífugas que em sua maioria são pequenas (BAUMGARTNER, 2013).

Assim, a adição de flocculantes, como o catiônico TANFLOC SG, descrito neste trabalho podem promover a separação da biomassa.

A adição do flocculante fez com que as células em suspensão se aglomerassem e decantassem, possibilitando que o excesso de água fosse retirado, devido a este ser de origem orgânica, possibilitou à água retirada conter grande quantidade de microalga viva, desta forma o reaproveitamento foi possível, adicionando-se novamente o meio de cultivo. A adição do flocculante promove maior recuperação celular, com menor perda de células.

O uso de flocculantes orgânicos é indicado, por apresentarem menor custo na recuperação e menor contaminação das amostras.

Quanto ao rendimento da biomassa *Chlamydomonas reinhardtii*, pode-se considerar o resultado satisfatório (0,646 g.L⁻¹) de biomassa seca. Cavalcanti et al., (2014) encontrou resultados próximos para *Chlorella*.

5.3 Teor de Clorofila da biomassa de *Chlamydomonas reinhardtii*

Segundo Lourenço (2006) a clorofila *a* é o principal pigmento de fotossíntese, enquanto que outras clorofilas são consideradas pigmentos acessórios, de modo que podem ou não estar em conjunto a clorofila *a*.

O teor de clorofila é uma resposta da absorção da luz em função da fotossíntese. Ele fornece uma indicação de saúde do cultivo, uma vez que as células danificadas tendem a descolorir (TAMBURIC et al., 2011).

Através da análise em espectrofotômetro foi possível a obtenção do teor de clorofila da biomassa de *Chlamydomonas reinhardtii*, conforme os valores apresentados na tabela 8.

Tabela 8 - Resultado da Análise de Teor de clorofila

Descrição	mg.L ⁻¹
Clorofila <i>a</i>	21,188
Clorofila <i>b</i>	32,948
Clorofila <i>a + b</i>	54,136

Fonte: Autor, (2016)

Depois do carbono, o nitrogênio é o nutriente mais importante para a produção de biomassa. Respostas típicas a limitação de nitrogênio são a descoloração da célula (diminuição das clorofilas e aumento dos carotenoides) e o acúmulo de carbono orgânico na forma de polissacarídeos e lipídios (BECKER, 1994).

O alto teor de clorofilas *a* e *b* está diretamente relacionada ao baixo teor de lipídios. Em meios de cultivo onde o nitrogênio está presente o teor de clorofila tende a aumentar (BECKER, 1994 e SIAUT et al., 2011).

Valores próximos a este estudo foram encontrados na literatura Lan et al., (2013) 37,50 mg.L⁻¹ de teor de clorofila quando a microalga *Chlamydomonas reinhardtii* foi exposta a luz artificial na intensidade de 900 lx, assim foi possível verificar que a clorofila extraída neste estudo é equivalente aos estudos realizados por outros autores.

5.4 Determinação de Proteínas e Carboidratos Totais da biomassa de *Chlamydomonas reinhardtii*

A determinação de proteínas e carboidratos da biomassa de *Chlamydomonas reinhardtii* foi realizada pela metodologia descrita pelo (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985) e os resultados estão descritos na Tabela 9.

Becker, (1994), Choi; Nguyen e Sim, (2010); Díaz et al., (2014) analisando *Chlamydomonas reinhardtii* encontram valores significativos de teor de proteínas e carboidratos em peso seco nos cultivos em condições controladas.

**Tabela 9 - Resultado da Análise de Teor de Proteína
Chlamydomonas reinhardtii % peso seco**

Proteínas	29,39
Carboidratos	14,92

Fonte: Autor, (2016)

A variação nos resultados é determinada pelo que se espera de cada estudo, Cakmak et al., (2014) por exemplo, com *C. reinhardtii* (CC-124 e CC-125) sob privação de nitrogênio e fósforo no meio de cultivo, observaram redução do teor de proteínas totais em ambas as cepas cultivadas em meio TAP sem nitrogênio, comparado ao cultivo realizado com presença deste nutriente, e Choi; Nguyen e Sim, (2010) também tiveram resultados significativos de carboidratos em seu estudo quando o objetivo era a produção de etanol.

Os resultados obtidos pelos autores citados corroboram com os deste trabalho, demonstrando assim, que os nutrientes utilizados para o meio de cultivo, transforma-se em substância de reserva energética, como carboidratos e lipídios, portanto, alterações nas condições de cultivo, podem ser interessantes para a produção em maior escala e viável economicamente, principalmente, substâncias energéticas destinadas à produção de biocombustíveis.

5.5 Extrato etéreo para obtenção de lipídios da biomassa de *Chlamydomonas reinhardtii*

Pelo método Sokhlet – (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985) a biomassa de *Chlamydomonas reinhardtii* foi analisada e extraído-se o extrato etéreo descrito na Tabela 10.

Na extração etérea da biomassa para obtenção de lipídios foi utilizado um solvente polar – Éter, nesta reação devido as moléculas de lipídios serem apolares e não se ligarem com facilidade às do solvente, sua liberação torna-se mais difícil, indicando percentuais mais baixos de lipídios.

Tabela 10 - Resultado da Análise de Extrato Etéreo

Solvente	Método	% peso seco
Éter	Sokhlet	3,22%

Fonte: Autor, (2016)

El-Sheekh e Hamouda, (2016), em seu estudo de eficiência de solventes e métodos de extração, utilizaram como solvente polar isopropanol em uma mistura com hexano na proporção 1:1 onde também houve obtenção de percentuais mais baixos de lipídios com este tipo de solvente.¹

5.5.1 Teor lipídico da biomassa de *Chlamydomonas reinhardtii*

Na extração pelo método de Bligh e Dyer (1959) adaptado por Ryckebosch, Muylaert e Foubert (2012) da biomassa para obtenção de lipídios foi utilizado um solvente apolar – Clorofórmio, nesta reação como as moléculas de lipídios também são apolares a ligação com o solvente é facilitada, obtendo-se assim maiores percentuais de lipídios.

