

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG**  
**ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA E**  
**AMBIENTAL**

**Síntese de ésteres graxos a partir da biomassa da  
microalga *Chlorella sp.* por hidrólise “in situ”  
seguido de esterificação.**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Rui Carlos Medeiros Alves Sobrinho**

**Rio Grande, 2012.**

**Síntese de ésteres graxos a partir da biomassa da microalga *Chlorella sp.* por hidrólise “in situ” seguido de esterificação.**

por

**Rui Carlos Medeiros Alves Sobrinho**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental, Linha de Pesquisa em Química Orgânica Tecnológica, da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Química Tecnológica e Ambiental.**

Orientador: Prof. Marcelo Gonçalves Montes D'Oca

**Rio Grande, 2012.**

**Universidade Federal do Rio Grande – FURG**  
**Escola de Química e Alimentos**  
**Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a dissertação.

**Síntese de ésteres graxos a partir da biomassa da microalga  
Chlorella sp. por hidrólise “in situ” seguido de esterificação.**  
elaborada por

**Rui Carlos Medeiros Alves Sobrinho**

como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química  
Tecnológica e Ambiental

**Comissão Examinadora**

---

**Professor Dr. Marcelo G. Montes D’Oca (Presidente/ Orientador) FURG/EQA**

---

**Professor Dr. Luiz Antonio Mazzini Fontoura (Membro) ULBRA**

---

**Professor Dr. Joaquín Ariel Móron Villarreyes (Membro) FURG/EQA**

---

**Professora Dr<sup>a</sup> Rosilene Maria Clementin (Membro) FURG/EQA**

**Rio Grande, 30 de março de 2012.**

"A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável."

(Galileu Galilei)

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, Francisco Carlos e Zaida Maria e aos meus irmãos Francisco Carlos e Suelem, pelo carinho e apoio.

Ao meu cunhado Gilmar, minha sobrinha Julia e minhas afilhadas Marina e Antônia, pelo carinho e apoio.

A minha irmã Alexandra, em especial, pela amizade, companheirismo, paciência e carinho dedicados a mim nas horas mais difíceis de minha trajetória.

Ao Diego, pela compreensão e paciência nos momentos estressantes, e pelo constante incentivo, apoio e dedicação.

Ao Prof. Marcelo Gonçalves Montes D'Oca, pela orientação na realização deste trabalho.

À Luciana Piovesan, pelas correções e sugestões feitas a este trabalho.

Aos professores Paulo C. Abreu, Rosilene Maria Clementin, Paulo Henrique Beck, Luiz Antônio Mazzini Fontoura e Joaquín Ariel Morón Villarreyes, pelas considerações feitas neste trabalho e também aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental.

Ao Laboratório de Análise de compostos orgânicos e metais, em especial a Sergiane Caldas pela realização das análises cromatográficas.

Aos amigos da Escola de Química e Alimentos Iluminata (Lu), Marli, Rita, Jarbas, Rosane, Viviane e Juliano.

Aos colaboradores Laércio Vauchinski, Liziane Marube, Thainã Garcia e Sabrina Farias, pelo apoio na realização deste trabalho e aos amigos, Karina, Renata, Wystan, Sabrina e Vinicius do Laboratório Kolbe de Síntese Orgânica.

Aos colegas de mestrado e hoje amigos, Mariele, Tamara, Maria Angelis, Maria Carolina, Diego Siqueira, Katlen, Cássia, Daiane, Rodrigo, Patrick, Juliana e Renata.

Ao CNPq, Capes e Petrobras pelo apoio financeiro.

## RESUMO

**Título: Síntese de ésteres graxos a partir do processo de hidrólise seguido de esterificação da biomassa úmida da microalga *Chlorella sp.***

Autor: Rui Carlos Medeiros Alves Sobrinho

Orientador: Marcelo Gonçalves Montes D'Oca

Neste trabalho, a produção de ésteres graxos da biomassa úmida da microalga *Chlorella sp.* foi investigada pelo método de hidrólise seguido de esterificação e comparado com o método convencional de extração/transesterificação.

Na primeira etapa do processo de hidrólise “in situ” seguido de esterificação ocorreu à hidrólise, onde a água presente na biomassa (50 e 100% em massa) reagiu com os lipídios de reserva, na presença de  $H_2SO_4$  (20, 40 e 60% em massa), sendo obtidos os ácidos graxos brutos. Na segunda etapa do processo, os ácidos graxos foram submetidos à reação de esterificação por 1 ou 4 h na presença de metanol, na razão molar de 30:1 álcool:AG, com  $H_2SO_4$  10% em massa a 60 ou 100 °C. De acordo com os resultados obtidos no processo de hidrólise/esterificação, os melhores rendimentos – cerca de  $7,3 \pm 0,8\%$  de FAMEs, em relação a biomassa inicial – foram obtidos na presença de 60% de catalisador e 50% de umidade, na etapa de hidrólise e 100 °C por 4 h na etapa de esterificação. No método convencional de extração-transesterificação, os melhores rendimentos –  $7,1 \pm 1,8\%$  de FAMEs em relação à biomassa seca – foram obtidos utilizando a mistura de clorofórmio:metanol 2:1 v/v.

Em resumo os rendimentos obtidos nos dois métodos de produção de ésteres graxos foram próximos. No entanto, o processo de hidrólise “in situ” seguido de esterificação possui vantagens como a utilização da biomassa úmida.

Palavra-chave: hidrólise/esterificação; extração/transesterificação; *Chlorella sp.*

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA E AMBIENTAL

Dissertação de Mestrado em Química tecnológica e ambiental

Março de 2012.

## ABSTRACT

**Título: Synthesis of FAMEs fuel by hydrolysis–esterification process of moist biomass from *Chlorella sp.***

Autor: Rui Carlos Medeiros Alves Sobrinho

Orientador: Marcelo Gonçalves Montes D'Oca

The present work investigates the production of fatty acid methyl esters (FAMEs) by extraction–transesterification and hydrolysis–esterification process of moist biomass from *Chlorella sp.*

Initially, the hydrolysis process was performed on algal biomass at 60 °C and 100 °C for 1 and 4 h in the presence of 50% and 100% w/w water in relation to the biomass and sulfuric acid (20%, 40% and 60% w/w based on dry biomass). In this experiment, an amount of the hexane was necessary to promote the simultaneous extraction of the lipids produced from hydrolysis process. Next the esterification process was investigated at 100 °C for 4 h used H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> acid catalyst (10% in relation to fatty acid mass) for conversion of crude fatty acids to fatty acid alkyl esters. The results after hydrolysis–esterification process show that the process carried at 100 °C for 4 h using 50 % of water and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> acid catalyst (60% in relation to fatty acid mass) resulted in higher FAMEs yields, 7.3±0.8% in relation to the initial biomass.

The extraction-transesterification process resulted in similar FAEEs yields. The transesterification of the lipid extracts obtained by chloroform:methanol yielded 7.1±1.8 % in relation to initial biomass.

Finally, both the processes resulted in similar FAEEs yields. However, the hydrolysis–esterification process has advantages such as the use of moist biomass.

Keywords: hydrolysis–esterification; extraction-transesterification; *Chlorella sp.*

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA E AMBIENTAL

Dissertação de Mestrado em Química tecnológica e ambiental

Março de 2012.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AG – Ácido Graxo

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustível

ASTM – *American Society for Testing and Materials*

B5 – Mistura de diesel e biodiesel contendo um teor deste último correspondente a 5% em massa

FAAEs – Ésteres Alquílicos de Ácidos Graxos

FAEEs – Ésteres Etílicos de Ácidos Graxos

FAMEs – Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos

GC-MS – Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetria de Massas

IA – Índice de Acidez

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

S10 – Diesel com baixo teor de enxofre (10 ppm)

S50 – Diesel com baixo teor de enxofre (50 ppm)

TG – Triacilglicerol (Triglicerídeo)

TR – Tempo de retenção

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Cromatograma do perfil graxo da microalga <i>Chlorella sp.</i> .....	33
<b>Figura 2:</b> Fluxograma de produção de ésteres graxos da microalga <i>Chlorella sp.</i> .....	40
<b>Figura 3:</b> Espectro na região do infravermelho dos AG da microalga <i>Chlorella sp.</i> .....	47
<b>Figura 4:</b> Espectro na região do infravermelho dos FAMES da microalga <i>Chlorella sp.</i> .....	48
<b>Figura 5.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H dos FAMES da microalga <i>Chlorella sp.</i> .....	49

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Área necessária para o plantio de diversas oleaginosas para suprir 50% da demanda de combustível dos EUA. <sup>6</sup> .....	5
<b>Tabela 2:</b> Rendimentos das extrações e conversão em ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) obtidos pelos diferentes métodos. <sup>13</sup> .....	9
<b>Tabela 3:</b> Condições experimentais utilizadas para a extração/transesterificação e transesterificação “in situ”. <sup>11</sup> .....	13
<b>Tabela 4.</b> Médias dos teores lipídicos da microalga <i>Chlorella sp.</i> extraídos com os diferentes solventes.....	32
<b>Tabela 5:</b> Perfil graxo da fração lipídica extraída com metanol da microalga <i>Chlorella sp.</i> .....	34
<b>Tabela 6.</b> Médias dos rendimentos da extração da fração lipídica utilizando agitação magnética. ....	36
<b>Tabela 7:</b> Procedimento experimental para a transesterificação da fração lipídica obtida da biomassa seca.....	41
<b>Tabela 8:</b> Condições experimentais para a produção de ésteres metílicos de ácidos graxos pelo processo de hidrólise seguido de esterificação.....	43
<b>Tabela 9:</b> Perfis de ésteres alquílicos de ácidos graxos obtidos pelos dois processos estudados.....	50

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1:</b> Transesterificação catalítica de um triglicerídeo.....	1
<b>Esquema 2:</b> Reação de esterificação de um ácido graxo na presença de catalisador ácido e álcool.....	4
<b>Esquema 3:</b> Reação de formação de sabão.....	4
<b>Esquema 4:</b> Reação de hidrólise de um TG na presença de água e catalisador ácido.....	40
<b>Esquema 5:</b> Esterificação de um ácido graxo com metanol.....	41

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Rendimento na eficiência de recuperação celular relacionado com a velocidade de agitação. <sup>31</sup> .....	8
<b>Gráfico 2:</b> Eficiência na recuperação celular das microalgas <i>B. braunii</i> (A) e <i>C. ellipsoidea</i> (B), em relação a variação de pH e concentração de nanopartículas. <sup>31</sup> .....	8
<b>Gráfico 3:</b> Rendimento de FAMEs em diferentes concentrações de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> nas temperaturas de 30, 50 e 90 °C. <sup>14</sup> .....	10
<b>Gráfico 4:</b> Conversões obtidas nas diferentes razões molares álcool:óleo. <sup>14</sup> .....	11
<b>Gráfico 5:</b> Rendimentos obtidos na transesterificação utilizando catalisadores heterogêneos. <sup>16</sup> .....	12
<b>Gráfico 6:</b> Rendimento obtidos na extração, transesterificação e transesterificação “in situ” da microalga <i>Chlorella pyrenoidosa</i> . <sup>11</sup> .....	14
<b>Gráfico 7:</b> Rendimentos obtidos em FAMEs, utilizando catalisador NaOH (a) e H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (b). <sup>32</sup> .....	15
<b>Gráfico 8:</b> Rendimento em FAMEs em diferentes volumes de álcool e tempos de reação. <sup>33</sup> .....	16
<b>Gráfico 9:</b> Rendimento em FAMEs obtidos com o solventes <i>n</i> -hexano e clorofórmio. <sup>34</sup> .....	17
<b>Gráfico 10:</b> Rendimento em FAMEs em diferentes volumes de metanol. <sup>34</sup> .....	18
<b>Gráfico 11:</b> Rendimento em FAMEs nas diferentes temperaturas e tempos. <sup>34</sup> .....	18
<b>Gráfico 12:</b> Influência do volume de metanol e da temperatura na reação de transesterificação “in situ”. <sup>21</sup> .....	19
<b>Gráfico 13:</b> Influência da temperatura e tempo de reação no processo de transesterificação “in situ”. <sup>21</sup> .....	20
<b>Gráfico 14:</b> Efeito da umidade e temperatura no rendimento da reação de transesterificação “in situ”. <sup>21</sup> .....	20
<b>Gráfico 15:</b> Conteúdo lipídico obtido na reação de hidrólise em diferentes tempos de reação.....	21
<b>Gráfico 16:</b> Índice de acidez da fração lipídica extraída da microalga <i>Chlorella sp.</i> com os diferentes solventes.....	35
<b>Gráfico 17:</b> Médias obtidas na extração da fração lipídica utilizando de sonda de ultrassom com diferentes solventes e tempos de exposição à sonda de ultrassom.....	37
<b>Gráfico 18:</b> Rendimento médio obtido na extração da fração lipídica da microalga <i>Chlorella sp.</i> nos diferentes tempos e temperaturas.....	38

<b>Gráfico 19:</b> Rendimentos médios obtidos na extração da fração lipídica nas diferentes amplitudes utilizando metanol, tempo de 5 min e temperatura de 55 °C.....	39
<b>Gráfico 20:</b> Médias obtidas a partir da extração e transesterificação da microalga <i>Chlorella sp.</i> .....	42
<b>Gráfico 21:</b> Rendimento de ácidos graxos e de ésteres metílicos de ácidos graxos obtidos no processo de hidrólise/esterificação.....	44

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	3
2.1 MICROALGAS .....	6
2.2 PRODUÇÃO DE ÉSTERES ALQUÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS (FAAES) .....	10
2.2.1 Processo de extração/transesterificação .....	10
2.2.2 Obtenção de ésteres graxos pelo processo de transesterificação “in situ” .....	14
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	23
3.1 Geral .....	23
3.2 Específicos .....	23
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	24
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO LIPÍDICA .....	24
4.1.1 Determinação do teor lipídico da microalga <i>Chlorella sp.</i> .....	24
4.1.2 Índice de acidez .....	25
4.1.3 Determinação do perfil graxo .....	25
4.1.4 Determinação da massa molar média .....	26
4.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS .....	27
4.2.1 Extração de lipídios utilizando agitação magnética .....	27
4.2.2 Extração de lipídios utilizando sonda de ultrassom .....	28
4.3 SÍNTESE DE ÉSTERES ALQUÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS DA MICROALGA <i>Chlorella sp.</i> .....	28
4.3.1 Produção de FAAEs pelo processo de transesterificação da fração lipídica (método convencional) .....	28
4.3.2.1 Hidrólise (etapa 1) .....	29
4.3.2.2 Esterificação (etapa 2) .....	29
4.4 PURIFICAÇÃO .....	30
4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS ÉSTERES .....	30
4.5.1 Espectroscopia na região do infravermelho .....	30
4.5.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	31
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	32
5.1.2 Extração de lipídios utilizando sonda de ultrassom .....	33

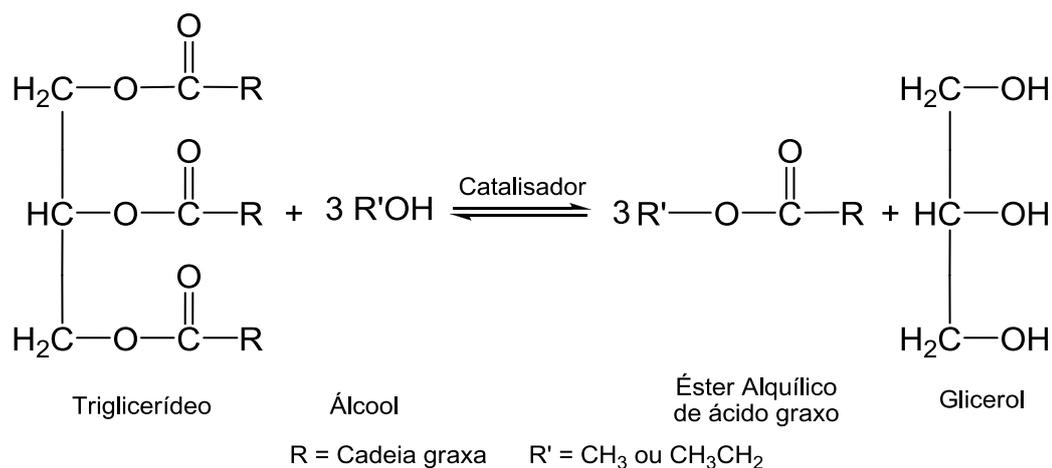
5.2 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO LIPÍDICA.....	36
5.2.1 Determinação do teor lipídico.....	36
5.2.2 Determinação do perfil graxo da microalga <i>Chlorella sp.</i> .....	37
5.2.3 Determinação do índice de acidez da fração lipídica extraída utilizando agitação magnética da microalga <i>Chlorella sp.</i> .....	38
5.3 PRODUÇÃO DE FAEEs PELO PROCESSO DE HIDRÓLISE SEGUIDO DE ESTERIFICAÇÃO. ....	40
5.3.1 Transesterificação da fração lipídica (método convencional). ....	41
5.3.2 Processo de obtenção de ésteres graxos por hidrólise “in situ” seguida de esterificação da biomassa úmida da microalga <i>Chlorella sp.</i> .....	43
5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS.....	46
5.4.1 Espectroscopia na região do infravermelho.....	46
5.4.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	46
<b>6. Conclusão.....</b>	<b>52</b>
<b>7. Bibliografia.....</b>	<b>54</b>

# 1. INTRODUÇÃO

O aumento do consumo de energia e o uso de combustíveis não-renováveis de origem fóssil, associado à influência desses em fatores climáticos, tem sido foco de vários estudos em busca de energias mais limpas. Neste contexto, os biocombustíveis têm despertado atenção especial, sendo substâncias derivadas de biomassa de origem renovável que podem substituir parcial ou totalmente os combustíveis de origem fóssil, tendo como principais exemplos o etanol e o biodiesel.<sup>22</sup>

O Biodiesel é uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos (FAAEs, *Fatty Acids Alkyl Esters*), geralmente oriundos de óleos e gorduras submetidos à reação de transesterificação (Esquema 1).<sup>22</sup> As principais vantagens do biodiesel são:

- É derivado de matéria-prima renováveis;
- É biodegradável;
- Gera menor emissão de gases causadores do efeito estufa;
- Possui alto ponto de fulgor, o que lhe confere maior segurança no transporte e armazenamento.



