

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Programa de Pós-Graduação
em Química



Oxidação da parede celular da microalga *Chlamydomonas sp.* para extração de lipídios e avaliação da sua qualidade para síntese de biodiesel

Carlos Augusto Cabral Kramer

Dissertação de Mestrado
Natal/RN, março de 2017

Carlos Augusto Cabral Kramer

Oxidação da parede celular da microalga *Chlamydomonas sp.* para extração de lipídios e avaliação da sua qualidade para síntese de biodiesel.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de mestre em Química

Orientadora: Profa. Dr^a Ana Cristina
Facundo de Brito Pontes
Co-orientadora: Profa. Dr^a Marta Costa

Natal-RN
2017

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Francisco Gurgel De Azevedo – Instituto Química - IQ

Kramer, Carlos Augusto Cabral.

Oxidação da parede celular da microalga *Chlamydomonas* sp. para extração de lipídios e avaliação da sua qualidade para síntese de biodiesel / Carlos Augusto Cabral Kramer. - Natal, RN, 2017.
123 f.: il.

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Instituto de Química, Programa de Pós Graduação em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Facundo de Brito Pontes.
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Marta Costa.

1. Biodiesel de microalga - Dissertação. 2. Biocombustíveis - Dissertação. 3. Microalga *Chlamydomonas* sp. - Oxidação da parede celular - Dissertação. I. Pontes, Ana Cristina Facundo de Brito. II. Costa, Marta. III. Título.

RN/UF/BS-IQ

CDU 662.756.3(043.3)

Carlos Augusto Cabral Kramer

OXIDAÇÃO DA PAREDE CELULAR DA MICROALGA CHLAMYDOMONAS SP.
PARA EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS E AVALIAÇÃO DA SUA QUALIDADE PARA
SÍNTESE DE BODIESEL

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Química da
Universidade Federal do Rio Grande do
Norte, em cumprimento às exigências para
obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em: 09 de março de 2017

Comissão Examinadora:



Dra. Ana Cristina Facundo de Brito Pontes – UFRN (orientadora)



Dra. Marta Costa – UFRN (coorientadora)



Dr. Tiago Pinheiro Braga – UFRN



Dr. Norberto de Kassio Vieira Monteiro – UERN

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Carlos Augusto Kramer Alves e Maria Rosângela Cabral Costa por me oferecerem educação e me mostrarem o caminho para me tornar hoje quem sou. À minha companheira Priscila Krüger pela paciência, apoio, estímulo e compreensão.

A todos os meus professores, desde o Jardim de infância até a pós-graduação, em especial a minha orientadoras de mestrado, Dr^a Marta Costa e Dr^a Ana Cristina Facundo de Brito Pontes por terem me guiado durante a realização deste trabalho, juntamente com Dr^o Carlos Souto que me integrou à iniciação científica em 2011 e me acompanha até o momento.

Aos meus colegas de trabalho acadêmico, Dr^a Suzan Medeiros, prof. Anderson Gomes, Eloiza dos Santos, Elizeu Mazzo, Edimilson Matias e Victor Reis pelos longos períodos de debate científico e planejamento experimental que contribuíram significativamente para a execução desta pesquisa.

Aos professores Dr^o Norberto Monteiro e Dr^o Thiago Pinheiro Braga e por humildemente aceitarem participar da comissão avaliadora e por toda colaboração científica prestada.

À toda central analítica pelo apoio material e pessoal prestado, especialmente ao técnico Joadir Júnior pela prontidão, pontualidade e paciência nas muitas caracterizações termogravimétricas e espectroscópicas.

Aos meus amigos da graduação e pós-graduação, em especial a Ricardo Pedroza, por compartilharmos muitos cafés sob intenso cansaço físico e mental após longas horas de estudos e dedicação à pesquisa aplicada.

Ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte pelo apoio científico e físico.

À Agencia Nacional do Petróleo, Gás Natural e bicompostíveis que através do Programa Multidisciplinar em Petróleo e Gás (PRH-30) nos deu apoio financeiro que sustentou este trabalho.

“Os anos ensinam muitas coisas que os dias desconhecem”

Ralph Waldo Emerson

RESUMO

A produção de microalgas para fins energéticos tem se tornado um caminho alternativo à indústria do petróleo por oferecer biocombustíveis renováveis como o bioálcool, bio-óleo e o biodiesel. Este último é produzido através da reação de transesterificação do material lipídico que em geral as microalgas produzem naturalmente. Contudo, uma das grandes dificuldades na produção do biodiesel de microalgas em grande escala é a ausência de métodos eficientes e pouco onerosos para extração de lipídios. Assim, o presente trabalho estudou a eficiência da oxidação da parede celular da microalga do gênero *chlamydomonas sp.* com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na extração de lipídios, avaliando também os impactos na qualidade dos lipídios extraídos. Percebendo que aumento da concentração de H_2O_2 promove um aumento de 60% no rendimento lipídico, um indicativo da facilitação do rompimento da parede celular, que foi comprovado pelo perfil termogravimétrico da biomassa residual e pela mudança do formato da célula por microscopia óptica. Porém, percebeu-se que os parâmetros de qualidade diminuíram após aplicação do método, provocando um aumento dos índices de acidez e de peróxidos orgânicos, além de uma queda no índice de iodo. Contudo, o perfil espectroscópico na região de infravermelho do material lipídico extraído com e sem ação oxidante praticamente são idênticos, indicando que a diminuição dos parâmetros de qualidade não afeta significativamente os principais grupos funcionais que compõe os extratos. O material lipídico obtido após uso do método oxidativo foi transesterificado, ou seja, convertido em biodiesel, atingindo conversões a cima de 96% comprovadas via análise de cromatografia gasosa.