O resultado encontrado através deste método está disposto na Tabela 11.

Tabela 11 - Resultado da Análise de Teor Lipídico

Solvente	Método	% peso seco
Clorofórmio	Bligh e Dyer	4,03

Fonte: Autor, (2016)

Corroborando com esta informação El-Sheekh e Hamouda, (2016), em seu estudo de eficiência de solventes e métodos de extração, utilizaram como solventes apolares uma mistura de Clorofórmio:Metanol na proporção 1:1 onde foi possível observar o aumento no percentual de lipídios extraídos com este tipo de solvente.

5.6 Reação *in situ* - Reação de Esterificação do Óleo de Microalgas

A tabela 12 apresenta a quantidade total de ésteres etílicos produzidos a partir da biomassa da microalga *Chlamydomonas reinhardtii* em mg de éster/g de biomassa, onde os melhores resultados foram obtidos na temperatura de 60° C nos tempos de 30 minutos 1,504 mg de éster/g de biomassa, 1,518 mg de éster/g de biomassa em 45 minutos e 60 minutos 1,509 mg de éster/g de biomassa.

Tabela 12 - Quantidade de ésteres obtidos

Temperatura (°C)	Tempo (minutos)			
	15	30	45	60
	mg de éster/g de biomassa	mg de éster/g de biomassa	mg de éster/g de biomassa	mg de éster/g de biomassa
30	0,065	0,071	0,073	0,436
45	0,030	0,321	0,413	0,394
60	0,601	1,504	1,542	1,509
75	0,022	0,337	0,610	0,490

Fonte: Autor, (2016)

A partir dos resultados obtidos nas reações *in situ*, para a microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, foi possível observar que as maiores quantidades de ésteres em mg/g de biomassa ocorreram na temperatura de 60 °C nos tempos de reação de 45 minutos. O mesmo resultado podemos observar na Figura 13 em que temos a quantidade de éster obtido por grama de biomassa versus a temperatura. Pela análise descritiva observa-se que a maior quantidade de éster produzida foi para a temperatura de 60 °C, independentemente do tempo de reação as maiores quantidades foram obtidas nesta temperatura.

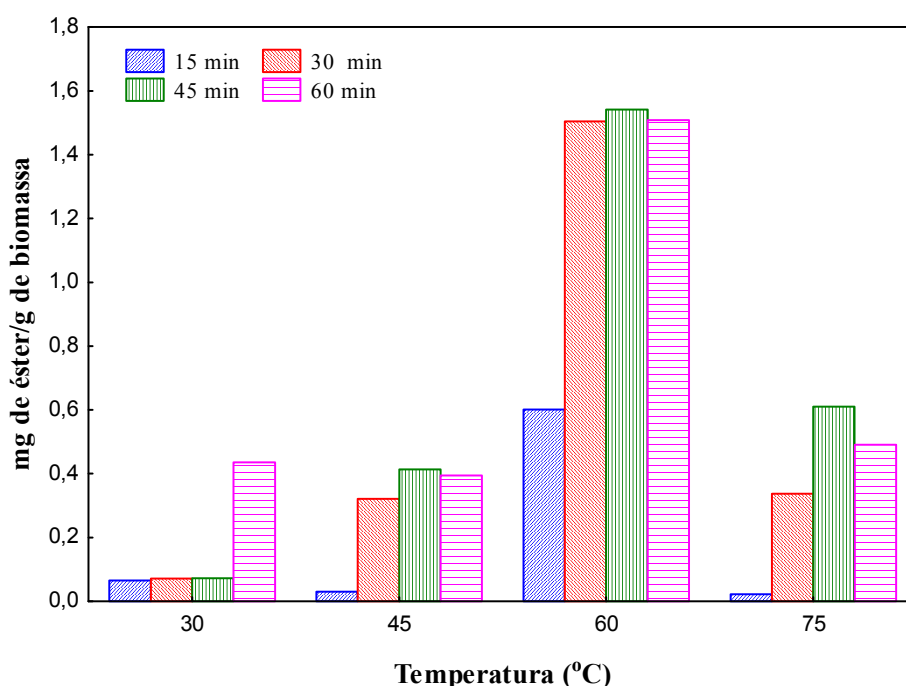


Figura 13 - Concentração de éster obtido nos diferentes tempos e temperaturas da reação

Fonte: Autor, (2016)

O resultado obtido para o perfil de ésteres produzidos nas reações é apresentado na Tabela 13. De maneira geral, destaca-se a elevada concentração de C15 e C16 em todas as temperaturas de reação. 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, e em relação às propriedades de fluxo a frio torna-se difícil definir qual seria a tendência, pois o perfil apresenta-se mais saturado e com poucos ésteres de baixo peso molecular (cadeia menor).