**Esquema 1:** Transesterificação de triglicerídeo na presença de álcool e um catalisador.

As principais matérias primas para produção de biodiesel são óleo de soja, sebo bovino, óleo de fritura, óleo da semente do algodão, gordura de porco e outras matérias graxas de origem renovável.<sup>4,22</sup> Entretanto, a utilização de matérias-primas que necessitam de terras aráveis para seu cultivo e água para irrigação faz com que ocorra uma competição entre a produção de energia e alimento. Com isso, o biodiesel derivado de microalgas surge como uma alternativa viável para substituir o diesel, por não necessitar de terras aráveis e nem de água potável para o seu cultivo, permitindo o uso desses recursos para fins mais nobres como a produção de alimentos.<sup>6</sup>

Os principais métodos para a produção de biodiesel de microalgas são a extração seguida da transesterificação (método convencional) e a transesterificação “in situ”, onde a extração e a conversão em FAAEs ocorrem simultaneamente. Em ambos os métodos se faz necessário o uso de biomassa seca, sendo que a etapa de secagem necessita de muito tempo e energia, o que aumenta o custo e, conseqüentemente, o valor final do produto.<sup>21</sup>

Com isso, se faz necessário o estudo de novas metodologias para a produção de FAAEs que não necessitem da etapa de secagem da biomassa. Sendo assim a proposta deste trabalho é estudar uma nova metodologia, a qual consiste na hidrólise “in situ” seguida de esterificação. Esta metodologia esta já empregada na produção de FAAEs derivados de oleaginosas convencionais, onde na primeira etapa é realizada a hidrólise e conseqüentemente obtenção dos ácidos graxos, assim evitando a secagem, e após é realizada a esterificação sendo obtidos os ésteres alquílicos de ácidos graxos.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

Dos combustíveis utilizados hoje no mundo, cerca de 88% são derivados de fontes não-renováveis – são finitos – sendo que como exemplos podemos citar o petróleo, o gás natural e o carvão.<sup>1,2</sup> Além disso uma das maiores implicações do uso de tais combustíveis, é o fato deles contribuírem para a emissão dos gases causadores do efeito estufa.<sup>1,3</sup>

Por isso o Brasil através dos órgãos reguladores, vem tomando providências para amenizar tais problemas como, por exemplo, a redução de impostos sobre carros Flex (bicombustíveis), aumentando o consumo de etanol e consequentemente reduzindo a utilização de gasolina. A regulamentação da utilização de diesel de baixo teor de enxofre S10 e S50, com o intuito de diminuir os efeitos ao meio ambiente, bem como a adição de até 25% de etanol a gasolina e a adição de 5% de biodiesel ao diesel (B5).<sup>5</sup>

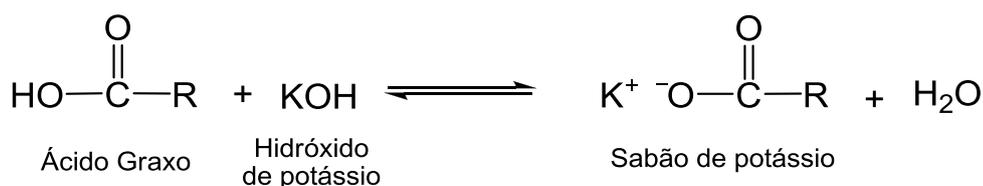
Com isso a produção de biocombustíveis no Brasil, no ano de 2010, alcançou a marca de 30,6 milhões m<sup>3</sup>, sendo que deste total a produção de etanol foi de 28,2 milhões m<sup>3</sup> e a produção de biodiesel 2,4 milhões m<sup>3</sup>.<sup>4</sup>

Segundo a ANP, os biocombustíveis são substâncias derivadas de biomassa renovável que podem ser utilizados para geração de energia ou em motores de combustão interna. Exemplos são o etanol, o biodiesel e outras substâncias devidamente regulamentadas, as quais podem substituir total ou parcialmente os combustíveis de origem fóssil.<sup>4</sup>

O biodiesel, por sua vez, é uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos (FAAEs, *Fatty Acids Alkyl Esters*), oriundos de óleos vegetais e gorduras animais.<sup>22</sup> A utilização direta desses óleos e gorduras em motores de combustão interna não é uma alternativa viável, devido à alta viscosidade que esses possuem podendo assim causar incrustações no interior do motor. Com o intuito de diminuir este inconveniente, os óleos e gorduras são submetidos a processos como 1) misturas binárias com o petrodiesel; 2) pirólise; 3) microemulsificação (ou mistura co-solvente) e 4) transesterificação (Esquema 1).<sup>22</sup>

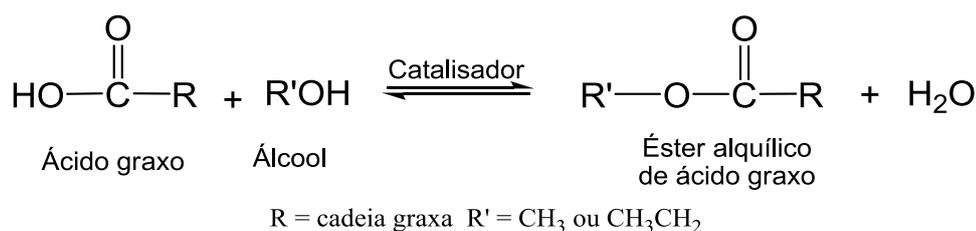
Dentre os processos de produção de biodiesel, o principal método utilizado é a reação de transesterificação onde os óleos vegetais e gorduras animais reagem com um álcool de cadeia curta na presença de um catalisador, sendo obtido como produto principal o biodiesel e subprodutos como o glicerol. É comum a utilização de etanol e outros álcoois de baixo peso molecular na reação de transesterificação, porém o álcool mais utilizado é o metanol, por ter menor custo.<sup>22</sup>

Aos catalisadores utilizados na reação de transesterificação, os alcalinos são os mais empregados. Entretanto, em óleos residuais e matéria-prima com alto índice de acidez (superior a 0,5 %), os catalisadores ácidos são mais indicados, pois neste caso além da reação de transesterificação ocorre a reação de esterificação dos ácidos graxos, obtendo como produto também o biodiesel (Esquema 2), já os catalisadores alcalinos, na presença de ácidos graxos livres, são consumidos para formar sabão (Esquema 3).<sup>23</sup>



**Esquema 3:** Reação de formação de sabão.

Existe uma grande variedade de matéria-prima, para a produção de biodiesel como os óleos, gorduras, óleos de descarte, entre outros.<sup>23</sup> No Brasil, as principais matérias utilizadas em 2010 foram a soja (78,9%), o sebo bovino (17%), seguidos de óleo de fritura e algodão, gordura de porco e outras matérias graxas que juntas somam 4,1%.<sup>4</sup>



**Esquema 2:** Reação de esterificação de um ácido graxo na presença de catalisador ácido e álcool.

Entretanto, a utilização de tais matéria-prima que necessitem de terras aráveis para a produção de biomassa com fins energéticos é controversa, pois o aumento da produção de biocombustíveis e, conseqüentemente, a diminuição da produção de alimentos, podem gerar um impacto sobre o mercado global destes últimos.<sup>4</sup>

Neste contexto a busca por novas fontes de triglicerídeos, que não afetem a produção de alimentos, vem ganhando um destaque especial. Chisti<sup>6</sup> comparou diversas oleaginosas e suas capacidades de produção de óleo por hectare (Tabela 1) e a área necessária para o plantio dessas para suprir 50% da demanda de combustíveis dos EUA (Estados Unidos da América).

**Tabela 1:** Área necessária para o plantio de diversas oleaginosas para suprir 50% da demanda de combustível dos EUA.<sup>6</sup>

Oleaginosa	Rendimento de óleo (L/ha)	Área necessária (M ha) <sup>a</sup>	% de área destinada à agricultura
Milho	172	1540	846
Soja	446	594	326
Canola	1190	223	122
Pinhão Manso	1892	140	77
Coco	2689	99	54
Palma	5950	45	24
Microalga <sup>b</sup>	136.900	2	1,1
Microalga <sup>c</sup>	58.700	45	2,5

a) Para suprir 50% da demanda dos EUA; b) Microalga com teor de óleo de 70% na biomassa; c) Microalga com teor de óleo de 30% na biomassa

Ainda de acordo com Chisti, qualquer uma das oleaginosas convencionais citadas no trabalho, e que atualmente são utilizadas como as principais matéria-prima para produção de biodiesel, não poderiam ser utilizadas para substituir 100% da demanda de combustível nos EUA. No entanto, o autor apresenta a utilização da biomassa de microalgas como única alternativa viável, pois é necessária área muito

menor para suprir a 50% da demanda dos EUA, já que somente cerca de 2,5% da área já destinada à agricultura seria necessária.<sup>6</sup>

## 2.1 MICROALGAS

As microalgas são microrganismos unicelulares consideradas como produtoras primárias e são encontradas principalmente em meios marinhos e de água doce.<sup>3</sup> Entre suas características estão a capacidade destes organismos transformarem o dióxido de carbono atmosférico e a luz solar nas mais variadas formas de energia através do processo de fotossíntese, produzindo assim polissacarídeos, proteínas, lipídios e hidrocarbonetos.<sup>6</sup>

Desta forma, existem diversas aplicações para a biomassa de microalgas, entre elas a utilização como bio-remediadores, bio-fertilizantes, fixadores de nitrogênio, produção de bio-combustíveis como o metano, etanol, bio-hidrogênio e biodiesel, entre outros.<sup>7</sup>

A utilização da biomassa de microalga como fonte de energia não é uma ideia recente, o primeiro estudo é datado de 1950 e foi realizado nos EUA, desde então, vários programas de financiamento têm destinado uma atenção especial para o assunto.<sup>7</sup>

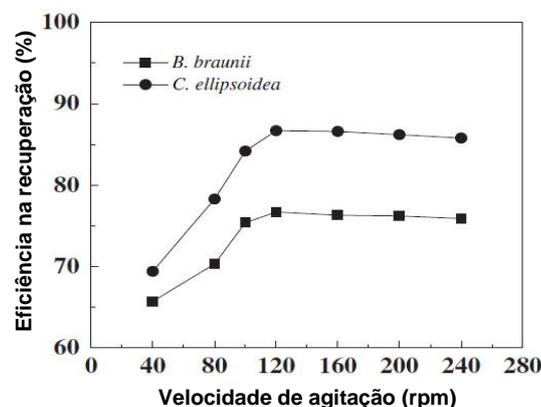
Entre as diversas vantagens da utilização de biomassa de microalgas para produção de biocombustíveis, como o biodiesel estão:

- a capacidade de transformar luz solar em biomassa.<sup>4</sup>
- a alta produção de lipídios (algumas espécies chegam a 50%).<sup>3,4</sup>
- o crescimento rápido (algumas espécies chegam a dobrar sua massa em um tempo de 3,5 h).<sup>7,8</sup>
- a absorção de CO<sub>2</sub> (1 kg de biomassa seca absorve 1,83 kg de CO<sub>2</sub> desde o início do cultivo até a colheita).<sup>3,4,7</sup>
- a maior produtividade de óleo (cerca de 15 a 20 vezes maior que outras oleaginosas convencionais).<sup>7</sup>
- o não requerimento de terras aráveis e água potável para o cultivo.<sup>7</sup>

- a possibilidade de utilização para tratamento de efluentes (absorção de nitratos e fosfatos liberando  $O_2$  para a atmosfera).<sup>3,7,26</sup>
- a necessidade de área para cultivo menor do que oleaginosas convencionais.<sup>7</sup>
- não causa prejuízo sobre o mercado de alimentos.<sup>6</sup>

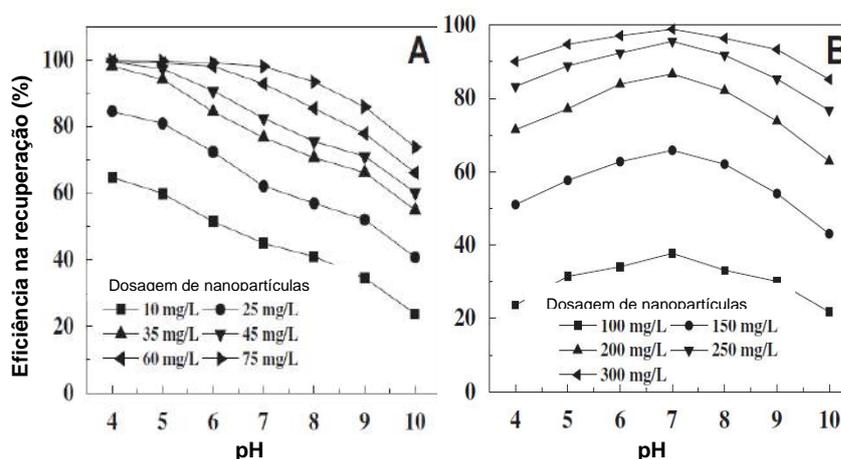
Por outro lado a produção de biodiesel de microalgas apresenta algumas desvantagens. Quando o estágio de estabilidade no cultivo é alcançado, a separação das células do meio de cultura se faz necessária. Em geral as microalgas possuem carga negativa na parede celular, o que evita sua aglomeração, as mantendo em suspensão no meio em que vivem.<sup>25</sup> Os principais métodos utilizados atualmente para concentrar as células de microalga são centrifugação, filtração e floculação, sendo que a escolha do método depende da microalga, tamanho da célula, meio de cultura, densidade celular, tipo de produto final e relação custo benefício.<sup>24</sup>

Outros métodos de separação das células do meio de cultivo vêm sendo estudados. Liu e Guo utilizaram nanopartículas de magnetita ( $Fe_3O_4$ ) para a recuperação celular das microalgas *Botryococcus braunii* e *Chlorella ellipsoidea* avaliando a utilização de quantidades diferentes de nanopartículas e o efeito do pH do meio, além da velocidade de rotação por minuto após a adição da magnetita. Os autores observaram que houve um acréscimo na recuperação celular com a variação da velocidade de 40 para 120 rpm para ambas as microalgas, o que deve ser alcançado pela dispersão das nanopartículas de  $Fe_3O_4$  entre as células de microalgas. Porém, com velocidades superiores a 120 rpm, a recuperação diminui devido a ruptura do agregado célula/ $Fe_3O_4$  (Gráfico 1).<sup>31</sup>



**Gráfico 1:** Rendimento na eficiência de recuperação celular relacionado com a velocidade de agitação.<sup>31</sup>

Os autores concluíram que o aumento da concentração de nanopartículas melhorou a recuperação celular para ambas as microalgas e em relação ao pH as microalgas apresentaram comportamentos distintos, obtendo recuperações de 99,9% em pH 4,0 para a *B.braunii* e de 98,9% em pH 7,0 para a *C. ellipsoidea*, na concentração 300 mg de de nanopartículas por litro de cultivo (Gráfico 2).<sup>31</sup>



**Gráfico 2:** Eficiência na recuperação celular das microalgas *B. braunii* (A) e *C. ellipsoidea* (B), em relação a variação de pH e concentração de nanopartículas.<sup>31</sup>

A produção de biodiesel de microalgas após a separação da biomassa do meio de cultivo pelo método convencional passa pelas seguintes etapas: secagem da biomassa, extração da fração lipídica, reação de conversão da fração lipídica em ésteres graxos e purificação. Na extração da fração lipídica das microalgas diferentes métodos podem ser aplicados, o que irá definir o método de extração é a composição da parede celular, a qual pode apresentar diversas composições entre as quais celulose, quitina, sílica, proteínas e  $\text{CaCO}_3$ .<sup>10</sup>

D'Oca e colaboradores, utilizando a microalga *Chlorella pyrenoidosa*, realizaram um estudo a partir de diferentes métodos de extração, incluindo soxhlet, agitação magnética e banho de ultrassom em diferentes solventes, clorofórmio:metanol (2:1 v/v), metanol, clorofórmio, etanol e hexano. O maior rendimento foi obtido com a mistura clorofórmio:metanol (2:1 v/v) cerca de 19% utilizando agitação magnética ou banho de ultrassom. O menor rendimento foi obtido para o solvente hexano, cerca de 1,5% em relação a biomassa seca, tanto para com

uso de agitação magnética ou soxhlet, o que indica uma menor proporção de lipídios apolares, como os TG, na fração lipídica.<sup>11</sup>

Lee e colaboradores<sup>12</sup> estudaram a extração da fração lipídica das microalgas *Botryococcus sp.*, *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus sp.*, utilizando agitação magnética e como solvente extrator a mistura de clorofórmio:metanol (1/1 v/v). Neste estudo os autores aplicaram cinco diferentes tratamentos prévios à extração da fração lipídica, a saber: autoclave, moinho de bolas, microondas, sonicação e choque osmótico com solução salina NaCl 10% seguido de vortex, comparando seus resultados com a extração sem nenhum tratamento. Os maiores rendimentos para as três espécies de microalgas, foram obtidos quando utilizado o tratamento prévio com micro-ondas, *Botryococcus sp.* 28,6%, *Chlorella vulgaris* 10,0% e *Scenedesmus sp.* 10,4%, sendo que o tratamento prévio aumentou o rendimento devido ao rompimento celular. Isto facilitou a extração lipídica e ficou evidenciado pelo fato de que o menor rendimento na extração foi obtido sem nenhum tratamento prévio.

Já na extração da microalga *Pavlova sp.*, Cheng e colaboradores<sup>13</sup> compararam três diferentes métodos de extração: sonda de ultrassom, extrator de soxhlet e extração com fluido supercrítico (SFE). Os resultados obtidos na extração da fração lipídica estão dispostos na Tabela 2.

**Tabela 2:** Rendimentos das extrações e conversão em ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) obtidos pelos diferentes métodos.<sup>13</sup>

Método	Ultrassom			Soxhlet	SFE
	A	B	C		
Solvente				Hexano	CO <sub>2</sub>
(%) Lipídios <sup>a</sup>	17,6	13,8	44,7	18,5	17,9
(%) FAMES <sup>a</sup>	4,4	10,6	15,6	9,8	15,7

<sup>a</sup> Rendimento em relação a biomassa.