Palavras-chave: Oxidação da parede celular. Biodiesel de microalga. Parâmetros de qualidade

ABSTRACT

The production of microalgae for energy purposes has become an alternative route to the oil industry by offering renewable biofuels such as bioethanol, bio-oil and biodiesel. The biodiesel is produced by transesterification of the lipid material and in general cases microalgae produce lipids naturally. However, one of the great difficulties in the production of biodiesel from microalgae on a large scale is the lack of efficient methods and inexpensive for lipid extraction. Thus, this paper studied the cell wall oxidation efficiency of microalgae of the genus *Chlamydomonas sp.* with hydrogen peroxide (H_2O_2) in the extraction of lipids, also assessing the impact on the quality of the extracted lipids. The increase H_2O_2 concentration promotes an increase of 60% in lipid yield, indicative of facilitating the disruption of the cell wall, which was proved by thermogravimetric profile of residual biomass and the change of the cell by optical microscopy. However, it was noted the quality parameters decreases after application of the method, generating higher acid numbers and organic peroxides, besides a decrease in iodine content. However, the spectroscopic profile in the infrared region of the lipid extracted material with and without oxidizing action are almost identical, indicating that the decrease of the quality parameters does not significantly affect the major functional groups belonging extracts. The lipid material obtained after use of the oxidative method was completely transesterified, that is, converted into biodiesel, reaching conversions above 96% proven by gas chromatography analysis.

Keywords: cell wall oxidation. Biodiesel from microalgae. Quality Parameters

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Matérias-primas na produção de biodiesel no Brasil em 2011	22
Figura 2 - Reação global de transesterificação.....	23
Figura 3 - Mecanismo da reação de transesterificação	23
Figura 4 - Reação de esterificação.....	24
Figura 5 -Hidrólise de triglicerídeo	25
Figura 6 - Cultivo outdoor (a) e Indoor (b)	27
Figura 9 - Estrutura da celulose	33
Figura 10 - Estrutura da lignina	33
Figura 11 - Estrutura do xilano	34
Figura 12 - Mecanismo de ação do H_2O_2 na oxidação da parede celular	37
Figura 13- Mecanismo de decomposição da celulose.....	38
Figura 14 - Tempo de contato com solução de H_2O_2 x rendimento lipídico obtido	38
Figura 15 - Rendimento lipídico versus concentração de H_2O_2	39
Figura 16 – Comparação de formas de secagem e rompimento celular	41
Figura 17 – Reação entre o íon permanganato e o peróxido de hidrogênio	42
Figura 18 - Reação entre o oxalato e o permanganato.....	42
Figura 19 - Estrutura de peróxido orgânico.....	43
Figura 20 - Principais peróxidos orgânicos formados	44
Figura 21 - Mecanismo de iniciação	45
Figura 22 - Formação de um iniciador.....	45
Figura 23 - Mecanismo da propagação	46
Figura 24 - Formação de um radical em um sistema alílico.....	47
Figura 25 - Mecanismo de ação do BHT	48
Figura 26 - Estrutura do Alfa-tocoferol (vitamina E)	48
Figura 27 – Reação de adição de iodo a uma cadeia insaturada	50
Figura 28 - Rearranjo de McLafferty para um éster metílico	56
Figura 29 - Análise termogravimétrica da biomassa da microalga <i>Monoraphidium sp.</i>	60

Figura 30 - Análise Termogravimétrica dos principais componentes da PC de microalgas.	62
Figura 31 - Moléculas liberadas na decomposição térmica da biomassa lignocelulósica..	63
Figura 32 - Fazenda Samiza	65
Figura 33 - Liofilizador Thermo Scientific Heto PowerDry modelo PL6000	66
Figura 34 - Ponto de equivalência na permanganometria	67
Figura 35 - Aparato para extração	69
Figura 36 - Rota- evaporador utilizado	69
Figura 37 - Reação ente o biftalato de potássio e hidróxido de sódio	70
Figura 38 - Equipamento de FTIR utilizado	72
Figura 39 - Microscópio óptico utilizado	73
Figura 40 - Balança termogravimétrica utilizada	73
Figura 41 - Transesterificação do MLE	74
Figura 42 - Tratamento da adição de água destilada	75
Figura 43- GC-MS utilizado	76
Figura 44 - Aspecto da biomassa antes e depois da extração	81
Figura 45 - Formação de espuma após adição de H ₂ O ₂ às microalgas	82
Figura 46 - Microscopia da biomassa	83
Figura 47 - Parede celular rompida	83
Figura 48- Curvas TG e DTG da biomassa residual	84
Figura 49 - Sobreposição das curvas TG e DTG	87
Figura 50 - Fluxo de calor da biomassa	89
Figura 51 - Espectro de Infravermelho com transformada de Fourier dos extratos	92
Figura 52 - Aspecto físico do extrato lipídico	93
Figura 53 - Índice de peróxidos obtidos	95
Figura 54 - Índices de iodo calculado	96
Figura 55 – Semelhança do perfil lipídico com <i>Trachydiscus minutus</i>	99
Figura 56 - Aspecto físico do biodiesel obtido	102
Figura 57 - Cromatograma do biodiesel do MLE sem ação oxidante	103
Figura 58 - Cromatograma do MLE com 0,715M de H ₂ O ₂	104