Tabela 13 -% de perfil de ésteres etílicos obtidos (média)

Ésteres	Temperatura de reação (°C)			
	30	45	60	75
C11	0,25	0,41	1,20	1,19
C12	0,35	0,00	0,30	0,33
C14	1,54	3,38	4,81	7,16
C15	15,31	12,57	10,28	10,31
C16	76,97	58,21	64,05	56,79
C17	0,79	4,06	2,66	4,91
C18	0,76	2,14	5,77	4,97
C20	4,09	19,23	10,99	14,35

Fonte: Autor, (2016)

Com exceção aos rendimentos em ésteres obtidos a 75 °C, nas demais condições o aumento da temperatura leva a um aumento nos rendimentos em ésteres. De acordo com Baumgartner, (2013) nas reações *in situ* com biomassa algácea, a produção de ésteres pode passar por um máximo seguido de uma diminuição e estabilização com o tempo de reação, indicando que outras reações ocorrem, além da reação de transesterificação/esterificação ácida.

A reação para a formação de ésteres via catálise ácida é reversível, contudo, a quantidade de álcool em excesso tende a limitar a reação reversa, deslocando o sentido da reação para a formação dos produtos, mas nestas condições de reação *in situ*, em que triacilglicerídeos, água, álcool e catalisador ácido estão juntos em um 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 e na reação de hidrólise dos ésteres, ácido carboxílico e álcool são produzidos (BRUICE, 2006). Até que este equilíbrio seja atingido no sistema, a cinética de reação de esterificação sofre alterações em função do tempo, como pode ser visto mais especificamente na temperatura de 75 °C (60 min) (BRUICE, 2006; PISARELLO et al., 2010).

A partir dos resultados obtidos foi realizada uma análise estatística, sendo que a análise de variância, Teste de Tukey indicaram que as maiores quantidades de massa de éster produzida foram na temperatura de 60 °C Figura 14.

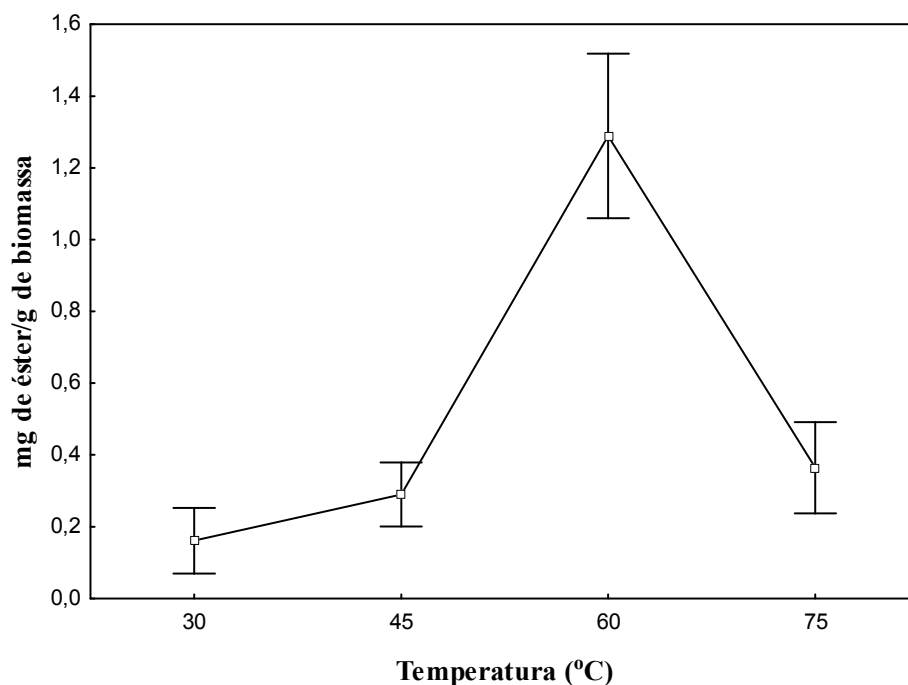


Figura 14 - Média e desvio da média das concentrações de ésteres para as diferentes temperaturas de reação – Análise de Variância

Fonte: Autor, (2016)

A adição de solvente no processo, de acordo com Xu e Mi (2011), é imprescindível para o para o sucesso da transesterificação *in situ*.

O processo de transesterificação/esterificação *in situ* demonstrou ser promissora a produção de biodiesel, principalmente porque mesmo em baixas temperaturas, e com pouco tempo de reação, consegue-se identificar ésteres etílicos. Assim sugere-se o desenvolvimento desta tecnologia, para torna-la viável e competitiva em relação às abordagens existentes e/ou às mais recentes, dentro da indústria de combustíveis renováveis (HAAS e WAGNER, 2011).

A partir do teste de Tukey aplicado aos rendimentos em ésteres nas reações *in situ*, pode-se observar que os melhores rendimentos foram obtidos a 60 °C, durante 30, 45 e 60 minutos. Estes resultados são apresentados na Tabela 13.

A reação, foi crescente nas temperaturas de 30, 45 e 60 °C. Para as reações realizadas a 75 °C se mostrou menos eficaz e crescente.

Pode ser observado que nas reações *in situ* com a biomassa algácea (Figuras 13 e 14), 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 2). 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, consequentemente, 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 13 e 14) (BRUICE, 2006; PISARELLO et al., 2010).

6. CONCLUSÃO

Chlamydomonas reinhardtii cultivada com meio TAP, sob condições controladas fez com que se obtivesse uma significativa produtividade se comparado com o meio MC.

Na recuperação da biomassa da solução, a adição de flocculante catiônico Tanfloc, possibilitou máxima recuperação da biomassa celular, este processo é eficaz e também mantém a biomassa limpa, sem contaminação química por parte do flocculante, uma vez que este é orgânico.

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.

Nas reações *in situ* os melhores rendimentos foram conseguidos a temperatura de 60 °C nos tempos de reação de 30 e 60 minutos.

A produção de ésteres etílicos a partir do óleo da biomassa de microalgas, via 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.