A) Água:metanol:hexano (1:2,4:4,8 v/v); B) Água:metanol:tolueno (1:2,4:4,8 v/v); C) Água:metanol:Acetato de etila (1:2,4:4,8 v/v).

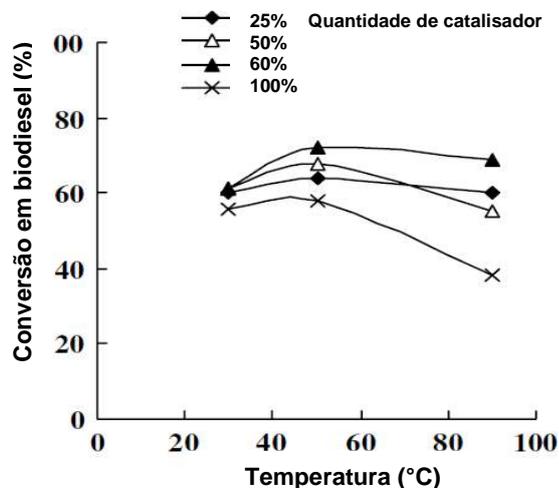
A partir dos resultados obtidos os autores concluíram que a produção de biodiesel não pode ser baseado nos rendimentos das extrações, uma vez que

quando comparados, ficou evidenciado que grande parte da fração lipídica extraída é composta por impurezas não transesterificáveis.<sup>13</sup>

## 2.2 PRODUÇÃO DE ÉSTERES ALQUÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS (FAAES)

### 2.2.1 Processo de extração/transesterificação

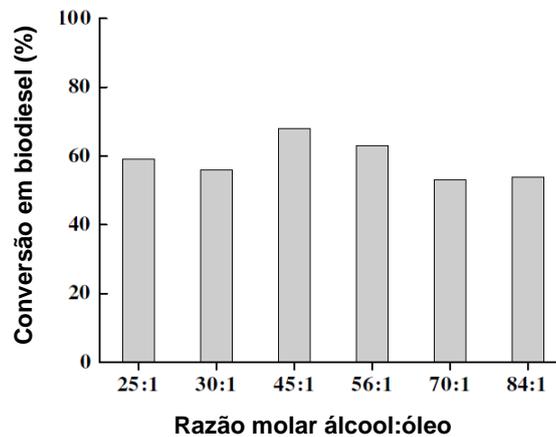
Wu e Miao<sup>14</sup> investigaram o processo de extração/transesterificação da fração lipídica extraída da microalga *Chlorella protothecoides* catalisada por ácido. Neste estudo, foram avaliadas as diferentes concentrações de catalisador H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (25, 50, 60, 100% em relação a fração lipídica), em diferentes temperaturas (30, 50 e 90 °C).



**Gráfico 3:** Rendimento de FAMES em diferentes concentrações de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nas temperaturas de 30, 50 e 90 °C.<sup>14</sup>

Quando comparados os rendimentos obtidos nas diferentes quantidades de catalisador, as melhores conversões foram obtidas com 60% na temperatura de 50 °C (Gráfico 3). Porém a conversão foi muito próxima daquelas obtidas com 100% de catalisador nas temperaturas de 30 e 50 °C, apresentando pouca diferença entre elas. Desta forma as condições ideais para a conversão da fração lipídica (levando

em consideração o gasto energético), foram estabelecidas na temperatura de 30 °C e 100% de catalisador. Além disso, os autores avaliaram diferentes razões molares álcool:óleo (25:1, 30:1, 45:1, 56:1, 70:1 e 84:1) e os resultados estão dispostos no Gráfico 4.<sup>14</sup>



**Gráfico 4:** Conversões obtidas nas diferentes razões molares álcool:óleo.<sup>14</sup>

Ainda de acordo com os autores, as melhores conversões foram obtidas nas razões de 45:1 e 56:1 cerca de 68 e 63%, respectivamente. Entretanto a gravidade específica para a razão de 45:1 foi 0,873 e para a razão 56:1 foi 0,864, sendo então esta última considerada a mais eficiente.<sup>14</sup>

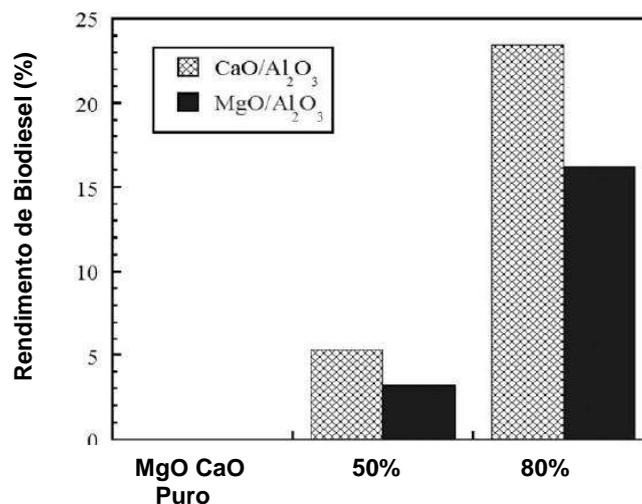
Além de catalisadores homogêneos como H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e NaOH, onde a reação se dá em uma única fase, outros tipos de catalisadores podem ser empregados na produção de biodiesel, tais como catalisadores biológicos e heterogêneos.

A reação utilizando catalisador biológico foi estudada por Wu e colaboradores<sup>15</sup>, a partir da investigação da transesterificação da fração lipídica da microalga *Chlorella protothecoides* catalisada pela lipase *Candidia sp.* (99-125). Foram avaliadas diferentes condições reacionais: quantidade de lipase imobilizada, quantidade e modo de adição de metanol, pH, tempo de reação, quantidade de solventes e qual solvente a ser utilizado. A melhor taxa de conversão em FAMES encontrada foi de 98,15% na razão molar 3:1 metanol:lipídios adicionado em três etapas, o solventes *n*-hexano 2,5 vezes a quantidade de lipídio, 10% de água em

relação aos lipídios, temperatura de 38 °C, 75% de lipase imobilizada em relação ao óleo (v/v) e 12 horas de reação.

De acordo com Wu<sup>15</sup>, a transesterificação catalisada por lipase apresentou alta taxa de conversão quando comparada a seu trabalho anterior<sup>14</sup>. Entretanto a lipase somente é viável em biomassas com altos teores lipídicos, como a utilizada neste experimento (48,7% em relação a biomassa seca).<sup>15</sup>

Catalisadores heterogêneos foram estudados por Seker e colaboradores<sup>16</sup>. Os autores avaliaram a utilização de CaO e MgO na catálise da transesterificação da fração lipídica da microalga *Nannochloropsis oculata*, com razão molar de 3:1 álcool:lipídio, temperatura de 50 °C e 2% de catalisador e observaram que os óxidos puros CaO e MgO não possuem atividade catalítica para a transesterificação (Gráfico 5).<sup>16</sup>



**Gráfico 5:** Rendimentos obtidos na transesterificação utilizando catalisadores heterogêneos.<sup>16</sup>

Por outro lado os autores constataram que quando utilizados os mesmo óxidos, suportados a 50 e 80% em Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ocorreu reação. As conversões para CaO e MgO suportados a 50% foram inferiores a 5%, já quando suportados a 80% nas mesmas condições, as conversões chegaram a 23 e 16% respectivamente. Desta

forma sendo utilizada o óxido que obteve a melhor conversão ( $\text{CaO}/\text{Al}_2\text{O}_3$  a 80%), a proporção de álcool:lipídio foi elevada de 3:1 para 6:1 e a conversão alcançou 97,5%.<sup>16</sup>

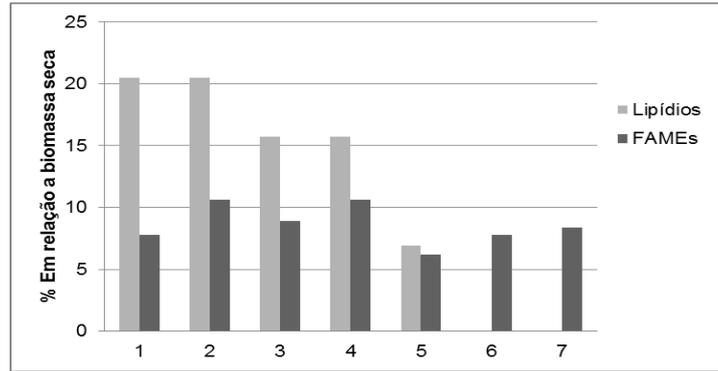
Em trabalho recente D'Oca e colaboradores<sup>11</sup> compararam a obtenção de FAMES da microalga *Chlorella pyrenoidosa* pelos métodos de transesterificação “in situ” com o método de extração/transesterificação, utilizando as condições experimentais apresentadas na Tabela 4.<sup>11</sup>

**Tabela 4:** Condições experimentais utilizadas para a extração/transesterificação e transesterificação “in situ”.<sup>11</sup>

Entrada	Extração (23°C, 120 min)	Transesterificação (240 min)	T (°C)
1	$\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1 v/v)	$\text{CH}_3\text{OH}$ , 3 % $\text{H}_2\text{SO}_4$	60
2	$\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1 v/v)	$\text{CH}_3\text{OH}$ , 3 % $\text{H}_2\text{SO}_4$	100
3	$\text{CH}_3\text{OH}$	$\text{CH}_3\text{OH}$ , 3 % $\text{H}_2\text{SO}_4$	60
4	$\text{CH}_3\text{OH}$	$\text{CH}_3\text{OH}$ , 3 % $\text{H}_2\text{SO}_4$	100
5	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	$\text{CH}_3\text{OH}$ , 3 % $\text{H}_2\text{SO}_4$	60
6	-----	$\text{CH}_3\text{OH}$ , 20 % $\text{H}_2\text{SO}_4^a$	60
7	-----	$\text{CH}_3\text{OH}$ , 20 % $\text{H}_2\text{SO}_4^a$	100

a Processo de transesterificação "in situ"

Conforme o Gráfico 6, o processo de extração/transesterificação foi o que apresentou os rendimentos maiores que o processo de transesterificação “in situ”, 10,6% e 8,4% respectivamente. Além disso, no processo de extração o maior rendimento obtido foi com a mistura clorofórmio:metanol (2:1 v/v), porém a conversão em FAMES foi menor, quando comparada com a extração com o solvente metanol, o que indica que na extração com o clorofórmio:metanol (2:1 v/v) a fração lipídica é composta por lipídios não-transesterificáveis.<sup>11</sup>

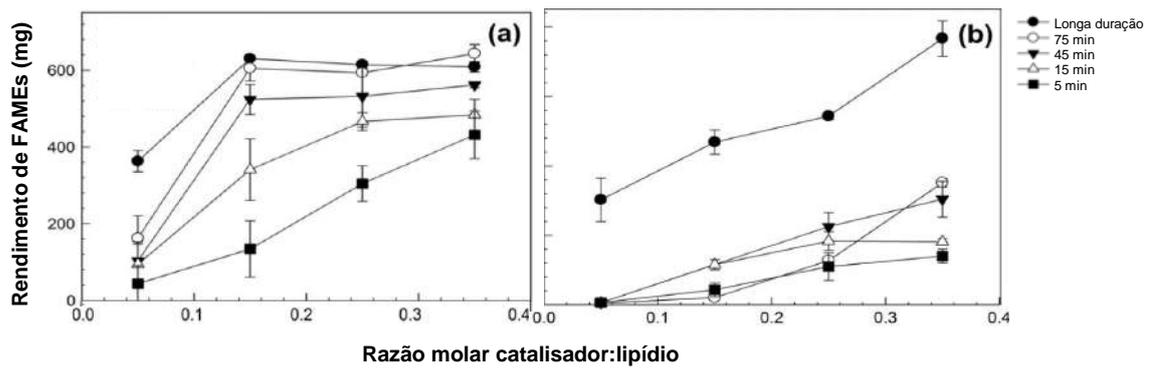


**Gráfico 6:** Rendimentos obtidos na extração, transesterificação e transesterificação “in situ” da microalga *Chlorella pyrenoidosa*.<sup>11</sup>

### 2.2.2 Obtenção de ésteres graxos pelo processo de transesterificação “in situ”

O processo de transesterificação “in situ” foi avaliado por Xu e Mi. Os autores estudaram o uso da microalga *Spirulina* submetendo a mesma biomassa a duas reações sucessivas de transesterificação “in situ”, utilizando KOH como catalisador. Os co-solventes foram escolhidos de acordo com algumas características, tais como menor toxicidade, densidade diferente da biomassa, quimicamente inerte, miscível em metanol e triglicerídeos e imiscível em água. Seguindo tais características os co-solventes utilizados foram tolueno, diclorometano, éter dietílico e as misturas de éter dietílico/diclorometano, tolueno/metanol e diclorometano/metanol. Os melhores resultados foram obtidos utilizando a mistura de solventes tolueno/metanol (2:1 v/v), com uma conversão de 76% na primeira reação e mais 10% na segunda reação, resultando em uma conversão global de 86% de biodiesel.<sup>27</sup>

A catálise alcalina no processo de transesterificação “in situ” foi avaliada por Orta e colaboradores<sup>32</sup>. Os autores compararam os rendimentos obtidos utilizando os catalisadores NaOH e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, as diferentes razões molares lipídio:óleo e diferentes temperaturas, sendo os resultados obtidos apresentados no Gráfico 7.<sup>32</sup>



**Gráfico 7:** Rendimentos obtidos em FAMEs, utilizando catalisador NaOH (a) e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (b).<sup>32</sup>

Quando utilizado o NaOH como catalisador, no tempo de 5 min houve um aumento linear nos rendimentos de FAMEs com o aumento da quantidade de catalisador, o que não é observado no tempo de 45 minutos a partir da razão 0,15:1 catalisador:lipídio. Já a utilização de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como catalisador nos mesmos tempos e concentrações as conversões foram menores, entretanto quando a reação foi realizada em um tempo maior, 20 horas o processo alcançou uma conversão de 96,9±6,3%. Para os autores ficou evidenciado que a catálise ácida é mais lenta que a básica.<sup>32</sup>

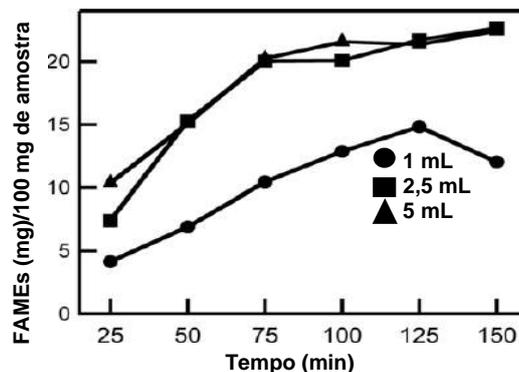
O desempenho do catalisador heterogêneo Mg-Zr foi avaliada por Li e colaboradores<sup>28</sup> na reação de transesterificação “in situ” da microalga *Nannochloropsis sp.* em diferentes proporções 2, 5, 7, 10 e 15% em relação a massa. Além disso, foram estudadas diferentes proporções de metanol/diclorometano 1:2, 1:1, 2:1, 3:1 e 4:1, utilizados como solvente/co-solvente. Com o ampliação da quantidade de catalisador, os rendimentos chegaram a 26,9% com 10% de catalisador, entretanto com a utilização de 15% o rendimento da reação diminuiu. Na avaliação das proporções de diclorometano/metanol houve um aumento de 12,1% para 28% nos produtos quando a proporção foi elevada de 1:2 para 3:1, todavia o rendimento caiu para 25,6% quando utilizada a proporção de 4:1. O acréscimo na quantidade de metanol acarreta no aumento nos rendimentos, por funcionar como solvente extrator e também como álcool da reação.<sup>28</sup>

Seefeldt e colaboradores<sup>33</sup> investigaram em seu trabalho as melhores condições reacionais, utilizando forno de micro-ondas, no processo de

transesterificação “in situ”, sendo avaliados diferentes álcoois, diferentes volumes de álcool, efeito da temperatura e quantidade de catalisador.

No estudo do efeito dos diferentes álcoois (metanol, etanol, 1-butanol, 2-metil-1-propanol e 3 metil-1-butanol) na transesterificação “in situ”, os autores avaliaram também o efeito de cada um deles na extração da fração lipídica, visto que no processo de transesterificação “in situ” o álcool não só é utilizado como reagente mas também como solvente extrator. Foi observado que entre os álcoois estudados aquele que possuía menor eficiência na extração da fração lipídica era o metanol, 3,1 mg de um total de 100 mg de amostra, e o maior rendimento obtido foi encontrado utilizando etanol como solvente extrator 20,2 mg. Porém, na conversão em ésteres graxos na presença de 1,8% de  $H_2SO_4$  como catalisador, o efeito da variação do álcool não representava diferença significativa, tendo sido obtido o menor rendimento para o 2-metil-1-propanol cerca de 28,7 mg e o maior 36,9 mg para o 1-butanol.<sup>33</sup>

De acordo com os autores<sup>33</sup>, o efeito do volume de álcool juntamente com tempo de reação influenciou diretamente nos rendimento, conforme o Gráfico 8.