Figura 59 - Espectro de massa obtido para o EM do C16:0.....	104
Figura 60 - Alteração de composição do ML após contato com H ₂ O ₂	106
Figura 61 - Diminuição do número de insaturações no MLE após uso de H ₂ O ₂	107
Figura 62 - Estrutura do fitol	109
Figura 63 - Estrutura do esqualeno	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação da produção óleo de microalga com vegetais	26
Tabela 2 - Produção diária de lipídeos contra tempo de cultivo de diversos gêneros de microalgas.....	29
Tabela 3 - Teor lipídico das principais microalgas.....	30
Tabela 4 - Composição perfil lipídico da <i>Chlamydomonas</i> sp. cultivada em 7 dias sob diferentes concentrações de CO ₂ no meio.....	28
Tabela 5 - Principais oxidantes em sínteses	36
Tabela 6 Consumo de energia e tempo necessário para cada técnica de secagem	40
Tabela 7 valores máximos de IPO em óleos comestíveis permitidos pela ANVISA	44
Tabela 8 Índice de iodo de óleos vegetais refinados	51
Tabela 9 Índice de iodo obtido para os principais ácidos graxos de microalga	52
Tabela 10 Principais grupos funcionais presentes no ML	54
Tabela 11 - Principais Técnicas térmicas e suas propriedades avaliadas.....	57
Tabela 12 - Principais substâncias presentes na análise térmica da microalga analisada	85
Tabela 13 Composição mássica dos eventos termogravimétricos (%)	86
Tabela 14 Temperatura de máximo decaimento mássico (°C)	88
Tabela 15 Fluxo máximo de calor dos eventos termogravimétricos (mW)	90
Tabela 17 Índice de iodo de extratos de microalga encontrados na literatura	97
Tabela 18 Análise de GC-MS do perfil lipídico da <i>Trachydiscus minutus</i>	98
Tabela 19 Índice de acidez obtidos	100
Tabela 20 Comparação dos índices de acidez obtidos com os da literatura	101
Tabela 21 Perfil lipídico do biodiesel obtido	105
Tabela 22 Mudança do perfil lipídico da <i>Chlorella Vulgaris</i> após rompimento oxidativo da PC.....	108
Tabela 23 Compostos identificados no biodiesel.....	109

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AB	Abundância no Biodiesel
AGL	Ácidos Graxos Livres
AGS	Ácido Graxo Saturado
AGMI	Ácido Graxo monoinsaturado
AGPI	Ácidos Graxos Poli-insaturados
ANP	Agencia Nacional do Petróleo, Gás Natural e bicombustíveis
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
B0	Biodiesel do material extraído sem ação oxidante
B1	Biodiesel do material extraído com ação oxidante
Bm1	Biomassa crua
Bm2	Biomassa residual sem ação oxidante
Bm3	Biomassa residual com ação oxidante
CENPES	Centro de Pesquisas e Desenvolvimento
ECO	Extrato obtido com ação oxidante
EE	Extrato envelhecido
EM	Éster Metílico
ESO	Extrato obtido sem ação oxidante
FM	Fórmula Molecular
FTIR	<i>Fourier Transformer Infrared Spectroscopy</i> – Espectroscopia na Região do Infravermelho com transformada de Fourier
GC-MS	<i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i> – Cromatografia Gasosa com Espectrômetro de Massas

IA	Índice de Acidez
IPO	Índice de Peróxidos Orgânicos
ML	Material lipídico
MLE	Material Lipídico Extraído
m/m	Massa por massa
PC	Parede Celular
PO	Peróxidos Orgânicos
SEE	Semelhança entre espectros de massa
TR	Tempo de Retenção
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
v/v	Volume por volume

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Cálculo da Concentração de KMnO_4	61
Equação 2 - Cálculo da Concentração de NaOH	Erro! Indicador não definido.
Equação 3 - Cálculo de índice de acidez.....	65
Equação 4 - Cálculo da área de um triângulo.....	70
Equação 5 - Contribuição de cada pico cromatográfico na composição do analito.....	70

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 Geral	19
2.1 Específicos	19
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
3.1 Necessidade do uso de energia limpa e renovável	20
3.2 Biodiesel	21
3.3 Microalgas e biodiesel	25
3.4 Produção e cultivo de microalgas	27
3.5 Gênero <i>Chlamydomonas sp.</i>	28
3.6 Composição da parede celular das microalgas	31
3.7 Principais técnicas de rompimento da parede celular microalga para extração de lipídios	34
3.7.1 Oxidação da parede celular com uso de H₂O₂	35
3.7.1.1 Tratamentos necessários antes da extração com rompimento da parede celular com H₂O₂	39
3.7.1.1.1 Métodos de secagem da biomassa	39
3.7.1.1.2 Padronização da solução de H₂O₂	41
3.8 Parâmetros de qualidade dos lipídios	43
3.8.1 Índice de peróxidos orgânicos	43
3.8.1.1 Susceptibilidade dos ácidos graxos poli-insaturados à formação de PO	47
3.8.1.2 Antioxidantes	47

3.8.2 Índice de acidez.....	49
3.8.3 Índice de iodo.....	50
3.9.2 Cromatofia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).....	55
3.9.2.1 Pico base do espectro de massas de ésteres alquílicos.....	56
3.9.3 Termogravimetria.....	56
3.9.3.3 Perfil termogravimétrico da biomassa de microalga.....	59
3.9.3.4 Análise termogravimétrica de substâncias presentes na parede celular da microalga.....	61
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
4.1 Cultivo da microalga <i>Chlamydomonas sp</i>.....	65
4.2 Secagem das microalgas.....	66
4.3 Preparação e padronização da solução de H₂O₂.....	66
4.4 Extrações e concentração de material lipídico.....	68
4.5 Análise de índice de peróxidos orgânicos e índice de iodo.....	69
4.6 Análise de índice de acidez.....	70
4.6.1. Padronização da solução de hidróxido de sódio.....	70
4.6.2 Análise do índice de acidez.....	71
4.7 Análise de FTIR do material lipídico.....	72
4.8 Microscopia óptica da biomassa.....	72
4.9 Análise de termogravimétrica da biomassa residual.....	73
4.10 Transesterificação do material lipídico e tratamento do biodiesel.....	74
4.11 Análise do biodiesel via GC-MS.....	75
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
5.1 Rendimentos das extrações.....	78