O rendimento do teor lipídico e da quantificação de ésteres de *Chlamydomonas reinhardtii*, através da extração de lipídios e reação *in situ* respectivamente por ser uma fonte renovável, apresenta neste estudo potencial para a produção de biodiesel, evidenciando a importância do desenvolvimento de novos trabalhos, na linha de pesquisa do respectivo trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, A.L., MAT YASIN, N.H., DEREK, C.J.C., LIM, J.K., Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review Renewable & sustainable energy reviews [1364-0321] 2011 vol:15 fasc:1 pág:584 -593

ANDRADE. M. R., COSTA, J. A. V. Culture of Microalga *Spirulina platensis* in Alternative Sources of Nutrients. *Ciência e agrotecnologia*, Lavras, 2008, Vol. 32, nº 5, p.1551-1556

ARAUJO, F. P., PAZ, G. M., OLIVEIRA, Y. L., LEITE, C. H. P. Estudo da Viabilidade de Microalgas para Produção de Biodiesel. In: CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO, 7, 2012, Palmas. Anais. Palmas. 2012

BAUMGARTNER, T. R. S., Biomass Production and Ester Synthesis by *In Situ* Transesterification/Esterificacion Using the Microalga *Spirulina platensis*. Maringá: Departamento de Engenharia Química/Universidade Estadual de Maringá, 2013 International Journal of Chemical Engineering, v. 2013, p. 1-7, 2013. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/ijce/2013/425604/> Acesso em: 01.fev.2016

BECKER, E. W. MICROALGAE: BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY. CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, 1994, 293P.

BECKER, E. W., Microalgae: Biotechnology and Microbiology. Cambridge University Press, 1994, 293p, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T4X-4MDGP8F-1&_user=686357&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000037518&_version=1&_urlVrsion=0&_userid=686357&md5=c85369df880a1190fb8dcd89670a1b2a>. Acesso em: 15.jul.2016. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.11.002

BENEMANN, J. Microalgae for Biofuels and Animal Feeds *Energies* 2013, 6, 5869-5886; doi: 10.3390/en6115869 ISSN 1996-1073 www.mdpi.com/journal/energies

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

BORGES, Lucélia; FARIA, Bias Marçal de; ODEBRECHT, Clarisse; ABREU, Paulo C. Potencial de absorção do dióxido de carbono atmosférico por microalgas utilizadas na aquicultura para a geração de um mecanismo de desenvolvimento limpo (MDL). Rio Grande, RS Mar 2005

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method for total lipid extraction and purification. (Extraction of Lipids in Solution by the Method of Bligh & Dyer). *Can. J. Biochem. Physiol.*, n. 37, p. 911–917, 1959

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

BORRMANN, D. Efeito do déficit hídrico em características químicas e bioquímicas da soja e na degradação da clorofila, com ênfase na formação de metabólitos incolores. 2009. 125 f. Tese (Doutorado em Bromatologia) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009 DOI: 10.11606/T.9.2009.tde-25092009-150741

BROWN, M.R., JEFFREY, S.W., VOLKMAN, J.K., DUNSTAN, G. A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, v.151, p.315-331, 1997. Disponível em:
<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T4D-3RH6WPV-&_user=686357&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000037518&_version=1&_urlVersion=0&_userid=686357&md5=849414074b0e5b998f281b13fe3e6360>. Acesso em: 20 jul. 2012 al. doi: 10.1016/S0044-*486(96)01501-3

BRUICE, A. Y. 2006, Organic Chemistry. Four Edition, Pearson education do Brasil, 1228p

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, nº. 4, 849-854

BUSTOS ARAGÓN A., BORJA PADILLA, R., FIESTAS ROS DE URSINOS, J.A. Experimental study of the recovery of algae cultured in effluents from the anaerobic biological treatment of urban wastewaters. *Resources, Conservation and Recycling*, 6 (1992) 293-302

CAKMAK, Z. E., ÖLMEZ, T. T.; ÇAKMAK, T.; MENEMEN, Y.; TEKINAY, T. Induction of triacylglycerol production in *Chlamydomonas reinhardtii*: Comparative analysis of different element regimes. *Bioresource Technology*. v. 155, p. 379–387, 2014

CAMPOS, V. B., BARBARINO, E., LOURENÇO, S. O. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. (2010) *Ciência Rural*, Santa Maria, v.40, n.2, p.339-347, fev, 2010 ISSN 0103-8478

CARELLI, G.; MACEDO, S.M.D.; VALDUGA, A.T.; CORAZZA, M.L.; OLIVEIRA, J.V.; FRANCESCHI, E.; VIDAL, R.; JASKULSKI, M.R Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. - Hil) obtido por extração com CO₂ supercrítico *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, v.13, n.1, p.110-115, 2011

CAVALCANTI, V. F., SAUER, B. E. L., PRADO, M. R., SAKUMA, A. C., PEGORARO, L. A., RAMOS, L. P. Cultivo da Microalga *Chlorella Vulgaris* em Fotobiorreator de Placas Planas e Produção de Ésteres por Transesterificação *In Situ*. *Revista Brasileira de Energias Renováveis*, v. 3, p. 244- 254, 2014

CHISTI Y., Biodiesel from Microalgae. *Biotechnol Adv* (2007) 25, 294–306

CHOI, S. P., NGUYEN, M. T., SIM, S. J. Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. *Bioresource Technology* 101 (2010) 5330–5336, journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech

DANESI, E. D. G.; RANGEL-YAGUI C. O.; SATO S.; MONTEIRO DE CARVALHO J. C. Growth and Content of *Spirulina Platensis* Biomass Chlorophyll cultivated at different values of light intensity and temperature using different nitrogen sources. *Brazilian Journal of Microbiology* (2011) 42: 362-373