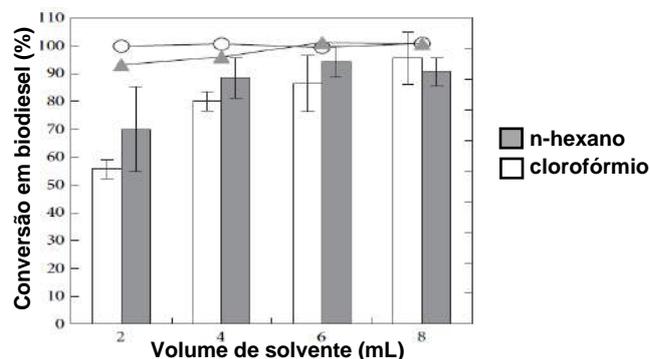


**Gráfico 8:** Rendimento em FAMES em diferentes volumes de álcool e tempos de reação.<sup>33</sup>

Foi observado que em 10 min de reação foram obtidos rendimentos de 23,7 e 33,7 mg de FAMES nas temperaturas de 60 e 90 °C, já em 20 min o rendimento obtido a 80 °C foi de 34,1 mg de FAMES, sendo que a temperaturas superiores a essa, não houve aumento no rendimento de FAMES.<sup>33</sup>

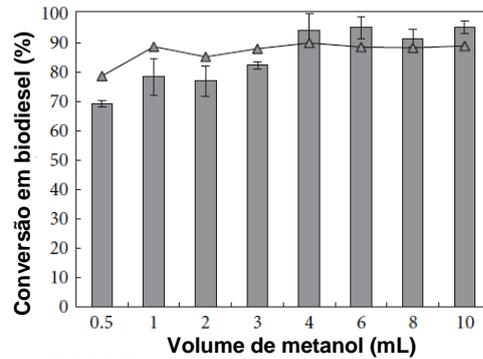
Por fim, os autores avaliaram diferentes quantidades de catalisador (1,2; 1,4; 1,6; 1,8; 2,0; 2,2 e 2,4%) e obtiveram rendimentos que variaram de 28,2 a 31,7 mg de FAMES para as concentrações de 1,2 e 2,4% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Sendo então encontrados como condições ideais para a transesterificação “in situ” realizada em micro-ondas o volume de 2 mL de metanol, 1,8% (v/v) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 80 °C e o tempo de 20 minutos de reação.<sup>33</sup>

Miao e colaboradores<sup>34</sup> investigaram a transesterificação “in situ” da microalga *Chlorella pyrenoidosa*, cultivada utilizando como fonte de carbono lignocelulose derivada da hidrólise da casca de arroz. Neste estudo foram avaliados o volume de solvente *n*-hexano ou clorofórmio (2,0 – 8,0 mL), volume de metanol (0,5 – 10 mL), temperatura (20 – 110 °C) e tempo de reação (0,25 – 4 horas). Na avaliação do volume e tipo de solvente, foi observado que com o aumento do volume de solvente aumentava o rendimento FAMES, sendo que para o *n*-hexano o melhor rendimento foi obtido utilizando o volume de 6 mL (94,3%) e 8 mL para clorofórmio (95,7%). Entretanto o produto formado utilizando o clorofórmio como solvente apresentou uma coloração mais escura e maior quantidade de sólidos, segundo os autores a coloração escura se deve a oxidação dos ácidos graxos e a formação de sulfonas devido a presença de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, já com relação a presença de sólidos no produto, pode ter sido pelo co-solubilização de proteínas presentes em grandes quantidades nas microalgas, por isso, os autores utilizaram o *n*-hexano como solvente ao invés de clorofórmio nos outros experimentos.<sup>34</sup>



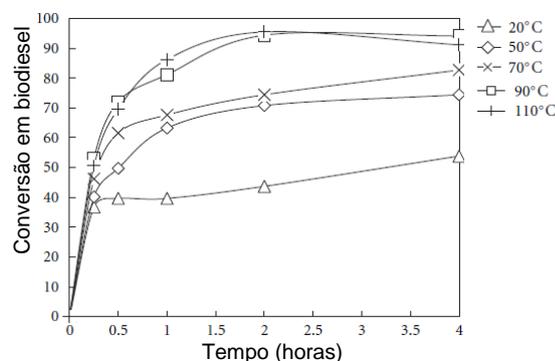
**Gráfico 9:** Rendimento em FAMES obtidos com o solventes *n*-hexano e clorofórmio.<sup>34</sup>

Entre os volumes de álcool avaliados (0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 mL), aqueles que apresentaram diferença significativa nos rendimentos de éster (Gráfico 10), foram aqueles no intervalo de 0,5 até 4 mL obtendo rendimentos de 69,4% e 94,3% respectivamente. Valores superiores a estes não levaram a rendimentos melhores.<sup>34</sup>



**Gráfico 10:** Rendimento em FAMES em diferentes volumes de metanol.<sup>34</sup>

Quanto às diferentes temperaturas (50, 70, 90 e 110 °C) e tempos de reação (0,25, 0,5, 1, 2 e 4 horas), foi observado que com o aumento do tempo de reação, houve um acréscimo nos rendimentos, da mesma forma com o aumento da temperatura. Isso se deve ao fato de que maiores temperaturas causam uma maior perturbação das células favorecendo a reação. Entretanto, na temperatura de 110 °C durante 4 horas o rendimento da reação diminuiu. De acordo com os autores este fato se deve à queima da biomassa causada por altas temperaturas durante um maior tempo, sendo considerado como ideal a temperatura de 90 °C e 4 h de reação.<sup>34</sup>

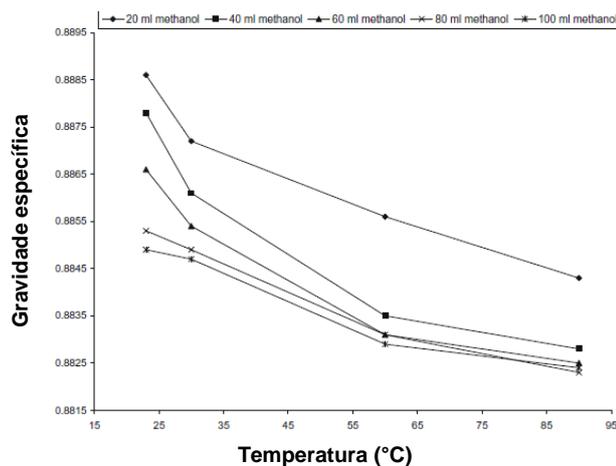


**Gráfico 11:** Rendimento em FAMES nas diferentes temperaturas e tempos.<sup>34</sup>

Sun e colaboradores<sup>21</sup> estudaram algumas variáveis que afetam a transesterificação “in situ” da microalga *Chlorella*. Foi avaliado o volume de metanol

(40, 60, 80, e 100 mL), temperatura (23, 30, 60 e 90 °C), tempo de reação (0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 4; 8; e 12 horas) e umidade na biomassa (72,5; 56; 40,9; 31,7; 19,5; 8,7; 3,2; 1,4 e 0,7% em relação a biomassa).<sup>21</sup>

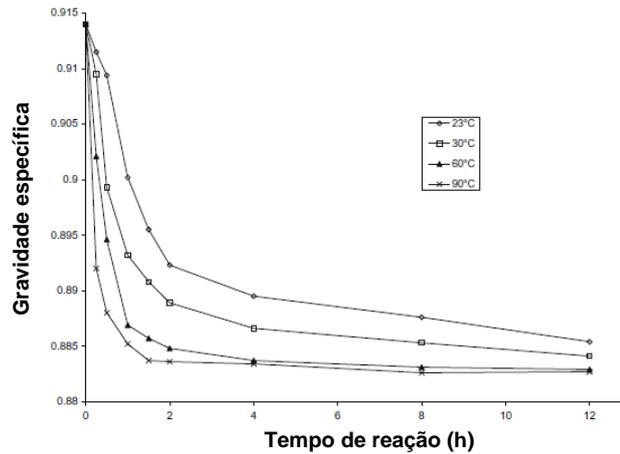
Na avaliação de diferentes volumes de metanol, foi observado que o aumento do volume ocasionou um acréscimo no rendimento de biodiesel (Gráfico 12) o que também foi observado na elevação das temperaturas, entretanto com os volumes superiores a 60 mL, não houve diferença significativa.<sup>21</sup>



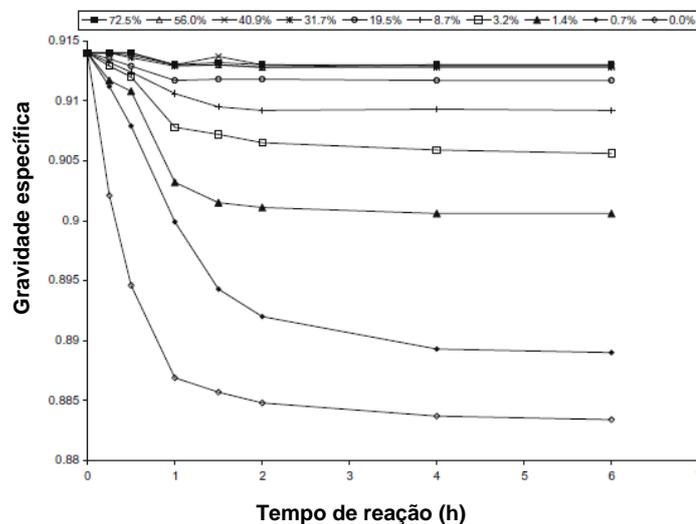
**Gráfico 12:** Influência do volume de metanol e da temperatura na reação de transesterificação “in situ”.<sup>21</sup>

Quando comparado o tempo de reação pela temperatura, foi observado que em 2 horas de reação e temperatura de 60 °C, o processo já estava quase atingindo seu rendimento máximo (Gráfico 13), não havendo diferença significativa na temperatura de 90 °C.<sup>21</sup>

No estudo da influência da água na reação de transesterificação “in situ” foi observado que qualquer porcentagem de umidade tinha efeito negativo no rendimento da reação (Gráfico 14), sendo mais significativo em valores superiores a 8,7% de água na biomassa. Segundo os autores, o efeito negativo se deve a reação de hidrólise, que é favorecido com o aumento da quantidade de água e assim diminuindo o rendimento da reação.<sup>21</sup>



**Gráfico 13:** Influência da temperatura e tempo de reação no processo de transesterificação “in situ”.<sup>21</sup>

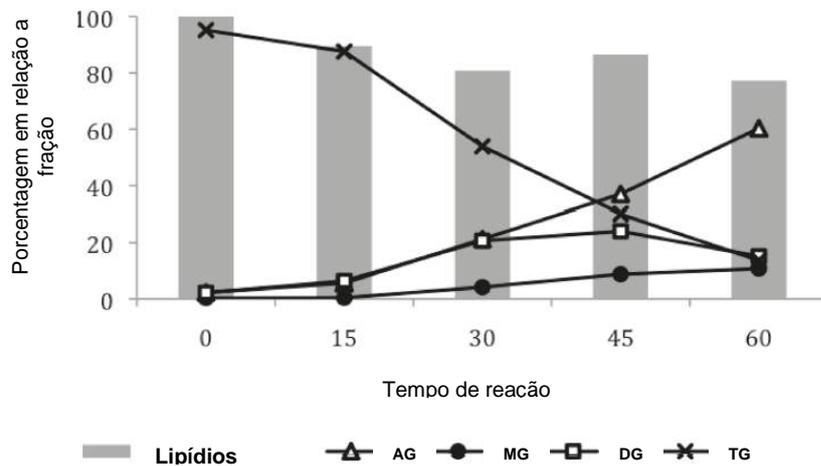


**Gráfico 14:** Efeito da umidade e temperatura no rendimento da reação de transesterificação “in situ”.<sup>21</sup>

Neste contexto, o efeito negativo da umidade do rendimento no processo de produção de biodiesel de microalgas, aliado aos altos custos de secagem e extração, que juntos somam cerca de 90% dos custos totais para a produção do biodiesel, fez com que a busca por novos processos que evitem ou diminuam tais etapas sejam buscados.

Com isso, Savage e colaboradores<sup>29</sup> estudaram a produção de biodiesel através do método supercrítico de hidrólise da microalga *Chlorella vulgaris*, seguida

de esterificação dos ácidos graxos. Este método utiliza a água contida na biomassa como reagente na reação de hidrólise, sendo já utilizado em oleaginosas convencionais na produção de biodiesel. Foi avaliada a composição da fração lipídica após a reação de hidrólise e a conversão em ésteres pela reação de esterificação. A fração lipídica inicialmente continha de 1-2% de ácidos graxos livres, ou seja, 98-99% da fração lipídica era composta por lipídios neutros na forma de triglicerídeos. Após a reação de hidrólise, cerca de 86% do total de lipídios foram hidrolisados ao final de 60 min de reação, entretanto diferentes proporções foram observadas em tempos de reação diferentes (Gráfico 15).<sup>29</sup>



**Gráfico 15:** Conteúdo lipídico obtido na reação de hidrólise em diferentes tempos de reação.

Na avaliação da quantidade de água, foi observado que esta favorece o rendimento da reação, entretanto esta também ocasiona a formação de um maior volume de material a ser tratado ao final do processo e assim um maior gasto energético. Na segunda etapa, a esterificação, foram avaliadas diferentes temperaturas 275 e 325 °C e diferentes razões de ácidos graxos em relação ao álcool, sendo obtidas conversões que variaram de 56 a 100% em relação a massa inicial.<sup>29</sup>

Tendo em vista os trabalhos anteriormente citados, e com base nos resultados obtidos em nosso grupo de pesquisa, este trabalho visa sintetizar ésteres

graxos a partir do processo de hidrólise seguido de esterificação, utilizando a biomassa úmida da microalga *Chlorella sp.*, bem como a caracterização dos produtos formados.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Geral

Sintetizar e caracterizar os ésteres metílicos de ácidos graxos a partir da biomassa úmida da microalga *Chlorella sp.* pelo método de hidrólise “in situ” seguido de esterificação, bem como caracterizar a fração lipídica da microalga.

#### 3.2 Específicos

- Caracterizar a fração lipídica da microalga *Chlorella sp.*, determinando o teor lipídico, o índice de acidez e o perfil graxo.
- Comparar os métodos sonda de ultrassom e agitação magnética na extração de lipídios da microalga *Chlorella sp.*
- Produzir ésteres graxos a partir da transesterificação da fração lipídica extraída pelo método de agitação magnética a quente.
- Avaliar o efeito de diferentes temperaturas na reação de esterificação dos ácidos graxos obtidos a partir da hidrólise “in situ” da biomassa da microalga *Chlorella sp.*
- Avaliar o efeito de diferentes tempos na esterificação dos ácidos graxos.
- Avaliar o efeito da quantidade de catalisador (ácido sulfúrico) na reação de hidrólise direta da biomassa da microalga *Chlorella sp.*
- Avaliar o efeito de diferentes quantidades de água na reação de hidrólise.
- Comparar o perfil graxo dos ésteres obtidos no processo convencional e o de hidrólise seguido de esterificação.
- Caracterizar os ésteres graxos obtidos a partir da hidrólise seguido de esterificação da biomassa da microalga *Chlorella sp.*

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

Todos os experimentos foram realizados utilizando biomassa da microalga *Chlorella sp.*, reagentes e solventes adquiridos comercialmente.

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO LIPÍDICA

Na caracterização da fração lipídica, foi realizada a determinação do teor de lipídios, índice de acidez, perfil graxo e cálculo da massa molecular média. Os valores encontrados na determinação do teor de lipídios foram utilizados como referência para cálculos de conversão em ésteres alquílicos de ácidos graxos. A determinação do índice de acidez obteve-se para indicar qual o catalisador (ácido ou básico) que melhor se enquadra no processo de produção de FAEEs. A determinação do perfil graxo foi utilizada para obter a porcentagem de cada ácido graxo contido na fração lipídica e essas porcentagens foram utilizadas para calcular a massa molecular média. Por fim a massa molecular média foi utilizada para os cálculos de razão molar fração lipídica:álcool nos processos de produção de FAEEs.

#### 4.1.1 Determinação do teor lipídico da microalga *Chlorella sp.*

Todos os experimentos, realizados em triplicata, foram feitos com biomassa de microalga previamente seca em estufa a 60°C, de acordo com o método de Zhu e colaboradores,<sup>17</sup> até peso constante, e realizados em triplicata.

Para a extração, foi utilizado balão de fundo redondo de 50 mL, onde foi adicionado 1 g de biomassa e 6 mL de solvente. Os solventes utilizados foram metanol, etanol e a mistura de clorofórmio/metanol (2:1 v/v), a temperatura ambiente sob agitação magnética por 2 h e as extrações com metanol e etanol também se deram a 60 °C sob refluxo.

Ao término do tempo de extração, a mistura foi filtrada separando o extrato lipídico e a biomassa, a qual foi lavada com o mesmo solvente extrator, a fim de extrair o resíduo da fração lipídica contido na biomassa. O extrato foi evaporado a

pressão reduzida e levada a estufa (60 °C) até peso constante, e então foi determinado o teor lipídico.

#### 4.1.2 Índice de acidez

A determinação do índice de acidez foi feita através de titulação potenciométrica de acordo com o método (ASTM D 664) regulamentado para ANP,<sup>21</sup> das frações extraídas com os diferentes solventes clorofórmio/metanol 2:1, metanol, etanol e hexano (extração descrita no item 4.1.1).

Na titulação foi utilizado titulador automático Metrohm Titrimo Plus 848, como titulante a solução de KOH 0,1 mol/L em isopropanol padronizado com 200 mg de biftalato de potássio, e a solução diluente da amostra foi tolueno:isopropanol:água (1:0,95:0,5).

As titulações foram realizadas em béquer de 100 mL com 250 mg de amostra, e então diluídas em 50 mL da solução diluente, a solução diluente também foi titulada e considerada como branco, os índices de acidez foram calculados seguindo a expressão:

$$IA = \frac{(EP1 - CV01) \times 5,61 \times Titter}{C00}$$

Onde:

5,61 = Produto da multiplicação da massa molar de KOH pela concentração (0,1 mol/L)

EP1 = Volume gasto na titulação da amostra

CV01 = Volume gasto na titulação do branco

Titter = Fator de correção da concentração de KOH

C00 = Massa da amostra

#### 4.1.3 Determinação do perfil graxo

As derivatizações das amostras foram realizadas conforme Metcalfe e Schmitz,<sup>19</sup> em um sistema composto de balão de fundo redondo de 50 mL acoplado a um condensador de refluxo, banho de silicone e chapa de aquecimento com

agitação magnética. No balão contendo 200 mg da fração lipídica extraída com o solvente clorofórmio/metanol 2:1 (item 4.1.1) foi adicionado 3 mL de BF<sub>3</sub>/metanol. A mistura foi mantida sob agitação magnética a 70 °C por 20 minutos.