5.2 Rompimento e degradação da parede celular	81
5.2.1 Microscopia óptica da biomassa crua e residual.....	82
5.2.2 Termogravimetria da biomassa crua e residual	83
5.3 Espectros de FTIR	90
5.4 Aspecto físico do material lipídico	93
5.5 Índices de peróxidos orgânicos	94
5.6 Índice de iodo	95
5.7 Índices de acidez	99
5.8 Aspecto físico do biodiesel gerado	102
5.9 Perfil lipídico do biodiesel via CG-MS e índices conversão	103
5.10 Outras moléculas presentes na composição do biodiesel	108
6 CONCLUSÕES	111
7 SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS ESTUDOS	113
REFERÊNCIAS	114

1 INTRODUÇÃO

A atual dependência dos combustíveis fósseis e os danos ambientais de sua exploração, produção e queima, causam ao equilíbrio do ciclo de carbono motiva a busca por fontes energéticas alternativas, dentre estas, os biocombustíveis. Assim, microalgas surgem como fonte energética promissora, pois captam gás carbônico da atmosfera, exigindo pequenas áreas para cultivo com mínimo impacto ambiental e a não competem com cultura de plantas destinadas à indústria alimentícia (CHISTI, 2008).

Devido às propriedades fotossintéticas, as microalgas são capazes de converter energia solar em química armazenando-a principalmente na forma de carboidratos e, posteriormente, em lipídios que podem ser transformados em biodiesel através de uma reação de transesterificação.

As potencialidades energéticas da microalga se dão em várias linhas de investigação, a extração do conteúdo intracelular lipídico para produção de biodiesel via reação de transesterificação/esterificação, fermentação de carboidratos presentes na parede celular na produção de bioálcool (SOUZA *et al.*, 2012), produção de biogás via digestão anaeróbica de biomassa (MOLINUEVO-SALCES *et al.*, 2015), e ainda utilização resíduos de biomassa para suplementar a alimentação animal ou fertilizar solos.

Na produção de biodiesel de microalga é necessária inicialmente a extração do material lipídico e para que isto ocorra com maior eficiência a parede celular (PC) deve-se ser rompida, contudo a composição química do material que forma a PC garante grande resistência e alta impenetrabilidade que dificultam a extração de lipídios, assim a literatura descreve inúmeros métodos físicos que auxiliam a ruptura celular, como o uso de ultrassom e radiação de micro-ondas, contudo requerem grande uso de energia, que tornam oneroso o processo extrativo (PRABAKARAN; RAVINDRAN, 2011).

Dentre os métodos químicos para rompimento da PC, a oxidação com uso de peróxido de hidrogênio apresenta custo minimizado e apresenta bons resultados já que se

mostrou capaz de elevar o rendimento lipídico em cerca de 60% para *Chlorella* sp. (STERITI et al., 2014). Trata-se de um método limpo, já que não promove a formação de resíduos tóxicos ou cancerígenos. Contudo, a principal desvantagem está relacionada à possível perda de qualidade do material lipídico que, inevitavelmente, entrará em contato com o agente oxidante, especialmente no caso dos ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), de ocorrência natural, pois esses são mais susceptíveis à oxidação que os ácidos graxos de cadeias saturadas. Resultando, como consequência, na formação de peróxidos orgânicos que se decompõem rapidamente levando a produtos secundários como aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos e polímeros indesejáveis, prejudicando a qualidade do extrato (PULLEN; SAEED, 2012).

Dentre os gêneros promissores à produção de biodiesel está a *Chlamydomonas* que vem se destacando por sua alta resistência às variações nas condições de cultivo, como salinidade e contaminação bacteriana (AN et al., 2013) e ainda em comparação a outras microalgas a *Chlamydomonas* apresenta altos índices de reprodução celular com alta taxa de produção de lipídeos transesterificáveis (NAKANISHI et al., 2014).

Neste sentido o grande objetivo deste trabalho foi realizar um estudo comparativo sobre o efeito da variação da concentração de peróxido de hidrogênio sobre a oxidação da PC da *Chlamydomonas*, além de caracterização de parâmetros de qualidade da fração lipídica obtida focando em sua conversão em biodiesel.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar a eficiência do uso de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no rompimento oxidativo da parede celular (PC) da microalga do gênero *Chlamydomonas sp.* utilizando como método de rompimento celular para facilitar a extração lipídeos apolares visando a produção de biodiesel.

2.1 Específicos

- Avaliar o efeito da variação de concentração de peróxido de hidrogênio na oxidação da PC sua influência nos rendimentos mássicos da extração do material lipídico (ML);
- Quantificar na fração lipídica os índices de peróxidos orgânicos (IPO), índice de acidez (IA) e índice de iodo do ML após os ensaios extrativos;
- Analisar possíveis mudanças do perfil espectroscópico de FTIR do ML extraído com rompimento da PC por ação oxidante do peróxido de hidrogênio;
- Submeter o ML extraído com e sem rompimento oxidativo da parede celular à reação de transesterificação e consecutiva obtenção de biodiesel;
- Comprovar eficiência do rompimento da PC via microscopia óptica e termogravimetria da biomassa residual;
- Avaliar possíveis mudanças do perfil lipídico do biodiesel sintetizado a partir do material lipídico extraído (MLE) com e sem rompimento oxidativo da parede celular.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Necessidade do uso de energia limpa e renovável

A energia é vital para a sociedade industrializada atual. Em todo mundo, o petróleo é um dos principais componentes da matriz energética utilizada, movimentando bilhões de dólares por mês na economia global, garantindo energia e o emprego direto e indireto de muitos trabalhadores da área. Contudo, o petróleo é potencialmente finito. Atualmente, estima-se que são consumidos 2 litros de petróleo a cada litro descoberto, o que deve garantir suficiência para apenas mais 125 anos (RESERVES *et al.*, 2016). Por este motivo, muitos pesquisadores sugerem formas mais nobres de uso do petróleo em vez de simplesmente queimá-lo para fins energéticos tal como matéria-prima para fins sintéticos, uma vez que esse é formado por uma complexa mistura de hidrocarbonetos de cadeias diversas.