DARNELL, J.; LODISH, H.; BALTIMORE, D.; *Molecular Cell Biology*; Scientific American Books; New York, 1990. In: ZAIA, D. A. M., ZAIA, C. T. B. V., LICHTIG, J. Determinação de Proteínas Totais via Espectrofotometria: Vantagens e desvantagens dos métodos existentes (1998) *QUÍMICA NOVA*, 21(6)

DEDÊ, M. A. B., SALES, M. G. F.; Mecanismo de desenvolvimento limpo de etanol e biodiesel utilizando algas verdes a partir de uma metodologia para macrorredução, educação ambiental e o desenvolvimento sustentável. *Centro Científico Conhecer - Goiânia*, vol.6, n.9, 2010 Pág.1

DE HOLANDA, L. R., O Cultivo de Microalgas para a geração de eletricidade. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2011, VII Congresso Nacional de Excelência. Disponível em: <http://www.ppgep.org.br/dissertacoes/MA-0237.pdf> Acesso em: 15.jul.2016

DEL CAMPO, J. S. M., PATIÑO, R. Harvesting Microalgae Cultures With Superabsorbent Polymers: Desulfurization of *Chlamydomonas reinhardtii* for Hydrogen Production *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 110, No. 12, December, 2013 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.24989/abstract>

DEMIRBAS, A., Progress and recent trends in biodiesel fuels *Energy Conversion and Management* 50 (2009) 14–34. doi:10.1016/j.enconman.2008.09.00

DEMIRBAS, A., DEMIRBAS, M. F., Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Conversion and Management* 52 (2011) 163–170. doi: 10.1016/j.enconman.2010.06.055

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

DÍAZ, G. C., CRUZ, Y. R., FORTES, M. M., VIEGAS, C. V., CARLIZ, R. G., FURTADO, N. C., ARANDA, D. A. G. Primary Separation of Antioxidants (Unsaponifiables) the Wet Biomass Microalgae *Chlamydomonas sp.* And Production of the Biodiesel. *Natural Science*, 2014, 6, 1210-1218. <http://www.scirp.org/journal/ns> <http://dx.doi.org/10.4236/ns.2014.615108>

EL-SHEEKH M. M., HAMOUDA, R. A. Lipids extraction from the green alga *Ankistrodesmus falcatus* using different methods. *Rend. Fis. Acc. Lincei* (2016) 27:589–595 DOI 10.1007/s12210-016-0528-4

FAO. Algae-Bases Biofuels - Applications and Co-products. Roma, Italy. 2010.

FEUGE, R.O., GROS, A. T. Modification of Vegetable Oils. VII. Alkali Catalyzed Interesterification of Peanut Oil with Ethanol. *The Journal of the American Oil Chemists's Society*, March 1949

FILLIÈRES, R., BENJELLOUN-MLAYAH, B., DELMAS, M. Ethanolysis of Rapeseed Oil: Quantitation of Ethyl Esters, Mono-, Di-, and Triglycerides and Glycerol by High-Performance Size-Exclusion Chromatography *JAOCS*, Vol. 72, no. 4 (1995)

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

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

GERPEN, J. V. Biodiesel processing and production. *Fuel Processing Technology*, 2005, 86, 1097– 1107

GALLAGHER, B. J. The economics of producing biodiesel from algae. *Renewable Energy*, 2011, Vol. 36, 158-162.

GANONG, W. F. Review of Medical Physiologyb; 17^a edição, Prentice-Hall Inc.; San Francisco, 1995. **In:** ZAIA, D. A. M., ZAIA, C. T. B. V., LICHTIG, J. Determinação de Proteínas Totais via Espectrofotometria: Vantagens e desvantagens dos métodos existentes (1998) *QUÍMICA NOVA*, 21(6) 1.

MORAIS, M. G., COSTA, J. A. V., Perfil de Ácidos Graxos de Microalgas Cultivadas com Dióxido de Carbono. *Ciência e Agrotecnologia, Lavras*, 2008, Vol. 32, n° 4, 1245-1251

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

HALIM, R., GLADMAN, B., DANQUAH, M. K., WEBLE, P. A. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource Technology* 102 (2011) 178–185. Journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech DOI: 10.1016/j.biortech.2010.06.136 Acesso em: 07.ago.2016

HALL, D.O., RAO, K.K., 1994. Photosynthesis, fifth ed. Cambridge University Press, Cambridge

HENDERSON, R., PARSONS, S. A., JEFFERSON, B., The impact of algal properties and pre-oxidation on solid–liquid separation of algae WATER RESEARCH 42 (2008) 1827 – 1845 DOI:10.1016/j.watres.2007.11.039

HIRANO, A., UEDA, R., HIRAYAMA, S., OGUSHI, Y., 1997. CO₂ fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation. Energy 22, 137–142

JONES, CARLA S.; MAYFIELD, STEPHEN P., Algae Biofuels: versatility for the future of bioenergy. Current Opinion Biotechnology, 2012, 23:346-351 DOI: 10.1016/j.copbio.2011.10.013

JUSSIAK, M. P., DUSZOTA, M., MATUSIAK, K., MYCIELSKI, ROMAN., Intensive culture of *Chlorella Vulgaris*/AA as the second stage of biological purification of nitrogen industry wastewaters Water Res. 1984, Vol. 18. N^o. 1. p.1-7

HU, Q., SOMMERFELD, M., JARVIS, E., GHIRARDI, M.L., POSEWITZ, M.C., SEIBERT, M., et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production. The Plant Journal 2008; 54:621–39.