A fração derivatizada foi transferida para um funil de separação de 150 mL e lavada com 20 mL de água destilada e 15 mL de hexano 95% (*ultra resi analysis*) e, então, foram separadas a fração orgânica, contendo os FAMES, e a fração aquosa. A fração orgânica foi evaporada a pressão reduzida e seca em estufa a 60 °C, para posterior análise.

As análises cromatográficas para determinação do perfil graxo foram realizadas em sistema cromatográfico GCMS-QP2010PLUS (SHIMADZU), equipado com injetor SPLIT/SPLITLESS acoplado com detector de massas. Temperaturas de operação do detector: interface, 280 °C. Detecção no modo *FULL SCAN* com varredura m/z 30 até m/z 500, em um tempo de varredura de 0,2 segundos. O modo de ionização utilizado foi o impacto de elétrons a 70 eV. As condições de operação do cromatógrafo foram: Injetor, 250 °C; coluna, 80 °C (temperatura inicial, 0 min); seguido de gradiente de 10 °C/min até 180 °C e depois 7 °C/min até a temperatura final de 330 °C; fluxo de gás He, 1,3 mL/min; pressão 88,5 kPa; velocidade linear média, 42 cm/s; volume de injeção de 1 mL com razão de SPLIT de 1:100. A coluna utilizada foi CROSSBOND 5 % Difenil/95 % Dimetil polisiloxano (30 m X 0,25 mm X 0,25mm, RESTEK). Os compostos foram identificados pelo tempo de retenção e também foi realizada a confirmação pelos espectros de massas.

#### 4.1.4 Determinação da massa molar média

A massa molecular média foi determinada (g/mol), seguindo a regra para misturas proposta por Kay.<sup>20</sup> A partir dos resultados de perfil graxo, as massas moleculares individuais dos ácidos graxos foram calculadas, considerando os lipídios como triglicerídeos simples de acordo com a expressão:

$$M = 42.078n - 6.048l + 134.042$$

Onde:

(*n*) Número de átomos de carbonos; (*l*) Número de insaturações presentes nos ácidos graxos

Após a obtenção das massas individuais para cada um dos triglicerídeos foi calculada a massa molecular média da fração lipídica utilizando a expressão:

$$M = x_1M_1 + x_2M_2 + x_3M_3 + \dots = \frac{1}{\frac{z_1}{M_1} + \frac{z_2}{M_2} + \frac{z_3}{M_3} + \dots}$$

Onde:

X = Fração molar

M = Massa molecular de cada ácido graxo

Z = Fração mássica

## 4.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS

Na extração da fração lipídica foram comparados dois diferentes métodos de extração, a extração por agitação magnética e a extração com sonda de ultrassom. A fração lipídica obtida pelo método de agitação magnética foi utilizada no processo convencional de produção de FAEEs (extração/transesterificação).

### 4.2.1 Extração de lipídios utilizando agitação magnética

Para as extrações a quente foi utilizado um sistema composto de balão de fundo redondo de 250 mL acoplado a um condensador de refluxo, banho de silicone e uma chapa de aquecimento com agitação magnética.

No balão foi adicionado 20 g de biomassa e 60 mL de solvente, sendo os solventes utilizados metanol, etanol e a mistura de clorofórmio/metanol 2:1, permanecendo a 60 °C sob agitação magnética durante 4 h.

Ao término do tempo de extração a mistura foi filtrada separando o extrato lipídico e a biomassa, a qual foi lavada com o mesmo solvente extrator. O extrato foi evaporado a pressão reduzida e seco em estufa à 60°C até peso constante, para posterior transesterificação.

#### 4.2.2 Extração de lipídios utilizando sonda de ultrassom

Para a extração com sonda de ultrassom foi utilizado um tubo de ensaio contendo 2,5 g de biomassa e 25 mL do solvente extrator (metanol, etanol, clorofórmio/metanol). Durante a extração, a mistura foi mantida nas diferentes temperaturas (25, 40 e 55 °C) e exposto a sonicação direta na mistura biomassa/solvente nos tempos 1, 3 e 5 minutos e amplitudes de 20, 40 e 60%.

O extrato lipídico foi separado da biomassa por filtração, sendo a biomassa lavada com o mesmo solvente, o extrato evaporado a pressão reduzida e então seco em estufa à 60 °C até peso constante, para posterior determinação do teor lipídico.

### 4.3 SÍNTESE DE ÉSTERES ALQUÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS DA MICROALGA *Chlorella sp.*

Com o intuito de poder comparar os rendimentos, os FAEEs foram obtidos pelos métodos de extração seguido de transesterificação e de hidrólise seguido de esterificação.

#### 4.3.1 Produção de FAAEs pelo processo de transesterificação da fração lipídica (método convencional)

A reação de transesterificação ocorreu em um sistema composto por balão de 100 mL de fundo redondo acoplado a um condensador de refluxo, banho de silicone, e placa de aquecimento e agitação magnética.

Na fração lipídica extraída com os diferentes solventes (item 4.2.1) foi adicionado à metade do volume de álcool referente a relação molar 30:1 (álcool:fração lipídica). A mistura foi mantida sob agitação e aquecimento até

alcançar a temperatura de 60 °C e então foi adicionado o catalisador ( $H_2SO_4$ ), 10% em relação a massa da fração lipídica, diluído no restante do álcool. A reação foi mantida sob agitação magnética a 60 °C por 4 horas. Após o tempo reacional o solvente foi evaporado a pressão reduzida, e o produto bruto da reação foi tratado com 100 mL de hexano por 2 horas, depois de filtrados à vácuo, a fração solúvel em hexano (ésteres) foi separada da fração insolúvel (resíduo), que após evaporada sob pressão reduzida foi purificada por coluna filtrante (item 4.6).

#### 4.3.2 Produção de FAAEs pelo processo de Hidrólise seguido de esterificação.

##### 4.3.2.1 Hidrólise (etapa 1)

A hidrólise “in situ” ocorreu em um sistema composto por balão de fundo redondo de 250 mL com três bocas, acoplado a um condensador de refluxo, agitador mecânico, termômetro, banho de silicone e placa de aquecimento.

No balão contendo 20 g de biomassa e 100 mL de hexano foi adicionado o catalisador ( $H_2SO_4$ ) nas proporções de 20, 40 e 60%, em relação à massa de biomassa, previamente diluído em 10 e 20 mL de  $H_2O$ .

A mistura de reação permaneceu a 100 °C sob agitação mecânica por 4 horas. Após o tempo de reação a biomassa foi separada dos ácidos graxos por filtração a vácuo, e tratada com 100 mL de hexano por 2 horas, sendo novamente filtrada. A fração líquida contendo os ácidos graxos foi somada a primeira e ambas evaporadas a pressão reduzida e levada a estufa a 60 °C até peso constante para posterior esterificação.

##### 4.3.2.2 Esterificação (etapa 2)

A esterificação ocorreu em um sistema composto por balão de fundo redondo de 100 mL acoplado a um condensador de refluxo, banho de silicone, placa de aquecimento e agitação magnética.

No balão contendo os ácidos graxos extraídos (item 4.3.2.1) foi adicionada a metade do volume de álcool referente à razão molar de 30:1 (álcool:AG) calculada a partir da massa molecular média (item 4.1.4). Em seguida o catalisador  $H_2SO_4$ , diluído no restante do volume de álcool, foi acrescentado na proporção de 10% em relação a massa de ácido graxo. A reação foi mantida a 100 °C sob agitação magnética por 4 horas. Após o tempo de reação o meio foi neutralizado com NaOH e evaporado a pressão reduzida. O produto bruto da reação foi tratado com 100 mL de hexano por 2 horas e a fração solúvel em hexano (ésteres graxos) foi separada da fração insolúvel (resíduo) por filtração a vácuo, que depois de evaporada sob pressão reduzida foi purificada por coluna filtrante (item 4.6).

#### 4.4 PURIFICAÇÃO

A purificação dos produtos foi realizada em coluna cromatográfica de dimensões 4,5 cm de diâmetro por 32 cm de comprimento, empacotada com 15 g de sílica gel (0,035-0,07 mm, 60 Å) e 45 g de alumina (óxido de alumínio neutro 90, 0,05-0,2 mm, 70-270 mesh ASTM). O bruto reacional foi adicionado à coluna e eluído com hexano e gradientes de acetato de etila. A eluição foi acompanhada com cromatografia de camada delgada em placas contendo sílica gel Merck 60GF<sub>254</sub>, eluente hexano:éter de petróleo (8:2) e exposta a vapores de iodo para revelação.

#### 4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS ÉSTERES

A caracterização foi realizada para confirmar a eficiência do processo de hidrólise obtendo os ácidos graxos como também a eficiência da esterificação obtendo os ésteres alquílicos de ácidos graxos FAEEs, além disso, foi realizada a comparação dos perfis dos ésteres alquílicos de ácidos graxos obtidos pelos processos de hidrólise/esterificação e extração/transesterificação.

##### 4.5.1 Espectroscopia na região do infravermelho

Na espectroscopia na região do infra-vermelho foi utilizado um espectrômetro da marca Shimadzu – IR PRESTIGE 21. Para controle do equipamento foi utilizado

o software IR Solution, a faixa de número de onda foi de 1000-4000  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , e como acessório para suporte da amostra foi utilizado célula de NaCl.

#### 4.5.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN de  $^1\text{H}$  foram realizadas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em um aparelho Varian VNMR5, operando a 300 MHz. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são registrados em ppm e as constantes de acoplamento ( $J$ ) em Hz. Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  têm seus dados expressos como: multiplicidade (s, singleto; d, dubleto; dd, duplo-dubleto; t, tripleto; q, quarteto; m, mutipletto e sl, singleto largo), constante de acoplamento e número relativo de hidrogênios.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS

Foi realizado o estudo comparativo da extração da fração lipídica utilizando sonda de ultrassom e agitação magnética.

#### 5.1.1 Extração de lipídios utilizando agitação magnética.

Na extração da fração lipídica, com agitação magnética, foi utilizado 20 g de biomassa da microalga *Chlorella sp.* em 60 mL de solvente a 60 °C por 4 horas, os solventes utilizados foram a mistura de clorofórmio:metanol 2:1 v/v, metanol e etanol os resultados estão dispostos na Tabela 6.

**Tabela 6.** Médias dos rendimentos da extração da fração lipídica utilizando agitação magnética.

Solvente	Temperatura (°C)	Rendimento* (%)	Desvio padrão (s)
CHCl <sub>3</sub> :CH <sub>3</sub> OH (2:1)	60	20,3	1,7
CH <sub>3</sub> OH	60	16,2	0,5
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	60	13,0	0,2

(\*) Rendimentos em relação a biomassa seca.

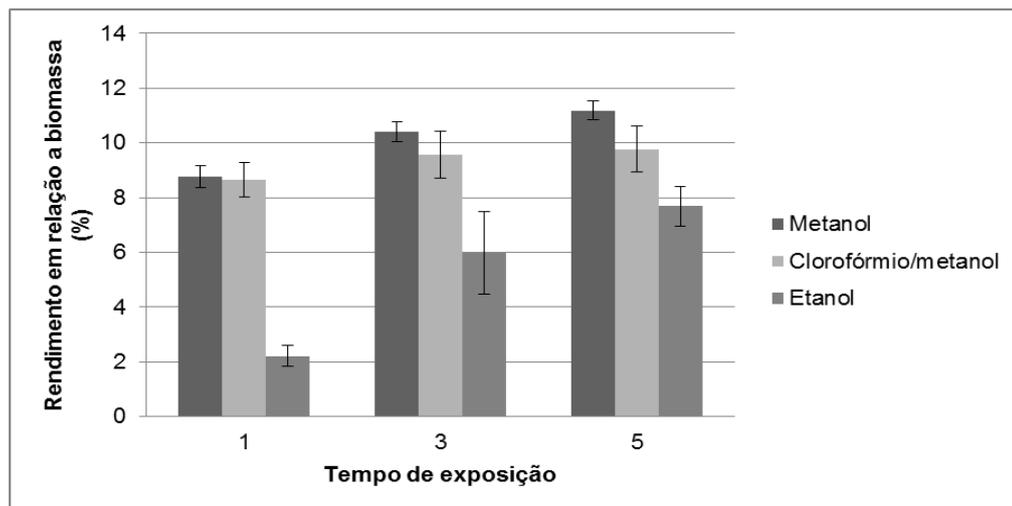
O maior rendimento foi obtido com o solvente clorofórmio/metanol 20,3±1,7% em relação a biomassa seca, seguido de metanol 16,2±0,5 e etanol 13±0,2%, seguindo o mesmo padrão observado na extração em pequena escala a temperatura ambiente.

Com o uso da mistura CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH (2:1) a 60 °C (Tabela 7) foi observada uma grande diferença quando comparada com a extração realizada a temperatura de 25 °C (Tabela 5).

### 5.1.2 Extração de lipídios utilizando sonda de ultrassom

Na extração da fração lipídica, com sonda de ultrassom, foi utilizado 2,5 g de biomassa da microalga *Chlorella sp.* em 25 mL de diferentes solventes (metanol, clorofórmio:metanol 2:1 v/v e etanol), diferentes temperaturas (25, 40 e 55 °C), diferentes tempos de exposição a sonicação (1, 3 e 5 min) e diferentes amplitudes (20, 40 e 60%).

Os resultados obtidos com os diferentes solventes, metanol, etanol e clorofórmio/metanol 2:1 (v/v) e diferentes tempos de exposição à sonicação 1, 3 e 5 minutos estão apresentados no gráfico 17, a temperatura de 25 °C e amplitude de 40%.



**Gráfico 17.** Médias obtidas na extração da fração lipídica utilizando de sonda de ultrassom com diferentes solventes e tempos de exposição à sonda de ultrassom.

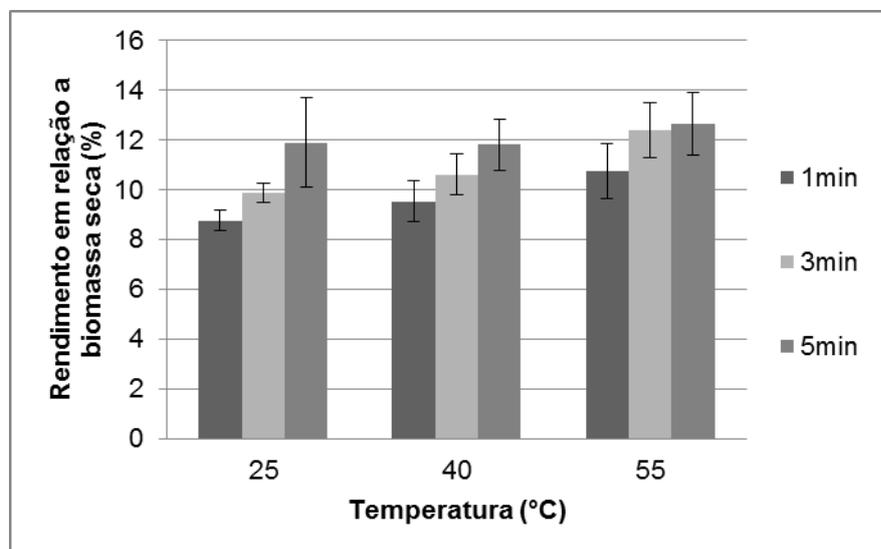
Diferentemente do método convencional (agitação magnética) que se obteve rendimentos maiores, quando utilizado a mistura clorofórmio:metanol 2:1 (v/v) como solvente extrator, na extração usando sonda de ultrassom os melhores rendimentos foram obtidos utilizando o metanol como solvente extrator  $11,2 \pm 0,3\%$  seguidos da mistura clorofórmio:metanol 2:1 (v/v). Isso se deve ao metanol ter uma pressão de vapor menor (92 mmHg à 20 °C) que a do clorofórmio (160 mmHg à 20 °C), apesar de solventes com maior pressão de vapor (mais volátil) facilitarem a cavitação, isso

também ocasiona que uma maior quantidade de vapor entre na bolha de cavitação durante a formação, tornando o colapso menos intenso.<sup>30</sup>

Quando comparados os tempos de extração 1, 3 e 5 minutos os rendimentos obtidos foram  $8,8\pm0,4$ ,  $10,4\pm0,4$  e  $12,0\pm0,3\%$  em relação a biomassa seca respectivamente, quando utilizado metanol como solvente extrator. Os resultados mostram que o aumento do tempo de exposição à sonda, resultaram em rendimentos maiores, o que pode ser confirmado pelo mesmo comportamento nos resultados obtidos com os outros dois solventes clorofórmio:metanol e etanol.

Uma vez que os melhores rendimentos foram obtidos utilizando metanol como solvente extrator as demais variáveis investigadas foram realizadas utilizando apenas metanol.

Com o intuito de aumentar os rendimentos de lipídios, foi investigada a influência da temperatura (25, 40 e 55 °C) nos mesmos tempos, e os resultados estão dispostos no gráfico 18.



**Gráfico 18:** Rendimento médio obtido na extração da fração lipídica da microalga *Chlorella sp.* nos diferentes tempos e temperaturas.

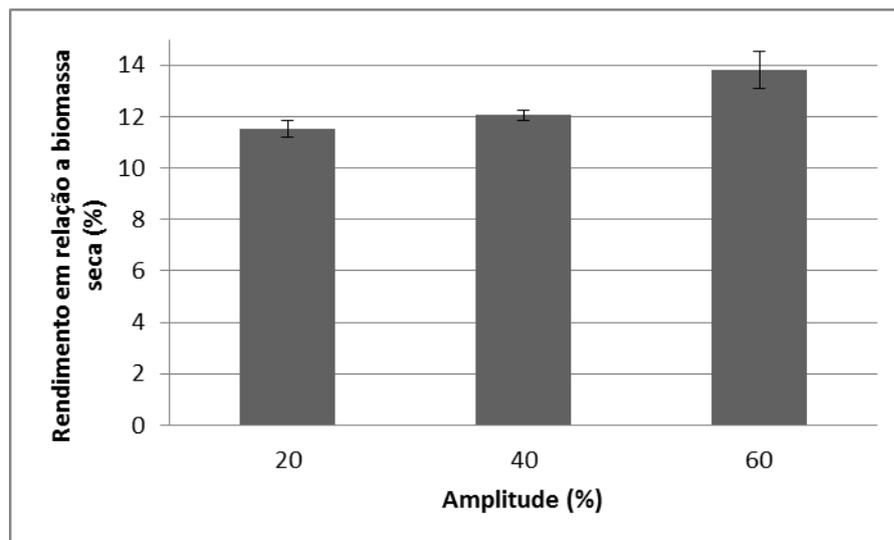
Quando comparados às temperaturas de 25, 40 e 55 °C, no tempo de 5 minutos, os melhores resultados foram obtidos na temperatura de 55 °C  $13,0\pm1,2\%$

em relação à biomassa seca, seguido de  $12,0\pm 1,1$  e  $12,0\pm 0,3\%$  para as temperaturas de 40 e 25 °C respectivamente.