Outra grande problemática sobre o uso do petróleo é o desequilíbrio do ciclo do carbono, pois na queima de seus derivados injeta-se gás carbônico (CO₂) extra na atmosfera. Cerca de 75% das emissões de CO₂ vem da queima de combustíveis fósseis e cerca de 40% destas emissões são para fins de produção de energia elétrica (CONINCK, DE *et al.*, 2009). O aumento do CO₂ atmosférico é danoso ao clima, pois promove a intensificação do efeito estufa juntamente com outros gases presente na atmosfera, como vapor de água e metano. O efeito estufa naturalmente garante a manutenção do calor na Terra, sem ele o planeta teria uma média de temperatura próxima dos -15°C em vez dos atuais 20°C, porém tem se registrado um aumento da temperatura global em torno de 0,85°C desde o início da revolução industrial e efeitos negativos já foram percebidos, como secas prolongadas, chuvas demasiadas, morte de espécies, como os corais marinhos e o derretimento de calotas polares que causaram um aumento de 90 a 30m a superfície dos oceanos (DONOHOE *et al.*, 2014).

Uma alternativa para assegurar o desenvolvimento da sociedade sem agredir o planeta é o uso de energia limpa e renovável. Neste cenário, o Brasil se destaca, pois é um dos líderes mundiais no setor energético de matrizes limpas e renováveis, com grande destaque à grande produção e consumo do bioetanol (SOUZA *et al.*, 2012) e a atual inclusão obrigatória de 7% do biodiesel ao diesel de petróleo, além da energia elétrica de origem renovável, destacando a produção hidroelétrica, que corresponde a cerca de 90% toda produção no país. Contudo o Brasil tem muito potencial a ser explorado, principalmente no setor eólico, solar e de biomassa (GUERRA *et al.*, 2015).

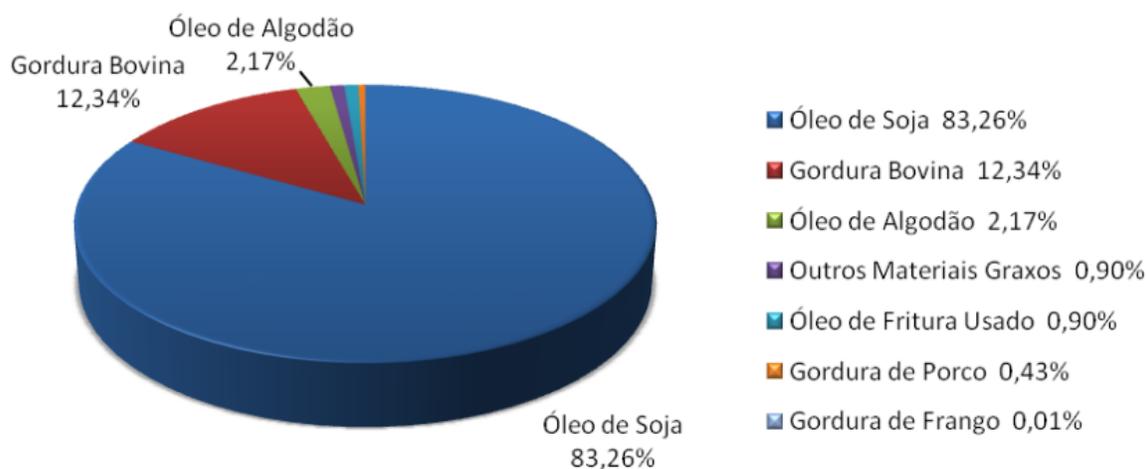
3.2 Biodiesel

O biodiesel vem sendo estudado desde o início do século XIX sendo principal processo de obtenção, a transesterificação (JUNIOR; MARTINS, 2014). Atualmente, 95% do biodiesel utilizado no mundo é produzido a partir de fontes de primeira geração, que são óleos comestíveis como algodão, amendoim, milho, soja e girassol, que embora sejam fontes renováveis, preocupam a comunidade científica pela concorrência gerada com o mercado alimentício e consecutivo aumento no custo de produção do biodiesel e de alimentos derivados de tais fontes (DEMIRBAS, 2011). Da segunda geração, destaca-se o uso do óleo de mamona, pinhão manso (*Jatropha curcas*), óleo residual doméstico e industrial, além de gordura de origem animal. A grande problemática destas fontes está na baixa qualidade, o que deixa *gap* para o uso da terceira geração de matérias-primas, que inclui as microalgas, prometendo estabelecer ao longo dos anos um alto fator custo-benefício (AHMAD *et al.*, 2011).

O Brasil, segundo Junior, *et al*, 2011, é um dos poucos países a utilizar mais que 5% da matéria prima de segunda geração na produção de biodiesel, se destacam o uso de gordura bovina e o óleo de fritura residual , porém mais 80% do biodiesel ainda é produzido a partir de óleo de soja, isto é, biodiesel de primeira geração (Figura 1).

A Lei brasileira de Número 11.097 de 13 de janeiro de 2005, conhecida como a “lei do biodiesel” o define como “biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil”.

Figura 1 - Matérias-primas na produção de biodiesel no Brasil em 2011

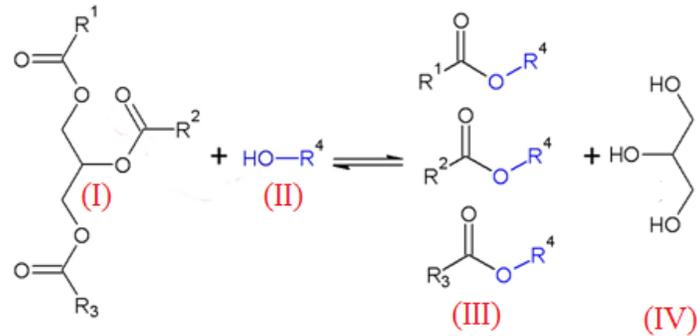


Fonte: JUNIOR, 2011

A resolução de Número 14 de 11 de novembro de 2012 da ANP, em seu artigo segundo e inciso primeiro define o biodiesel como “combustível composto de alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, produzido a partir da transesterificação e ou/ esterificação de matérias graxas, de gorduras de origem vegetal ou animal, e que atenda a especificação contida no Regulamento Técnico nº 4/2012, parte integrante desta Resolução”.