KNOTHE, G., GERPEN, J. V., KRAHL, J., RAMOS, L. P., Manual do Biodiesel. Editora Edgard Blücher, São Paulo-SP, 2005

KNOTHE, G. “Designer” Biodiesel: Optimizing Fatty Ester Composition to Improve Fuel Properties. Energy & Fuels, 2008, 22: 1358-1364

KUMAR, R. R., RAO, P. H., ARUMUGAM, M. Lipid extraction methods from microalgae: a comprehensive review REVIEW ARTICLE published: 08 January 2015 DOI: 10.3389/fenrg.2014.00061

LAN, J. C., RAMAN, K., HUANG, CHUN, CHANG, C. The impact of monochromatic blue and red LED light upon performance of photo microbial fuel cells (PMFCs) using *Chlamydomonas reinhardtii* transformation F5 as biocatalyst. Biochemical Engineering Journal 78 (2013) 39 – 43. <http://dx.DOI.org/10.1016/j.bej.2013.02.007>
journal home page: www.elsevier.com/locate/bej

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

LIBESSART, N., MADDELEIN, M.L., KOORNHUYSE, N., DECQ, A., DELRUE, B., MOUILLE, G., D'HULST, C., BALL, S., 1995. Storage, photosynthesis and growth: the conditional nature of mutations affecting starch synthesis and structure in *Chlamydomonas*. Plant Cell 7, 1117–1127

LÔBO, Ivon Pinheiro; FERREIRA, Sergio Luis Costa. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. Quim. Nova, vol. 32, nº 6, Jul.2009. Disponível em < <http://www.scielo.br/pdf/qn/v32n6/44.pdf> > acesso em 02.ago.2016

LOURENÇO, S. O. Cultivo de Microalgas Marinhas - Princípios e Aplicações. Rima, 2006 p 606

MA, F., HANNA, M. A. Biodiesel Production: A Review. Bioresource Technology, 1999, 70, 1-15

MARTINS A. A. Estudo da influência de parâmetros ambientais (Fe e N) na produtividade lipídica da microalga *Chlamydomonas* sp. 122 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Instituto Superior de Engenharia do Porto, 2012

MATA, T. M., MARTINS, A. A., CAETANO, N. S., Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew Sust Energy Rev* 2010;14:217–32

MENEZES, R. S., SOARES, A. T., LOPES, R. G., MAGNOTTI, C., DERNER, R. B., MORI, C. C., VIEIRA, A. A. H., E ANTONIOSI FILHO, N. R. Evaluation of fatty acid composition of the microalgae *Choricystis minor* var. *minor* according to two different nutrient feeding strategies. *Journal of Renewable and Sustainable Energy* 7, 043117 (2015). <http://dx.doi.org/10.1063/1.4926908>

MÉTODOS FÍSICOS E QUÍMICOS PARA ANÁLISE DE ALIMENTOS – 4ª Edição – 1ª Edição Digital Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea, São Paulo, 2008 – In INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Câmara Brasileira do Livro-SP, 3ª Edição, Vol. 1. São Paulo, 1985

MERCHANT, S. S. et al. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, v. 318, p. 245-251, 2007.

MIAO, X., WU, Q., Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology* 97 (2006) 841-846

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

MOROWVAT, M. H., RASOUL-AMINI, S., GHASEMI, Y. *Chlamydomonas* as a “new” organism for biodiesel production *Bioresource Technology* 101 (2010) 2059–2062. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.11.03 journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech

MOU, S., XU, D., YE, N., ZHANG, X., LIANG, C., LIANG, Q., ZHENG, Z., ZHUANG, Z., MIAO, J., Rapid estimation of lipid content in an Antarctic ice alga (*Chlamydomonas sp.*) using the lipophilic fluorescent dye BODIPY505/515. J Appl Phycol (2012) 24:1169–1176 DOI 10.1007/s10811-011-9746-4

MULBRY, W., KONDRAD, S., PIZARRO, C., KEBEDE-WESTHEAD, E. Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: Algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers. Bioresource Technology 99 (2008) 8137–8142 DOI:10.1016/j.biortech.2008.03.073

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

OZGÜIL, S., TÜRKAY, S. In situ Esterification of Rice Bran Oil with Methanol and Ethanol. The American Oil Chemists' Society JAOCS, Vol. 70, nº. 2 (February 1993)

PALOMINO M, A, ESTRADA F, C., e LÓPEZ, C. Microalgas: Potencial para la producción de biodiesel. João Pessoa, PB. 2010. Disponível em <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/855024/1/BID07.pdf>> acesso em 05.ago.2016

PEREIRA, C. M. P., HOBUSS, C. B., MACIEL, J. V., FERREIRA, L. R., DEL PINO, F. B. E MESKO, M. F., Biodiesel renovável derivado de microalgas: Avanços e perspectivas tecnológicas. Química Nova, Vol. 35, No. 10, 2013-2018, 2012

PIJST, H.L.A., DRIEL, R., JANSSENS, P.M.W., MUSGRAVE, A., ENDE, H. Cyclic AMP is involved in sexual reproduction of *Chlamydomonas eugametos*. Elsevier Science Publishers B. V. Volume 174, number 1, p.132 -136, 1984

PIPES, W. O., GOTAAS, H. B. Utilization of Organic Matter by *Chlorella* Grown in Sewage <http://aem.asm.org>, 1960 Acesso em: 19.jul.2016

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

POELMAN, E., PAUW, N. D. e JEURISSEN, B. Potential of electrolytic flocculation for recovery of microalgae. *Conservation and Recycling*, V. 19 (1997), p. 1-10 PII S0921-3449(96)01 1 56-1

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, v. 100, p. 261-268, 2009.