Apesar dos maiores rendimentos terem sido obtidos com temperaturas mais elevadas, este aumento só não foi mais significativo, pois o aumento da temperatura apesar de facilitar a cavitação devido ao aumento da pressão de vapor do meio, ocasiona um colapso de menor intensidade.<sup>30</sup>

Uma vez que os melhores resultados foram obtidos no tempo de 5 minutos à 55 °C, estes parâmetros foram mantidos e com variação da amplitude das ondas de ultrassom.

Os resultados obtidos a partir da extração da fração lipídica da microalga *Chlorella sp.* utilizando sonda de ultrassom nas diferentes amplitudes de 20, 40 e 60%, estão apresentados no gráfico 19.



**Gráfico 19:** Rendimentos médios obtidos na extração da fração lipídica nas diferentes amplitudes utilizando metanol, tempo de 5 min e temperatura de 55 °C.

Na variação da amplitude 20, 40 e 60%, os melhores rendimentos obtidos foram para 60%  $13,8\pm 0,7\%$ , seguido de  $12,6\pm 1,2$  e  $11,5\pm 0,3\%$  em relação à biomassa seca para 40 e 20% de amplitude, respectivamente. O aumento da amplitude acarreta na intensidade da cavitação e assim facilitando a extração de lipídios.<sup>30</sup>

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO LIPÍDICA

De acordo com os objetivos do trabalho foi realizada a caracterização da fração lipídica que consistiu nas determinações de teor lipídico da microalga, índice de acidez, perfil graxo e da massa molecular média.

### 5.2.1 Determinação do teor lipídico

Inicialmente, para a determinação do teor de lipídios da microalga *Chlorella sp.* foi realizada a extração com 1 g de biomassa em 6 mL de solvente por agitação magnética durante 2 h. Os solventes utilizados foram clorofórmio/metanol 2:1 (v/v), metanol, etanol. As médias dos teores obtidos para cada um dos solventes nas diferentes temperaturas estão apresentadas na Tabela 4.

**Tabela 4.** Médias dos teores lipídicos da microalga *Chlorella sp.* extraídos com os diferentes solventes.

Solvente	Temperatura (°C)	Rendimento* (%)	Desvio padrão (s)
CHCl <sub>3</sub> :CH <sub>3</sub> OH (2:1)	25	14,0	0,7
CH <sub>3</sub> OH	25	11,1	0,5
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	25	9,0	0,8
CH <sub>3</sub> OH	60	18,0	0,3
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	60	11,0	0,6

(\*) Rendimentos em relação à biomassa seca.

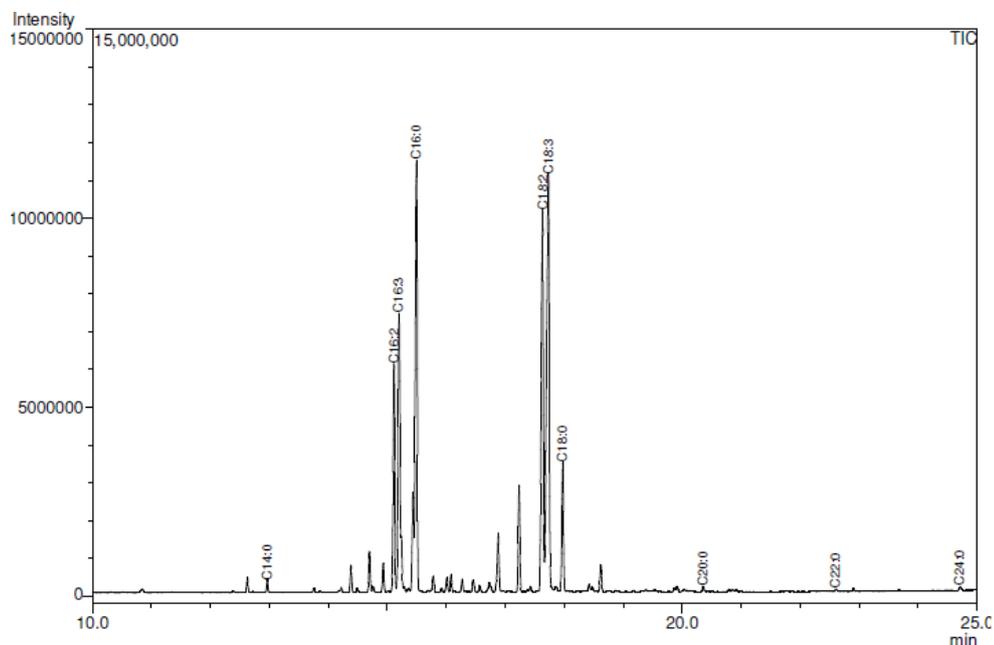
O maior rendimento obtido na extração a temperatura ambiente foi utilizando a mistura de clorofórmio/metanol (2:1) 14,0±0,7% em relação à biomassa seca, seguido de 11,1±0,5 e 9,0±0,8%, utilizando os solventes metanol e etanol, respectivamente. Para as extrações a temperatura 60 °C foram obtidos rendimentos de 18,0±0,3 e 11,0±0,6% em relação a biomassa seca, utilizando os solventes metanol e etanol, respectivamente.

Estes rendimentos estão de acordo com trabalhos anteriores do grupo, em que os melhores resultados foram obtidos utilizando a mistura clorofórmio:metanol

(2:1 v/v) como solvente na extração lipídica da microalga *Chlorella pyrenoidosa*, seguidos dos solventes metanol e etanol.<sup>11</sup>

### 5.2.2 Determinação do perfil graxo da microalga *Chlorella sp.*

Para a determinação do perfil graxo da microalga *Chlorella sp.* a fração lipídica extraída com metanol, utilizando sonda de ultrassom e agitação magnética foi derivatizada na presença de  $\text{BF}_3/\text{MeOH}$ . Os perfis obtidos de acordo com o cromatograma apresentado na Figura 1, bem como a massa molecular média estão demonstrado na Tabela 7.



**Figura 1:** Cromatograma do perfil graxo do extrato metanólico da microalga *Chlorella sp.*

Os resultados mostram uma pequena variação nos perfis graxos das frações extraídas pelos dois diferentes métodos, o que fez com que as massa moleculares de ambas frações divergissem de 857,9 para 866,3 g/mol. Esta variação é evidenciada, principalmente, pela presença do ácido graxo linolênico (C 18:3) com variação de 6,2% e para o ácido graxo esteárico (C 16:0) 2,7%. Para os demais ácidos graxos a variação foi inferior a estes valores.

**Tabela 6:** Perfil graxo da fração lipídica extraída com metanol da microalga *Chlorella sp.*

AG*	Agitação magnética (%)	Sonda de ultrassom
C14:0	0,8	0,4
C16:0	23,8	21,1
C16:2	11,9	9,8
C16:3	15,3	15,0
C17:0	0,8	ND
C18:0	3,3	5,4
C18:2	22,9	20,8
C18:3	20,8	27,0
C20:0	0,4	0,3
C22:0	ND	0,1
C24:0	ND	0,2
<b>Massa molecular</b>	<b>857,9</b>	<b>866,34</b>
<b>Média (g/mol)</b>		

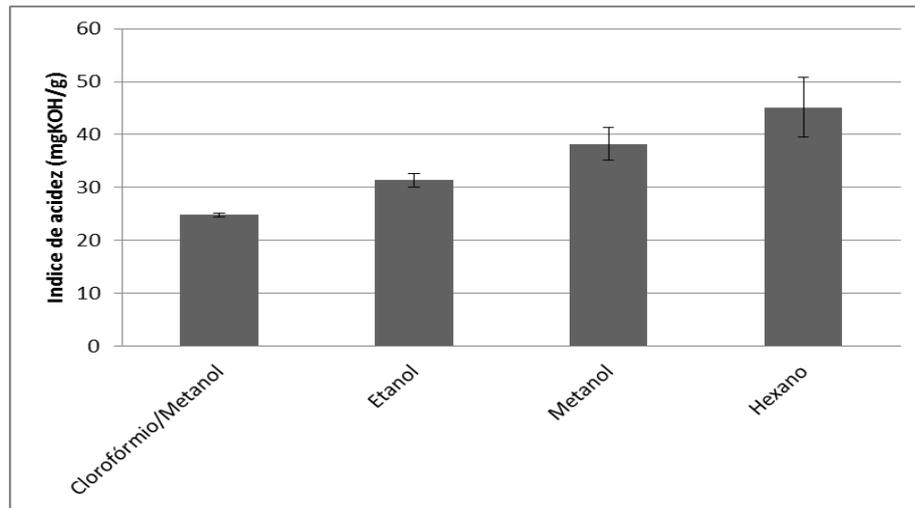
(\*) 14:0 – Ác. tetradecanóico; 16:0 – Ác. hexadecanóico; 16:2 – 9,2-Ác. hexadecadienóico; 16:3 – 7,10,13-Ác. hexadecatrienóico; 17:0 – Ác. heptadecanóico; 18:0 – Ác. octadecanóico; 18:2 – 9,2-octadecadienóico; 18:3 – 9,12,15-Ác. octadecatrienóico; 20:0 – Ác. eicosanóico; 22:0 – Ác. docosanóico e 24:0 – Ác. tetracosanóico.

### 5.2.3 Determinação do índice de acidez da fração lipídica extraída utilizando agitação magnética da microalga *Chlorella sp.*

A determinação do índice de acidez foi realizada com o objetivo de escolher o catalisador (ácido ou básico) mais apropriado para produção dos ésteres. Os resultados obtidos na determinação do índice de acidez da fração lipídica da microalga *Chlorella sp.* extraída nos diferentes solventes clorofórmio/metanol 2:1 (v/v), etanol, metanol e hexano estão dispostos no Gráfico 16.

O maior índice de acidez encontrado foi da fração lipídica extraída com hexano  $45,2 \pm 5,7$  mgKOH/g e a menor foi da fração extraída com o a mistura de

solventes clorofórmio/metanol 2:1 (v/v)  $24,8 \pm 0,4$ . Esta diferença se deve a seletividade do hexano para a extração de lipídios neutros (triglicérides) e ácidos graxos, já na extração utilizando a mistura de solventes clorofórmio/metanol 2:1 (v/v) esta seletividade não é observada, e assim extraíndo outras frações diferentes destas.



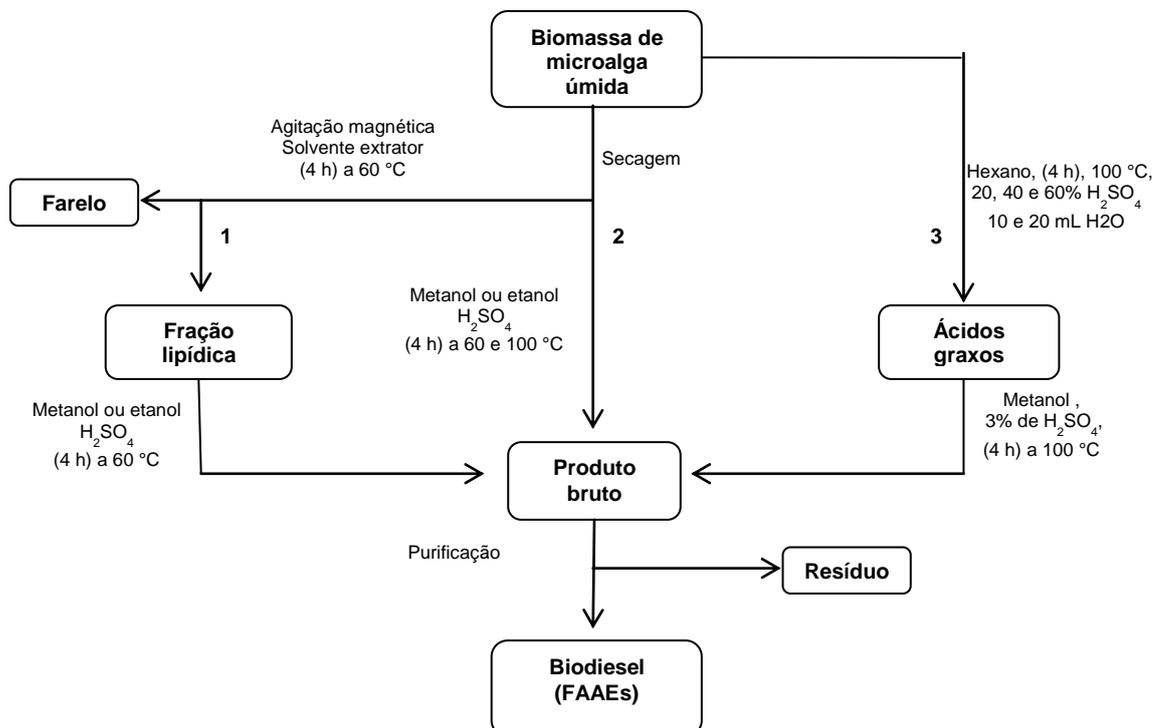
**Gráfico 16:** Índice de acidez da fração lipídica extraída da microalga *Chlorella sp.* com os diferentes solventes.

De acordo com o menor valor do índice de acidez encontrado para a fração extraída com a mistura de solventes clorofórmio/metanol 2:1 (v/v) de  $24,8 \text{ mgKOH/g}$  foi calculada a porcentagem de ácido presente na fração lipídica que foi de 12,1%, valores superiores aos encontrados por Ehimen e colaboradores 2010,<sup>22</sup> para uma biomassa de *Chlorella*, que apresentou índice de acidez de  $10,21 \text{ mgKOH/g}$  e um percentual 5,11%.

De acordo com Ehimen, óleos com altos percentuais de acidez (>5%) tornam a catálise básica inviável, devido a reações indesejadas que inibem a transesterificação, além de dificultarem a separação dos produtos (ésteres) dos co-produtos (glicerol, sabão e etc). Desta forma a catálise ácida foi escolhido, por ser mais adequada para matérias primas com alto índice de acidez.

### 5.3 PRODUÇÃO DE FAEEs PELO PROCESSO DE HIDRÓLISE SEGUIDO DE ESTERIFICAÇÃO.

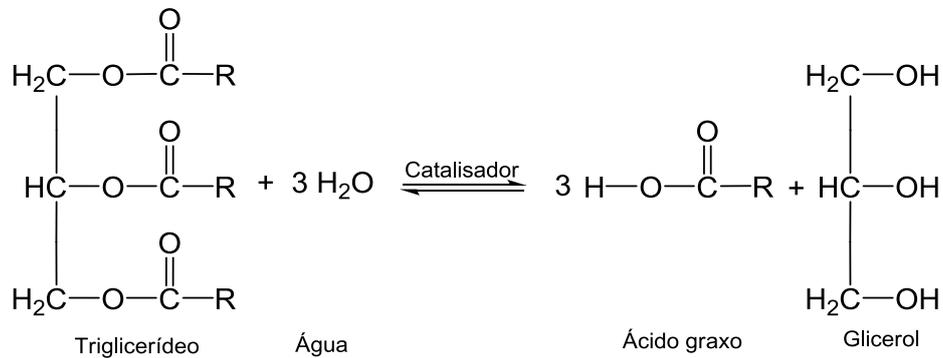
A partir dos processos já estudados em nosso grupo de pesquisa para a produção de ésteres graxos de microalgas: extração seguida da transesterificação, método convencional (caminho 1, Figura 2) e transesterificação “in situ” (caminho 2, Figura 2), nos quais é necessária a etapa de secagem, foi proposto neste trabalho a produção de ésteres graxos com alto teor de umidade a partir da biomassa úmida de microalgas utilizando o processo de hidrólise seguida de esterificação. Os processos já estudados pelo grupo bem como o novo processo são descritos na Figura 2.



**Figura 2:** Fluxograma de produção de ésteres graxos da microalga *Chlorella sp.*

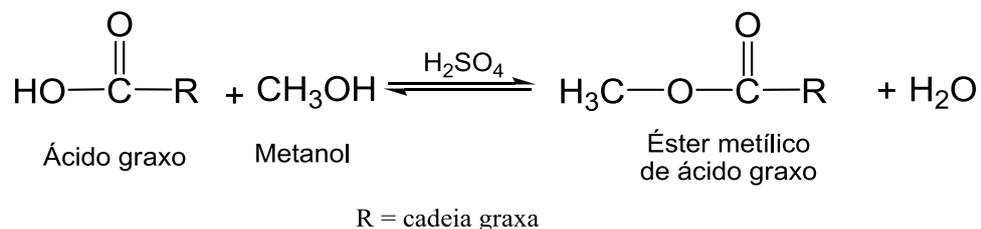
Na primeira etapa do processo de hidrólise seguida de esterificação (caminho 3, Figura 2), ocorre a reação de hidrólise dos lipídios de reserva, onde estes são convertidos em ácidos graxos livres (AGL), que são extraídos concomitantemente

pela presença de hexano no meio reacional. O Esquema 4 apresenta a reação de hidrólise de um triglicerídeo em meio ácido como exemplo.



**Esquema 4:** Reação de hidrólise de um TG na presença de água e catalisador ácido.

Na segunda etapa da hidrólise seguido de esterificação ocorre a esterificação dos ácidos graxos (Esquema 5) na presença de um álcool, levando a formação dos ésteres graxos (biodiesel).



**Esquema 5:** Esterificação de um ácido graxo com metanol.

Com o objetivo de demonstrar as vantagens do processo de hidrólise seguido de esterificação da biomassa úmida da microalga *Chlorella sp.* este processo foi comparado com o processo convencional (extração/transesterificação) que utiliza a biomassa seca. Após os rendimentos foram comparados.