A reação de transesterificação, principal rota para obtenção do biodiesel, consiste na conversão de triésteres, também conhecidos como triglicerídeos (Figura 2-I) em ésteres de cadeias curtas (Figura 2-III) por meio da reação com um álcool de cadeia pequena (Figura 2-II) como metanol e etanol, liberando como subproduto o glicerol (Figura 2-IV) como ilustra a reação na Figura 2.

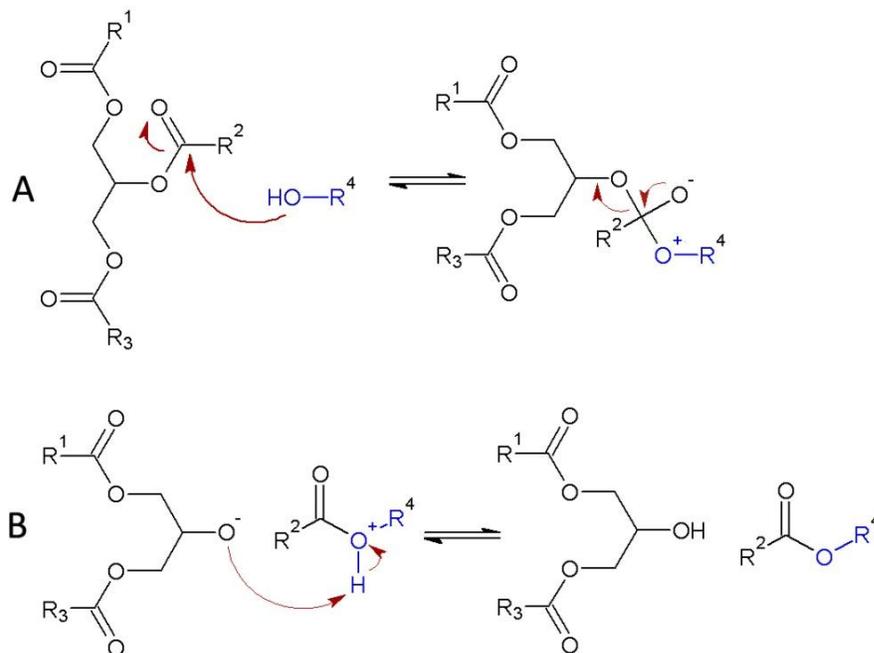
Figura 2 - Reação global de transesterificação



Fonte: FELIZARDO, 2011 (ADAPTADO)

O mecanismo da reação se baseia na suscetibilidade do ataque nucleofílico da hidroxila alcoólica ao carbono carbonílico do triglicerídeo (MENEGHETTI *et al.*, 2013), substituindo a cadeia de glicerol por grupo alquila, como ilustra o mecanismo reacional da Figura 3. O triglicerídeo, na etapa A, sofre um ataque do álcool de cadeia genérica R⁴ em azul, formando um intermediário tetraédrico, que rapidamente elimina a cadeia do glicerol (etapa B) formando um éster alquílico.

Figura 3 - Mecanismo da reação de transesterificação



Fonte: MENEGHETTI, 2013 (ADAPTADO)

O perfil do triglicéride depende da composição das cadeias R^1 , R^2 e R^3 presentes na estrutura, o que varia bastante com a matéria-prima utilizada, desta maneira o biodiesel formado será uma mistura de ésteres e o seu perfil dependerá das propriedades físicas e químicas destas cadeias carbônicas. A reação sob condições brandas ocorre de forma lenta e, portanto, deve ser catalisada por ácidos, bases, enzimas ou compostos inorgânicos insolúveis (catálise heterogênea).

Outra reação para obtenção do biodiesel é a reação de esterificação de ácidos graxos de cadeia R^1 (a) com alcoóis de cadeia curta R^2 (b), formando os ésteres (c) e água (d), como ilustra a Figura 4. Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos de 4 a 28 carbonos que, em geral, se apresentam em números pares de carbono. Tais ácidos são encontrados naturalmente no material lipídico na forma de ácidos graxos livres (AGL) e são obtidos pela reação de hidrólise de triglicérides (Figura 5), o que é uma reação indesejável na matéria-prima destinada à produção de biodiesel, pois elevam a acidez e promovem reações secundárias com catalisadores básicos, interferindo diretamente na eficácia sintética, além de formar emulsões que dificulta a separação e purificação do biodiesel obtido. Outro ponto negativo à reação de esterificação para obtenção de biodiesel são as condições operacionais que são mais onerosas como pressões elevadas e altas temperaturas (SUAREZ *et al.*, 2007).