RAMOS, L. P.; SILVA, F. R.; MANGRICH, A. S.; CORDEIRO, C. S. Tecnologias de Produção de Biodiesel. *Rev. Virtual Quim.* 2011, 3 (5), 385-405 <http://www.uff.br/rvq>

REDA A.I. ABOU-SHANAB, IBRAHIM A. MATTER, SU-NAM KIM, YOU-KWAN OH, JAEYOUNG CHOI, BYONG-HUN JEON. Characterization and identification of lipid-producing microalgae species isolated from a freshwater lake. <http://www.elsevier.com/locate/biombioe>. *Biomass and bioenergy* 35 (2011) 3079 e 3085. DOI:10.1016/j.biombioe.2011.04.021

RICHMOND, A. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* Edited by Amos Richmond Blackwell Science Ltd., 2004

ROCHA, J., GARCIA. E HENRIQUE, M. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomolecular Engineering*, v. 20, (2003) n. 4-6, p. 237-242, DOI: 10.1016/S1389-0344(03)00061-3

RODOLFI, L., ZITTELLI, G.C., BASSI, N., PADOVANI, G., BIONDI, N., BONINI, G., et al. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 2008; 102(1):100–12

RODRIGUES, J. B.R., BELLI FILHO, P., Eficiência da microalga *Chlorella minutissima* no tratamento de resíduos de suinocultura enriquecido com uréia. Biotemas, 2004, 17 (2): 7 – 26

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

SÁNCHEZ, S., MARTÍNEZ, M.E., ESPEJO, M.T., PACHECO R., ESPINOLA, F., HODAIFA, G., Mixotrophic culture of *Chlorella pyrenoidosa* with olive-mill. Journal of Applied Phycology, 2001, Vol.13(5), pp.443-449

SCHENK P.M., THOMAS-HALL S.R., STEPHENS E., MARX U.C., MUSSGNUG J.H., POSTEN C., Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. Bioenergy RES. 2008; 1:20–43. <http://DX.DOI.ORG/10.1007/S12155-008-9008-8>

SCHMITZ, R.; DAL MAGRO, C.; COLLA, L. M. APLICAÇÕES AMBIENTAIS DE MICROALGAS. REVISTA CIATEC-UPF, V. 4, N. 1, P. 48-60, 2012.

SCHOEFS B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. Trends in Food Science & Technology, v.13, p.361-371, 2002

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

SCHWARTZ, S. J., LORENZO, T. V. Chlorophylls in foods. Food Science and Nutrition, v. 29, n 1, 1990 In: BORRMANN, D. Efeito do déficit hídrico em características químicas e bioquímicas da soja e na degradação da clorofila, com ênfase na formação de metabólitos incolores. 2009. 125 f. Tese (Doutorado em Bromatologia) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009 DOI: 10.11606/T.9.2009.tde-25092009-150741

SHEEHAN, J. et al. A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program - Biodiesel from Algae. 328p. July 1998.

SIAUT, M., CUINÉ, S., CAGNON, C., FESSLER, B., NGUYEN, M., CARRIER, P., BEYLY, A., BEISSON, F., TRIANTAPHYLIDÈS, C., LI-BEISSON, Y., PELTIE, G. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves BMC Biotechnology 2011, 11:7 <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/11>

SRIVASTAVA, A., PRASAD, R. Triglycerides-based diesel fuels Renewable and Sustainable Energy Reviews 4 (2000) 111-133 www.elsevier.com/locate/rser PII: S1364-0321(99)000 3-1

SUAREZ, P. A. Z., MENEGHETTI, S. M. P., MENEGHETTI, M. R., WOLF, C. R., Transformação de Triglicérides em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: Algumas aplicações da catálise na oleoquímica. Quim. Nova, 2007, Vol. 30, nº. 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

TAIZ, L., ZIEGLER, E. Fisiologia vegetal. 3ª.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.693
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 J Appl Phyczhuol (2007) 19:719–726 DOI: 10.1007/s10811-007-9215-2

TAMBURIC, B., ZEMICHAEL, F. W.; MAITLAND, G. C.; HELLGARDT, K. Parameters affecting the growth and hydrogen production of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* International Journal of Hydrogen Energy, v. 36, p. 7872-7876, 2011

TENNEY, M. W., ECHELBERGER, W. F. JR., SCHUESSLER, R. G., PAVONI, J. L. Algal Flocculation with Synthetic Organic Polyelectrolytes. *Applied Microbiology*, 1969, 18(6): pp. 965-971.

UEDA, R., HIRAYAMA, S., SUGATA, K., NAKAYAMA, H. Process for the production of Ethanol from microalgae U.S. Patent, Nov. 26, 1996 Sheet 1 of 3 Patent Number: 5,578,472

UGWU, C. U.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Influence of irradiance, dissolved oxygen concentration, and temperature on the growth of *Chlorella sorokiniana*. *Photosynthetica*, v. 45, n. 2, p. 309-311, 2007.