### 5.3.1 Transesterificação da fração lipídica (método convencional).

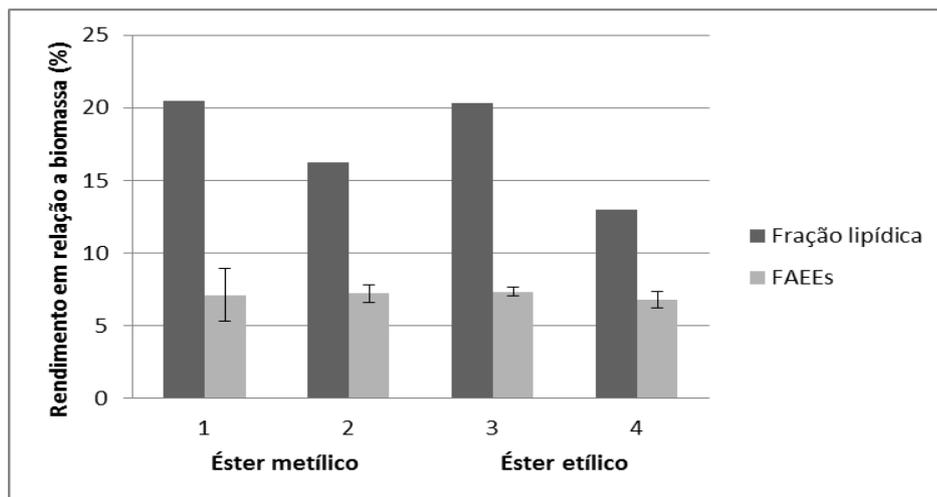
A fração lipídica extraída com os diferentes solventes (item 5.2.1) foi transesterificada na presença de metanol ou etanol e 10% de catalisador ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) a 100 °C por 4 horas. As condições reacionais foram as mesmas utilizadas em trabalhos anteriores<sup>11</sup> e estão descritas na Tabela 7 e as médias dos rendimentos de

extração e de transesterificação, obtidos a partir da microalga *Chlorella sp.* estão apresentados no gráfico 20.

**Tabela 7:** Procedimento experimental para a transesterificação da fração lipídica obtida da biomassa seca.

Entrada	Extração <sup>a</sup>	Transesterificação <sup>b</sup>
1	CHCl <sub>3</sub> :CH <sub>3</sub> OH (2:1 v/v)	CH <sub>3</sub> OH, 10% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
2	CH <sub>3</sub> OH	CH <sub>3</sub> OH, 10% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
3	CHCl <sub>3</sub> :CH <sub>3</sub> OH (2:1 v/v)	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH, 10% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
4	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH, 10% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

a) Extração utilizando banho de ultrassom a 60 °C por 4 horas. b) Transesterificação a 100 °C por 4 horas



**Gráfico 20:** Médias obtidas a partir da extração e transesterificação da microalga *Chlorella sp.*

As conversões da fração lipídica extraída utilizando clorofórmio:metanol 2:1 (v/v) em FAAEs via metanólise e etanólise foram muito próximas 7,1±1,8 e 7,3±0,3% respectivamente. Já a conversão da fração extraída com metanol seguida de metanólise teve rendimento de 7,2±0,6% e a extraída com etanol seguida de etanólise teve rendimento de 6,8±0,6% em relação a biomassa.

Em trabalhos anteriores de nosso grupo, na conversão da fração lipídica em FAAEs, o solvente clorofórmio:metanol 2:1 (v/v) apesar de levar a rendimentos superiores na extração de lipídios quando comparado aos outros solventes, metanol

e etanol, a fração extraída não foi completamente transesterificada, o que pode ser comprovado pelo rendimento muito próximo destes ésteres graxos. Neste trabalho o rendimento de ésteres graxos (FAEEs) a partir das diferentes frações lipídicas também foi semelhante e independe da quantidade de lipídios extraídos.<sup>11</sup>

Após a obtenção dos ésteres graxos pelo processo de extração/transesterificação foi realizado o processo de hidrólise seguido de esterificação.

### 5.3.2 Processo de obtenção de ésteres graxos por hidrólise “in situ” seguida de esterificação da biomassa úmida da microalga *Chlorella sp.*

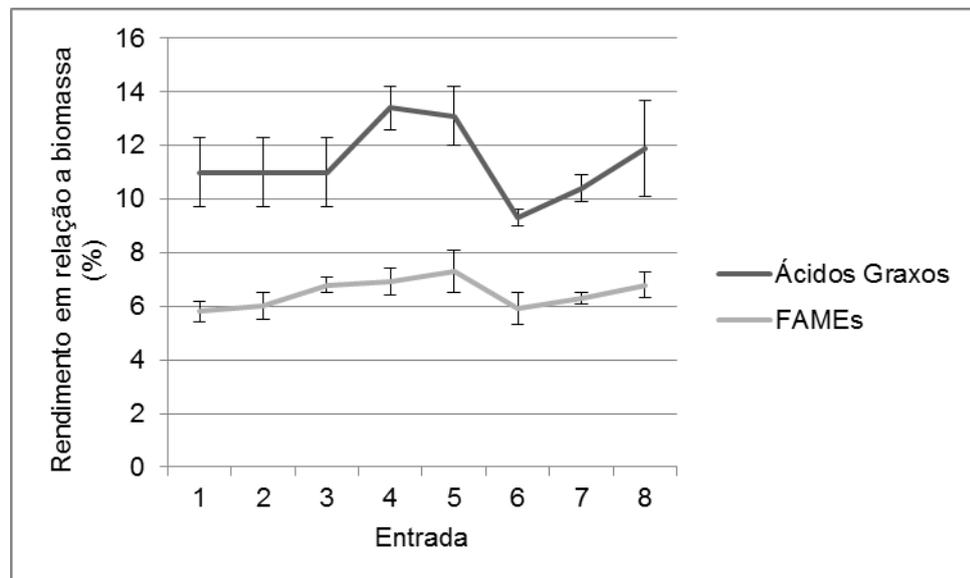
Na primeira etapa, a hidrólise, foi realizada a 100 °C durante 4 h, na presença de 50% e 100% de água (v/v), em relação à biomassa e ácido sulfúrico (20%, 40% e 60% v/v em relação a biomassa seca).

**Tabela 8:** Condições experimentais para a produção de ésteres metílicos de ácidos graxos pelo processo de hidrólise seguido de esterificação.

Entrada	Hidrólise (100 °C, 4 h)	Esterificação (CH <sub>3</sub> OH, 10% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )
		Temperatura e tempo
1	20% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 50% H <sub>2</sub> O	60 °C, 1 h
2	20% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 50% H <sub>2</sub> O	100 °C, 1 h
3	20% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 50% H <sub>2</sub> O	100 °C, 4 h
4	40% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 50% H <sub>2</sub> O	100 °C, 4 h
5	60% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 50% H <sub>2</sub> O	100 °C, 4 h
6	20% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 100% H <sub>2</sub> O	100 °C, 4 h
7	40% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 100% H <sub>2</sub> O	100 °C, 4 h
8	60% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 100% H <sub>2</sub> O	100 °C, 4 h

Neste experimento, uma quantidade de hexano foi necessário para promover a extração simultânea dos ácidos graxos produzidos a partir de processo de hidrólise. Em seguida, o processo de esterificação foi investigada a 60 e 100 ° C durante 1 e 4 h utilizado catalisador ácido  $H_2SO_4$  (10% em relação à massa de ácido graxo) para a conversão dos ácidos graxos em ésteres alquílicos de ácidos graxos (Tabela 8, entradas 1-8).

Em primeiro lugar, na produção FAMEs pelo processo de hidrólise/esterificação, foi estudado as melhores condições para as reações de esterificação. Assim, foram definidas as condições de hidrólise para obtenção de ácido graxos em 20 g de biomassa, 50% (v/v) de água e 20% de catalisador (baseado em biomassa seca) a 100 ° C durante 4 h. Após na esterificação, foi avaliada a diferentes temperaturas, 60 e 100 ° C, e tempos diferentes, 1 e 4 h. Na avaliação de temperaturas, os rendimentos foram próximos,  $5,8 \pm 0,4$  e  $6,0 \pm 0,5\%$ , em relação à biomassa inicial, respectivamente (Gráfico 21, as entradas 1-2). Quando a temperatura fixa de 100 ° C para avaliação do tempo, 1 e 4 h, os rendimentos foram de  $6,0 \pm 0,5$  e  $6,8 \pm 0,3\%$ , em relação à biomassa, respectivamente (Gráfico 21, as entradas 2-3).



**Gráfico 21:** Rendimentos de ácidos graxos e de ésteres metílicos de ácidos graxos obtidos no processo de hidrólise/esterificação.

A fim de aumentar os rendimentos de FAMES foram avaliadas quantidades diferentes de água, 50% e 100% v/v de catalisador ácido  $H_2SO_4$  (20%, 40% e 60%, com base na biomassa seca) na etapa de hidrólise.

Na avaliação da quantidade de água, os rendimentos de FAMES de utilização de 100% foram menores do que o obtido a partir de 50%, em todas as quantidades de catalisador. Esta diminuição pode ser causa pela diluição do catalisador ( $H_2SO_4$ ) em quantidades superiores de água, que foi evidenciado pela avaliada de diferentes quantidades de catalisador. Além disso, uma vez que a reação ocorrer em duas fases, uma fase apolar (em maior quantidade) contendo hexano e os ácidos graxos e uma fase polar contendo água, biomassa, álcool e catalisador, o aumento na fase polar causa uma diminuição da fluidez de meio de reação, dificultando a extração de ácidos graxos do meio.

Na avaliação da quantidade de catalisador 20%, 40% e 60% em 100% de água em relação à biomassa, os rendimentos de FAMES obtidos na etapa de esterificação foram de  $5,9 \pm 0,6$ ,  $6,3 \pm 0,2$  e  $6,8 \pm 0,5\%$  em relação para a biomassa inicial, respectivamente (Gráfico 21, entradas 6-8). Quando usado 50% de água, variando a quantidade de catalisador, os rendimentos foram de  $6,8 \pm 0,3$ ,  $6,9 \pm 0,2$  e  $7,3 \pm 0,8\%$ , em relação à biomassa inicial, respectivamente (Gráfico 21, entradas 3-5). De acordo com os resultados obtidos, foi observado que o aumento da quantidade de catalisador teve um efeito positivo nos rendimentos obtidos, para as duas proporções de água.

Contudo comparando os métodos de produção de FAMES, o método convencional e de extração seguido de transesterificação e o de hidrólise “in situ” seguido de esterificação, os rendimentos obtidos foram muito próximo,  $7,3 \pm 0,2\%$  para o método convencional e  $7,3 \pm 0,8\%$  para o método de hidrólise/esterificação. A grande vantagem do processo de hidrólise “in situ” seguido de esterificação é a eliminação da etapa de secagem da biomassa.

## 5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS

### 5.4.1 Espectroscopia na região do infravermelho

A análise por espectroscopia de infravermelho foi realizada com o objetivo de caracterizar os produtos obtidos no processo de hidrólise “in situ” seguido de esterificação. O espectro obtido a partir dos ácidos graxos, produto da reação de hidrólise, está apresentado na figura 3, e o espectro de infravermelho obtido a partir do produto da reação de esterificação esta apresentado na Figura 4.

No espectro (Figura 3) foi observado um estiramento forte de C=O (carbonila) em  $1708\text{ cm}^{-1}$  e banda larga de absorção de O-H (hidroxila) em  $3400$  a  $2500\text{ cm}^{-1}$ , absorções características de ácidos carboxílicos. Além disso, foram observadas duas bandas de absorções entre  $2926$  a  $2855\text{ cm}^{-1}$ , característico do estiramento C-H de carbono  $\text{sp}^3$ , em  $3010\text{ cm}^{-1}$  estiramento C-H de carbono  $\text{sp}^2$ , e em  $1462$  e  $1442\text{ cm}^{-1}$  estiramento assimétrico de  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ , absorções características de cadeia carbônica.

No espectro (Figura 4) foi observado o estiramento forte característico da carbonila de éster em  $1742\text{ cm}^{-1}$ , o estiramento de C-O-C em  $1256\text{ cm}^{-1}$ , e o estiramento em  $1363\text{ cm}^{-1}$  de  $\text{CH}_3$  do éster. Além disso, foram observadas duas bandas de absorções entre  $2924$  a  $2855\text{ cm}^{-1}$ , característico do estiramento C-H de carbono  $\text{sp}^3$ , em  $3011\text{ cm}^{-1}$  estiramento C-H de carbono  $\text{sp}^2$ , e em  $1462$  e  $1436\text{ cm}^{-1}$  estiramento assimétrico de  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ , absorções características de cadeia carbônica.

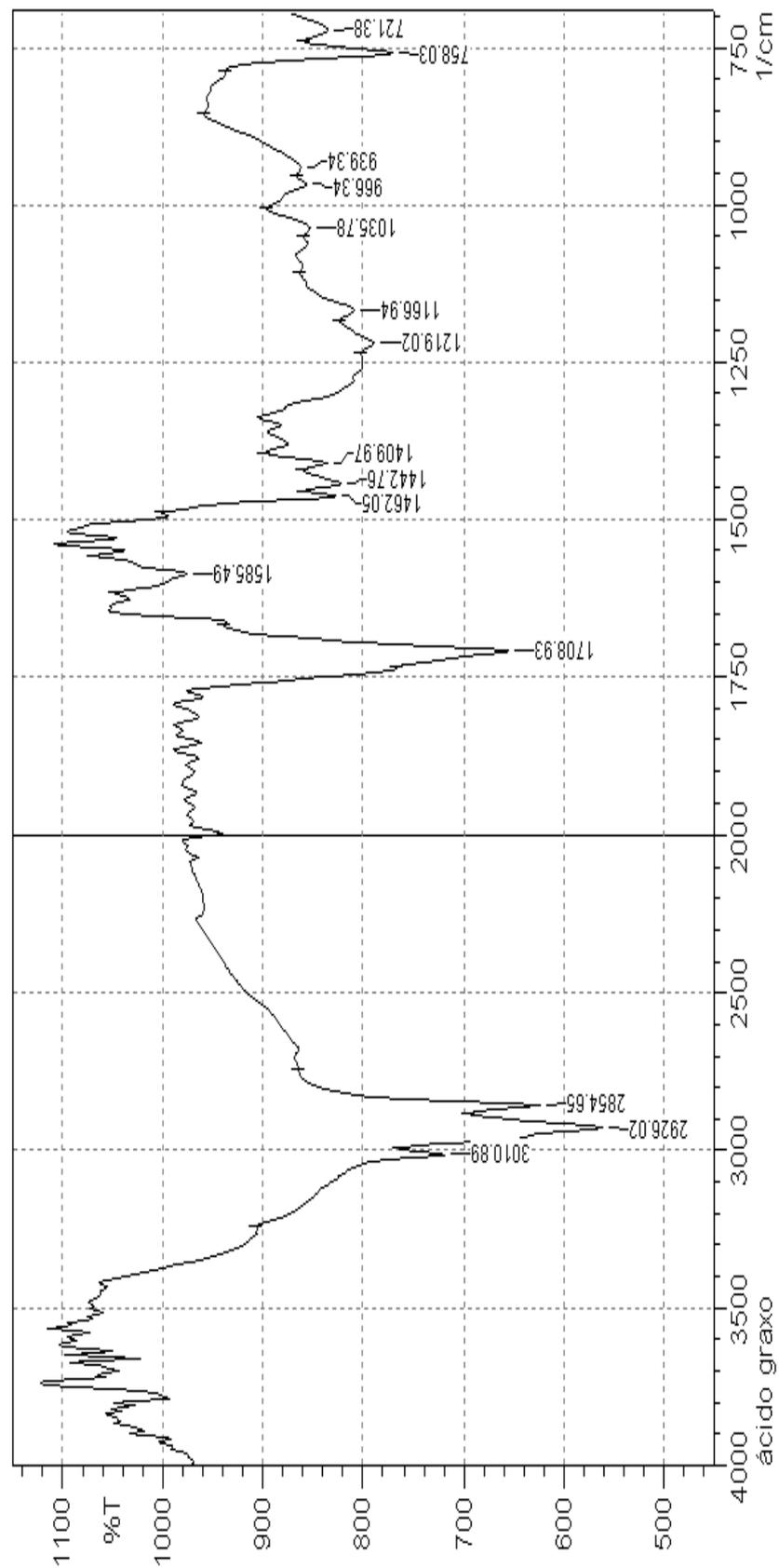
### 5.4.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A partir do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4) foi possível confirmar a formação dos ésteres metílicos de ácidos graxos na amostra obtida no processo de hidrólise seguido de esterificação. Na Figura 5 o sinal que comprova a formação de éster metílico é um singlete em  $3,7\text{ ppm}$  característico de metoxila de éster.