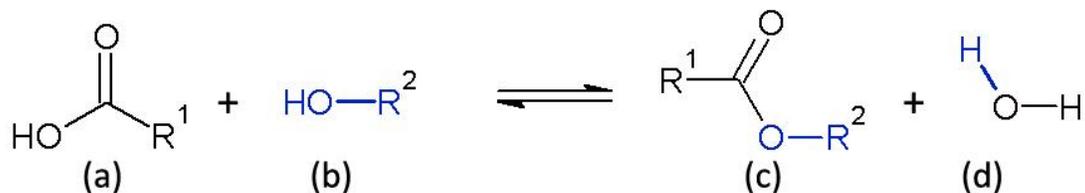
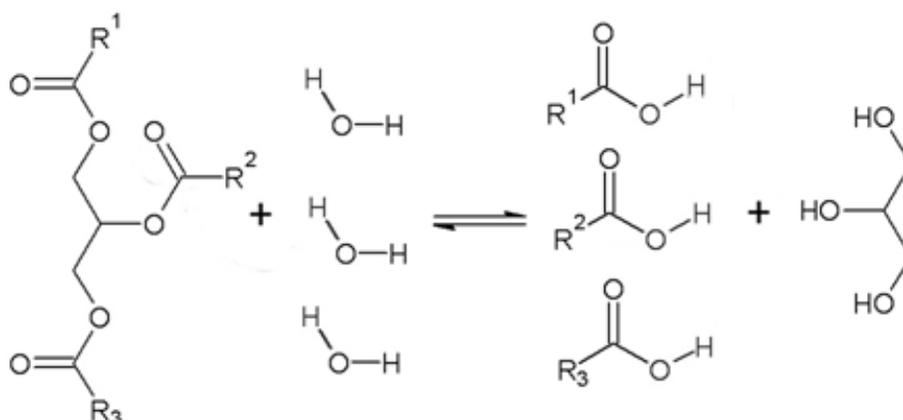


Figura 4 - Reação de esterificação

Fonte: MENEGHETTI, 2013 (ADAPTADO)

Figura 5 -Hidrólise de triglicerídeo



Fonte: MENEGHETTI, 2013 (ADAPTADO)

3.3 Microalgas e biodiesel

As microalgas são seres microscópicos unicelulares e fotossintéticos presentes em quase todos os tipos corpos aquáticos do planeta, capazes de se adaptar às mais diversas condições, como variação brusca de temperatura e luz solar, elas se destacam também pela grande capacidade de biofixar o carbono atmosférico contribuindo positivamente para o ciclo do carbono e redução do efeito estufa, além da biofixação de nitrogênio em bioprodutos de alto valor comercial que podem ser utilizados com fertilizantes de solos (CHISTI, 2008).

As microalgas vêm se destacando nas pesquisas acadêmicas pelo seu alto potencial como matriz energética limpa e renovável para na produção de bicombustíveis (AHMAD *et al.*, 2011), tais como, o biodiesel, sintetizado a partir dos lipídeos microalgais; bioálcool, obtido pela fermentação de carboidratos e o biogás, obtido pela sua digestão anaeróbia dos resíduos de biomassa (KIM *et al.*, 2013). A ideia de usar as microalgas para fins energéticos não é nova, mas tem tomado força principalmente pelas incertezas da indústria do petróleo, além do apelo ambiental para a necessidade do uso de energia limpa e renovável (CHISTI, 2008). Dentre os principais combustíveis derivados das

microalgas, o biodiesel é um dos mais estudados, cuja atual produção o para fins comerciais 'e oriunda quase exclusivamente de fontes animais e vegetais.

O biodiesel de microalga se apresenta como um combustível extremamente promissor, pois em comparação às oleaginosas são capazes de fixar gás carbônico 10 a 50 vezes mais rápido e consecutivamente terem uma produção anual de óleo em média 100 vezes maior (CHISTI, 2008), isto se deve às pequenas áreas necessárias ao cultivo (cerca de 300 vezes menor) aliado aos curtos ciclos de produção, em geral de 4 a 20 dias, isto é, 18 a 90 ciclos de cultivo por ano em contraposição a 1 a 4 ciclos anuais de oleaginosas. A Tabela 1 faz uma comparação entre diversas matrizes de óleo com duas microalgas genéricas "a" e "b" (que representam respectivamente microalgas que possuem 70 e 30% de lipídeos) e percebe-se que além de exigir uma área infinitamente menor que as plantas oleaginosas, as microalgas são capazes de produzir maior quantidade de óleo. Comparando a microalga "b" com a soja, calcula-se que a microalga consegue produzir 130 vezes mais óleo, exigindo uma área 132 vezes menor.

Tabela 1 Comparação da produção óleo de microalga com vegetais

Cultivo	Produção de óleo (l/ha)	Área de cultivo necessária (MHa)
Milho	172	1.540
Soja	446	594
Canola	1.190	223
Jatrofa	1.892	140
Coco	2.689	99
Palma	5.950	45
Microalga ^a	136.900	2
Microalga ^b	58.700	4,5

Microalga "a" com 70% (m/m) de lipídeos

Microalga "b" com 30% (m/m) de lipídeos

Fonte (ADAPTADO), CHISTI, 2008

3.4 Produção e cultivo de microalgas

Existem basicamente dois principais métodos de cultivo, o *indoor* e *outdoor*. No *outdoor*, que significa literalmente “ambiente aberto” as microalgas se desenvolvem lagoas fotossintéticas, em destaque ao tipo *raceway Pond* (Figura 6-a), já no *indoor*, “ambiente fechado”, o cultivo ocorre principalmente em fotobiorreatores tubulares (Figura 6-b). Existem muitas diferenças entre tais métodos e dependendo da finalidade do cultivo uma técnica pode prevalecer sobre a outra, o *outdoor* se destaca pelo baixo custo operacional, sendo ideal para produção em grande escala, já o *indoor*, todas variáveis operacionais são minuciosamente controladas, desde temperatura, luminosidade, pH, suplementação de gás carbônico, nitrato e outros nutrientes, assim apresenta menor risco de contaminação por bactérias e outras espécies de microalgas invasoras, sendo em geral destinada para fins farmacêuticos, alimentícios e pesquisa (RAWAT *et al.*, 2013).