WONG, M. H., LAY C. C., The Comparison of Soy-bean wastes, used tealeaves and sewage sludge for growing *Chlorella Pyrenoidosa*. *Environmental Pollution (Series A)* 23 (1980) 247-259

VIDOTTI, E. C. E ROLLEMBER, M. C. E. Algas: Da Economia nos ambientes aquáticos à Bioremediação e à química analítica (2004) *Quim. Nova*, Vol. 27, No. 1, 139-145, 2004

VILLELA, H. D. M. Utilização das Técnicas de Engenharia Genérica e Bioquímica em *Chlamydomonas reinhardtii* visando o aumento da produção de lipídios para obtenção de biocombustível, 2014. 139p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo

VISENTAINER, J. V., FRANCO, M. R. B., 2006, Ácidos Graxos em Óleos e Gorduras: Identificação e Quantificação, Ed. Varela, São Paulo, 120p

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

WEYER, K. M., BUSH, D. R., DARZINS, A., WILLSON, B. D. Theoretical Maximum Algal Oil Production Bioenerg. Res. (2010) 3:204 – 213 DOI 10.1007/s12155-009-9046-x

WIDJAJA, A., CHIEN, C. C., JU, I. H., Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. 2009, Vol. 40, 13–20. Disponível em: http://personal.its.ac.id/files/pub/2986-arief_w-chem-eng-widjaja%2009.pdf. Acesso em: 03.ago.2016

XIONG, Q., PANG Q., PAN X., OKONKWO CHIKA A., WANG L., SHI, J., JIA, L., CHEN, C., GAO Y. Facile sand enhanced electro-flocculation for cost-efficient harvesting of *Dunaliella salina*. Bioresource Technology 187 (2015) 326–330. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.135>

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

ZHAO, G., CHEN, X., WANG, L., ZHOU, S., FENG, H., CHEN, W. N., LA, R. Ultrasound assisted extraction of carbohydrates from microalgae as feedstock for yeast fermentation. Bioresource Technology Volume 128, January (2013), Pages 337–344 <http://dx.doi.org.ez89.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.biortech.2012.10.038>

ANEXOS

A₁

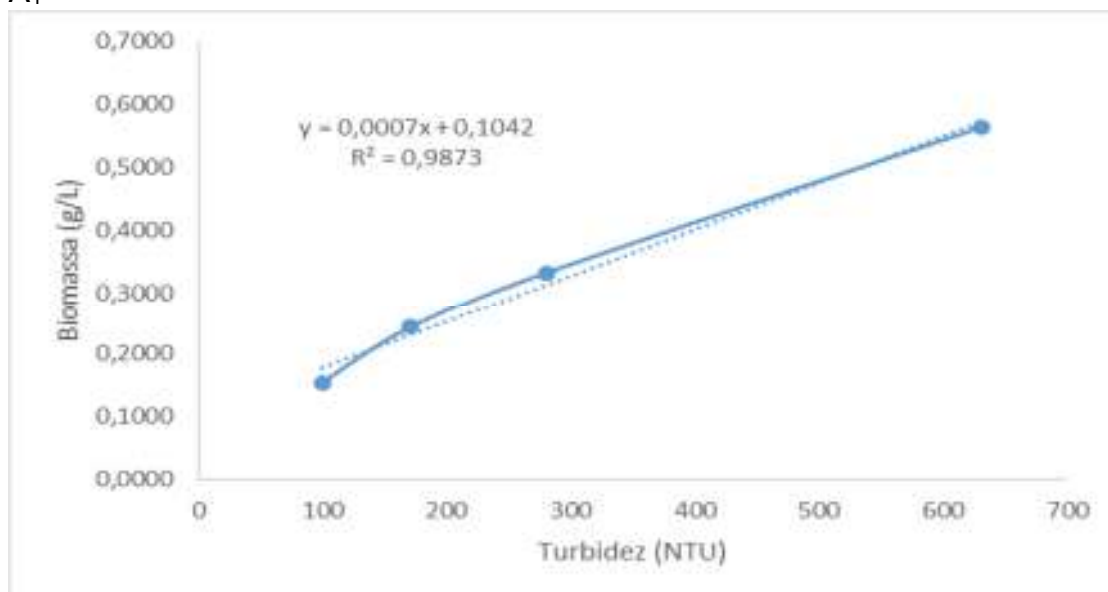


Gráfico 1 – Curva de calibração de *Chlamydomonas reinhardtii*

A2



+UNIOESTE - UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
 Campus de Toledo - PR - CNPJ 78.680.337/0005-08
 Laboratório de Qualidade de Alimentos - Rua da Faculdade, 645 -
 Jd. Santa Maria - Fone/Fax: (45) 3379-7063 CEP
 85903-000 - Toledo - PR. - lqa-unioeste@hotmail.com
 Aprovado pelo PARECER 130/2010 - DG de 11 de Agosto de 2010

LAUDO DE ANÁLISE

PROTOCOLO 0629/2016

CLIENTE Simone Cristina Rodrigues
ENDEREÇO

CEP
CIDADE Toledo UF PR

IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO LOTE
 Microalga *Chlamydomonas Reinhardtii*
FORNECEDOR
 Simone

Data de Fabricação

Data da Coleta

Data de Envio
 05/07/2016

Data de Chegada ao Laboratório
 05/07/2016

Data de Liberação
 08/08/2016

CÓDIGO	ANÁLISE	RESULTADOS DE ANÁLISE	STATUS
101	UMIDADE	8,67	%
102	PROTEÍNA	29,39	%
103	EXTRATO ETÉREO	3,22	%
104	MATERIA MINERAL	41,10	%
105	FIBRA BRUTA	2,69	%

OBSERVAÇÕES
 Estes resultados têm validade apenas para a amostra analisada nas condições acima, não sendo extensivo a outros lotes que não este analisado.

Referências dos Métodos:
 AOAC. Official Methods of Analysis. 15ª ed. 2005;
 Instituto Adolfo Lutz. Métodos Físico-químicos para Análise de Alimentos. 4ª ed. 2005;
 SILVA, Dirceu Jorge; QUEIROZ, Augusto Cezar de. Análises de Alimentos. Métodos Químicos e Biológicos. 3ª ed. Minas Gerais: Editora UFV, 2005. p. 23-29



GLAUCIA MARA RORATO
 CRF 20530