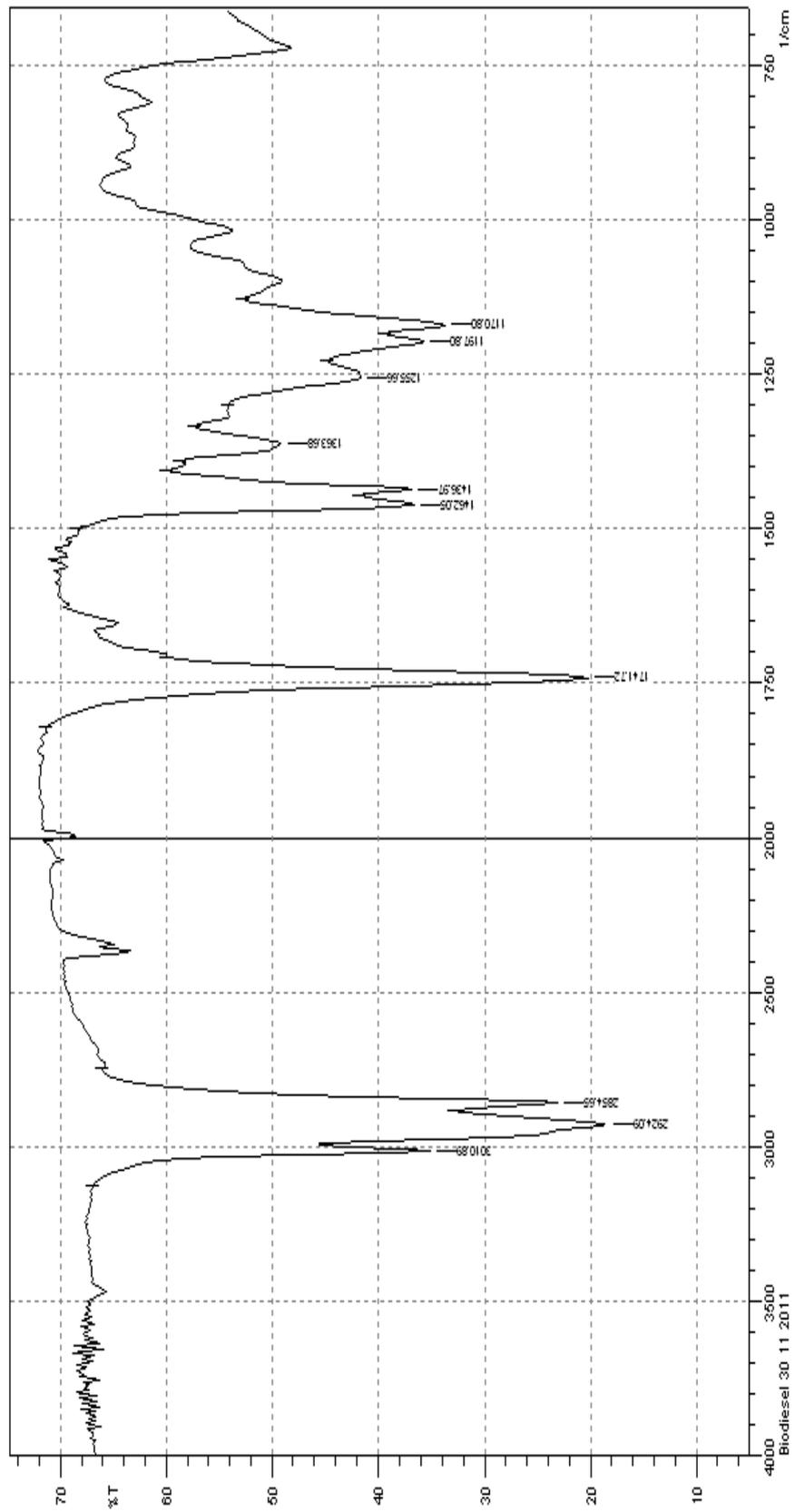
Os sinais que comprovaram a formação dos ésteres foram diferentes dos esperados para os triacilglicerídeos que apresentam sinais em aproximadamente  $5\text{ ppm}$  referente ao hidrogênio metínico (CH) e dois duplos dubletos em  $4,4$ - $4,2\text{ ppm}$

referente aos hidrogênios metilênicos ( $\text{CH}_2$ ) assim como os sinais esperados para ácidos graxos em aproximadamente 10 ppm característico de hidrogênio carboxílico.

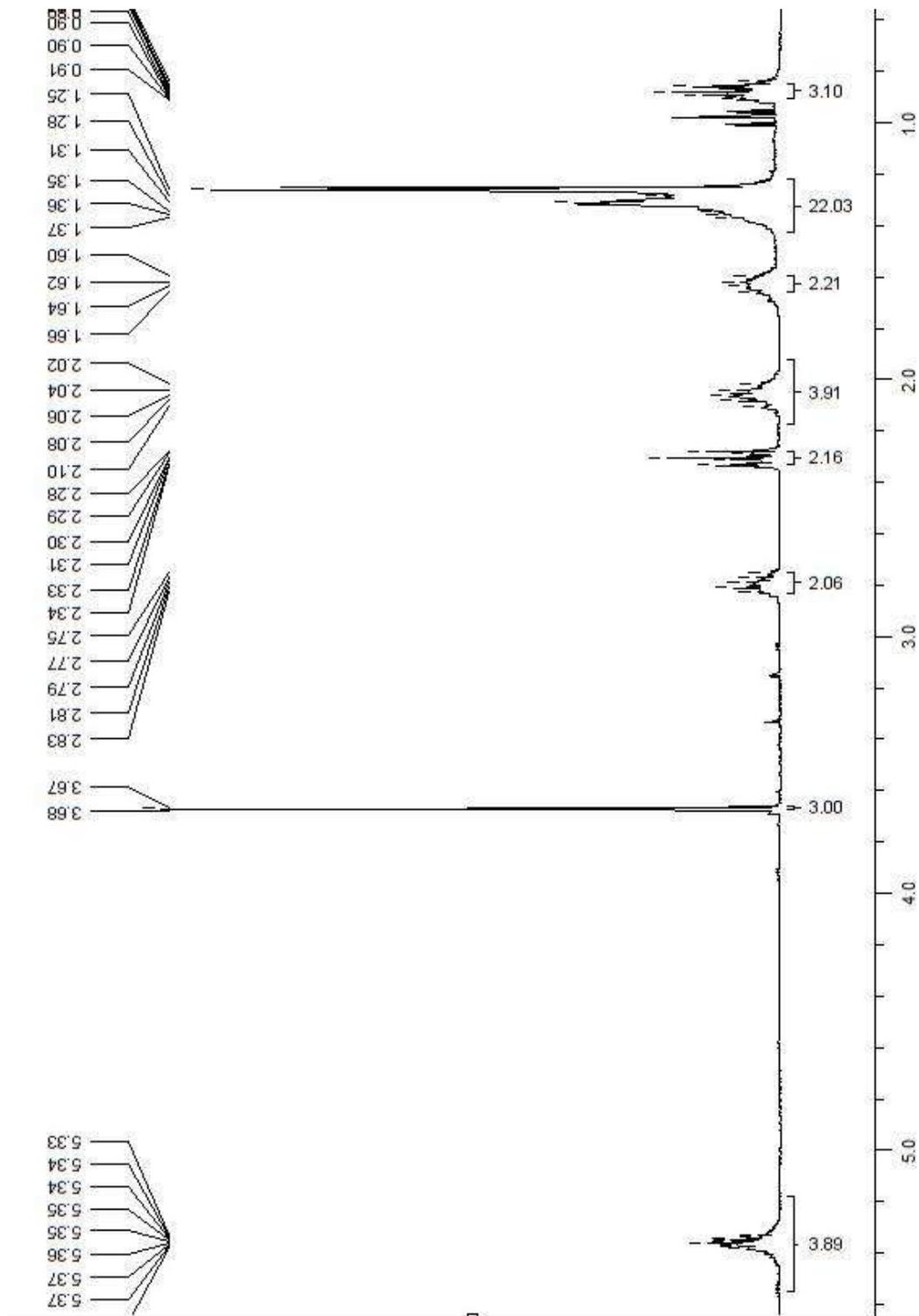
Os demais sinais encontrados no espectro (Figura 5) são referentes a composição estrutural das cadeias graxas dos ésteres. Em 5,4 ppm foi observado um multiplete relativo aos hidrogênios vinílicos, um multiplete em 2,8 ppm referente aos hidrogênios bis-alílicos, um multiplete em 2,3 ppm referente aos hidrogênios do  $\text{CH}_2$   $\alpha$ - carbonila, um multiplete em 2,1 ppm referentes aos hidrogênios alílicos e um multiplete em 1,6 ppm referente aos hidrogênios  $\beta$ -carbonila. Os hidrogênios metilênicos foram observados como um multiplete em 1,3 ppm e em 0,8 ppm foi observado um tripleto referente ao  $\text{CH}_3$  da cadeia graxa.



**Figura 3:** Espectro de infravermelho, utilizando célula de NaCl, dos AG obtidos na hidrólise da microalga *Chlorella sp.*



**Figura 4:** Espectro de infravermelho (célula de NaCl) dos FAMES da microalga *Chlorella sp.*



**Figura 5.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) dos FAMES da microalga *Chlorella* sp.

### 5.4.3 Perfil graxo dos ésteres obtidos pelos métodos de extração/transesterificação e hidrólise/esterificação.

Os perfis de ésteres alquílicos de ácidos graxos FAEEs, obtidos a partir dos dois métodos de extração/transesterificação e hidrólise/esterificação estão dispostos na tabela 10.

**Tabela 10:** Perfis de ésteres alquílicos de ácidos graxos obtidos pelos dois processos estudados:

FAME		TR	A	B
Hexadecadienoato de metila	C16:2	15.11	6.5	7.2
Hexadecatrienoato de metila	C16:3	14.87	9.9	14.1
Hexadecaenoato de metila	C16:1	14.74	1.7	1.7
Hexadecanoato de metila	C16:0	14.82	26.8	21.8
Heptadecanoato de metila	C17:0	16.35	0.3	0.0
Octadecadienoato de metila	C18:2	17.57	22.1	20.3
Octadecatrienoato de metila	C18:3	17.22	29.2	31.9
Octadecanoato de metila	C18:0	17.31	3.6	3.1

A: Extração/transesterificação e B: Hidrólise/esterificação; TR: Tempo de retenção

Nos perfis graxos obtidos para cada uma das amostras, houve uma flutuação nas porcentagens dos ácidos graxos, entretanto esta flutuação pode ser tanto no método de determinação como também próprio processo de purificação dos FAMEs.

## 6. Conclusão

Conforme os objetivos deste trabalho, foi realizado o estudo sobre extração de lipídios da microalga *Chlorella sp.* a partir de diferentes métodos, agitação magnética e sonda de ultrassom; sob condições distintas de temperatura e tempo. Os melhores resultados foram obtidos pelo método de agitação magnética utilizando clorofórmio:metanol 2:1 (v/v) como solvente extrator. Resultados semelhantes foram obtidos pelo método de sonda de ultrassom em um tempo aproximadamente 20 vezes menor.

Embora resultados superiores tenham sido alcançados, pelo método de agitação magnética por 240 minutos a 60 °C utilizando clorofórmio:metanol (2:1 v/v) como solvente extrator, a conversão da fração lipídica em FAMES permanecem na mesma média encontrada em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa.

O perfil graxo da fração lipídica da microalga *Chlorella sp.* apresentou diferentes ácidos graxos, os quais variaram de 14 a 24 átomos de carbono, sendo que destes ácidos graxos 29,1% são saturados e 70,9% de insaturados.

Na determinação do índice de acidez da fração lipídica extraída com agitação magnética em diferentes solventes, o maior índice foi para o solvente hexano  $45,2 \pm 5,7$  mgKOH/g e o menor para a mistura de solventes clorofórmio:metanol 2:1  $24,8 \pm 0,4$  mgKOH/g, mesmo o menor valor encontrado é muito superior ao indicado para a transesterificação básica, sendo neste caso a catálise ácida a mais indicada evitando assim a formação de sabão e facilitando a purificação.

Na produção de FAMES a partir do método convencional (extração seguida de transesterificação), o maior rendimento encontrado  $7,1 \pm 0,3\%$ , foi na transesterificação da fração lipídica extraída utilizando a mistura de solventes clorofórmio/metanol (2:1 v/v).

Já a partir do método de hidrólise seguida de esterificação, após a otimização das condições das reações de hidrólise e esterificação da microalga *Chlorella sp.*, o maior rendimento encontrado foi de  $7,3 \pm 0,8\%$  em relação a biomassa inicial.

Levando em consideração as características das biomassas de microalga, tais como o alto índice de acidez na fração lipídica da microalga *Chlorella sp.*, o método de hidrólise “in situ” seguido de esterificação proposto apresenta como principal vantagem a possibilidade de utilização de biomassa úmida, o que evita ou ao menos reduz, um dos processos mais onerosos e um dos gargalos para o aumento de escala da produção de FAAEs derivados de microalgas, que é a secagem da biomassa.

## 7. Bibliografia

1. AMARO, H. M.; GUEDES, A. C.; MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy* **2011**, 88, 3402-3410.
2. TABATABAEI, M.; TOHIDFAR, M.; JOUZANI, G. S.; SAFARNEJAD, M.; PAZOUKI, M. Biodiesel production from genetically engineered microalgae: Future of bioenergy in Iran. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2011**, 15, 4, 1918-1927.
3. DEMIRBAS, A. Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems. *Applied Energy* **2011**, 88, 10, 3541-3547.
4. Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustível; **2011**; ISSN 1983-5884
5. Agência Nacional do Petróleo-ANP.  
Disponível em:  
<http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll?f=templates&fn=default.htm&vid=anp:10.1048/enu>. Acesso em 15/01/2012.
6. CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* **2007**, 25, 294-306.
7. MOAZAMI, N.; RANJBAR, R.; ASHORI, A.; TANGESTANI, M.; NEJAD, A. S. Biomass and lipid productivities of marine microalgae isolated from the Persian Gulf and the Qeshm Island. *Biomass and Bioenergy* **2011**, 35, 5, 1935-1939.
8. SÁNCHEZ, E.; OJEDA, K.; EL-HALWAGI, M.; KAFAROV, V. Biodiesel From Microalgae Oil Production in Two Sequential Esterification/Transesterification Reactors: Pinch Analysis of Heat Integration. *Chemical Engineering Journal* **2011**, 1-6.

9. MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2010**, *14*, 217-232.
10. Okuda, K. Structure and phylogeny of cell coverings. *Journal Plant Resource*, **2001**, *115*, 283–288.
11. D'OCA, M. G. M.; VIÊGAS, CAROLINA V.; LEMÕES, J. S. *et al.* Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. *Biomass and Bioenergy*, **2011**, *35* (4), 1533-1538.
12. LEE, J.-Y.; YOO, C.; JUN, S.-Y.; AHN, C.-Y.; OH, H.-M. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology* **2010**, *101*, S75-7.
13. CHENG, C.-H.; DU, T.-B.; PI, H.-C. Comparative study of lipid extraction from microalgae by organic solvent and supercritical CO<sub>2</sub>. *Bioresource Technology* **2011** *102*, 10151-10153.
14. MIAO, X.; WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource technology* **2006** *97*, 841-6.
15. LI, X.; XU, H.; WU, Q. Large-Scale Biodiesel Production From Microalga *Chlorella protothecoides* Through Heterotrophic Cultivation in Bioreactors. *Biotechnology* **2007** *98*, 764-771.
16. UMDU, E. S.; TUNCER, M.; SEKER, E. Transesterification of *Nannochloropsis oculata* microalga's lipid to biodiesel on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> supported CaO and MgO catalysts. *Bioresource technology* **2009** *100*, 2828-31.

17. Zhu, M.; Zhou, P. P.; Yu, L. J. Extraction of lipids from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids. *Bioresource Technology* **2002** *84*, 93-95.
18. Bligh, E.; Dyer, W. A rapid method of total lipid extraction and purification Canadian. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **1966** *38*, 911-017.
19. Metcalfe, L. d.; Schmitz, A. A.; Pelka, J. R. Rapid Preparation of Fatty Acid Esters from Lipids for Gas Chromatographic Analysis. *Analytical Chemistry* **1966** *38*, 514-515.
20. Agencia Nacional do Petróleo-ANP.  
Disponível em:  
[http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/folder\\_portarias\\_anp/portarias\\_anp\\_tec/2003/setembro/panp%20255%20-%202003.xml](http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/folder_portarias_anp/portarias_anp_tec/2003/setembro/panp%20255%20-%202003.xml). Acesso em 15/01/2012.
21. EHIMEN, E. A.; SUN, Z. F.; CARRINGTON, C. G. Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids. *Fuel* **2010** *89*, 677-684.
22. KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. Manual do Biodiesel. Editora Blucher, São Paulo , **2006**, ISBN: 9788521204053.
23. BOROWITZKA, M. A. Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology* **1997** *89*, 393–401.
24. KNUCKEY, R. M.; BROWN, M. R.; ROBERT, R.; FRAMPTON, D. M. F. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquacultural Engineering* **2006** *35*, 300–313.

25. GRIMA, E. M.; BELARBI, E. H. FERNÁNDEZ, A.; MEDINA, A. R.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances* **2003** *20*, 491–515.
26. D'OCA, M. G. M. ; BACELLAR, L. B. ; CUNHA, P. C. R. ; ABREU, P. C ; PRIMEL, E. G . Removal of pollutants from produced water involves using microalgae originating from algal cultures which have passed through process of natural selection adapting them to environment provided by the produced water, **2009**, US2009200230-A1.
27. XU, R.; MI, Y.; Simplifying the Process of Microalgal Biodiesel Production Through In Situ Transesterification Technology, *journal american oil chemist society* **2011** *88*, 91-99.
28. LI, Y.; LIAN, S.; TONG, D.; SONG, R.; YANG, W.; FAN, T.; QING, C.; One-step production of biodiesel from *Nannochloropsis sp.* on solid base Mg–Zr catalyst, *Applied Energy* **2011** *88*, 3313–3317.
29. LEVINE, R. B.; PINNARAT, T.; SAVAGE, P. E.; Biodiesel Production from Wet Algal Biomass through in Situ Lipid Hydrolysis and Supercritical Transesterification, *Energy Fuels* **2010**, *24*, 5235–5243.
30. DUARTE, F. A. Emprego de ultrassom para a oxidação e separação de compostos orgânicos sulfurados em hidrocarbonetos e determinação de enxofre por técnicas espectrométricas e cromatográficas. Tese de doutorado defendida no Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria, **2009**.
31. XU, L., GUO, C., WANG, F., ZHENG, S., LIU, C. Z., A simple and rapid harvesting method for microalgae by in situ magnetic separation, *Bioresource Technology* **2011**, *102*, 10047–10051.
32. ORTA, C. B., LEE, J. G. M., HARVEY, A., Alkaline in situ transesterification of *Chlorella vulgaris*, *Fuel* **2012**, *94*, 544–550.
33. 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**, *102*, 2724–2730.

34. LI, P., MIAO, X., LI, R., ZHONG, J., In Situ Biodiesel Production from Fast-Growing and High Oil Content *Chlorella pyrenoidosa* in Rice Straw Hydrolysate, *Biomedicine and Biotechnology* **2011**.