Figura 6 - Cultivo outdoor (a) e Indoor (b)



Fonte: RAWAT, et al., 2013

3.5 Gênero *Chlamydomonas sp.*

Chlamydomonas sp. é um gênero microalgas que possuem flagelos em suas células, cuja principal função é assegurar pequena mobilidade em ambientes aquáticos, característica evolutiva ausente em outros gêneros (REMACLE *et al.*, 2014). As microalgas deste gênero são mais resistentes aos ataques bacterianos e a mudanças bruscas do meio aquático, sendo capazes de sobreviver em meio de alta salinidade, quatro vezes maior que a do mar, além de se reproduzir em locais inóspitos como o pólo antártico onde as temperaturas variam de 0 a -47 °C, além de pouca luminosidade e nutrientes (AN *et al.*, 2013). Além da alta adaptabilidade ao meio de cultivo, outro fator relevante no estudo do gênero *Chlamydomonas* para produção de biodiesel é o seu alto crescimento celular onde em menos de sete dias de cultivo, se obtém uma colheita, além disto, é destacável a sua alta produtividade diária de lipídeos, alcançando uma taxa de até 169,1mg de lipídeos/litro/dia (NAKANISHI *et al.*, 2014).

Tabela 2 - Produção diária de lipídeos contra tempo de cultivo de diversos gêneros de microalgas

Microalga	Produção de lipídeos (mg/Litro/dia)	Tempo de cultivo (dias)
<i>Chlamydomonas sp.</i>	169.1	7
<i>Chlorella sp.</i>	143	8
<i>Chlorella sorokiniana</i>	86	8-10
<i>Nannochloropsis sp.</i>	37.6–61.0	14
<i>Pavlova spp.</i>	49.4–50.2	14
<i>Ellipsoidion sp.</i>	47.3	14
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	44.8	14
<i>Isochrysis sp.</i>	37.7–37.8	14
<i>Tetraselmis sp.</i>	27.0–43.4	14

Fonte: NAKANISHI (adaptado), 2013

Quando a taxa de produção de lipídeos e tempo de cultivo, são comparados com a de outras microalgas, conforme Tabela 2, percebe-se que o gênero estudado é capaz de produzir maior quantidade de lipídeos por dia e em tempo reduzido. Isto se deve principalmente ao alto teor lipídico do gênero, possuindo valores entre 29 a 72% (m/m), como aponta a Tabela 3, ficando abaixo, dentre as microalgas comparadas (Tabela 3), apenas da espécie *Botryococcus braunii* e o gênero *Schizochytrium sp.* Assim, em reação ao teor lipídico, o gênero se apresenta como boa matriz para síntese do biodiesel (ICE-L et al., 2013).

Tabela 3 Teor lipídico das principais microalgas

Microalga	Teor de lipídeos % (m/m)
<i>Botryococcus braunii</i>	25–75
<i>Chlamydomonas sp.</i>	29-72
<i>Chlorella sp.</i>	28–32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16–37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25–33
<i>Monallanthus salina</i>	20
<i>Nannochloris sp.</i>	20–35
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31–68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35–54
<i>Nitzschia sp.</i>	45–47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20–30
<i>Schizochytrium sp.</i>	50–77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15–23

Fonte: CHISTI (adaptado), 2008

O perfil lipídico do gênero *Chlamydomonas sp.* apresenta altos índices de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), tal como o ácido alfa-linolênico (C18:3) e o eicosapentaenóico (C20:5) e ácidos graxos saturados como o hexadecanóico (C16:0) e o araquidônico (C20:0) (NAKANISHI et al., 2014). Embora como semelhante ao que ocorre em outras microalgas, o perfil lipídico da *Chlamydomonas sp.* é extremamente sensível às variações operacionais de cultivo, como temperatura, luz solar, salinidade, suplementação de gás carbônico, pH e principalmente nutrientes como nitrato. É possível observar na Tabela 4 a mudança da composição lipídica com a variação de concentrações de cloreto de sódio (NaCl) e gás carbônico (CO₂) em cultivo fechado.

Tabela 4 - Composição perfil lipídico da *Chlamydomonas sp.* cultivada em 7 dias sob diferentes concentrações de CO₂ no meio

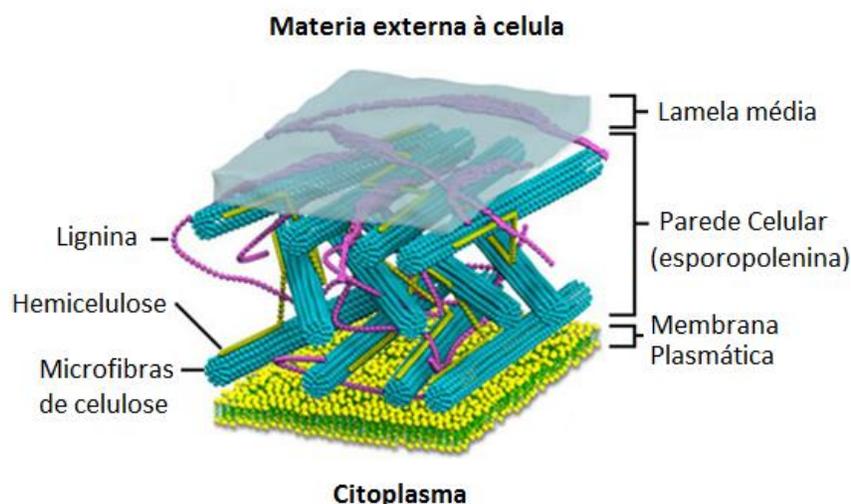
Perfil lipídico	Concentração de CO ₂ em (%)			
C16:0	66,3	45,6	48,9	46,7
C16:1	0,0	1,2	0,0	0,0
C18:0	33,7	12,5	16,4	21,8
C18:1	0,0	18,5	16,1	13,2
C18:2	0,0	11,7	10,8	8,7
C18:3	0,0	10,4	7,3	9,4
Total lipídeos saturados (%)	100	58,1	65,3	68,5
Total de lipídeos monoinsaturados (%)	0,0	19,7	16,1	13,2
Total de lipídeos poli-insaturados (%)	0,0	22,1	18,1	18,0

Fonte: NAKANISHI (adaptado), 2013

3.6 Composição da parede celular das microalgas

As microalgas, em geral, assim como as células vegetais, são revestidas três camadas, a lamela média, a parede celular e a membrana plasmática, todas ilustradas na Figura 7.

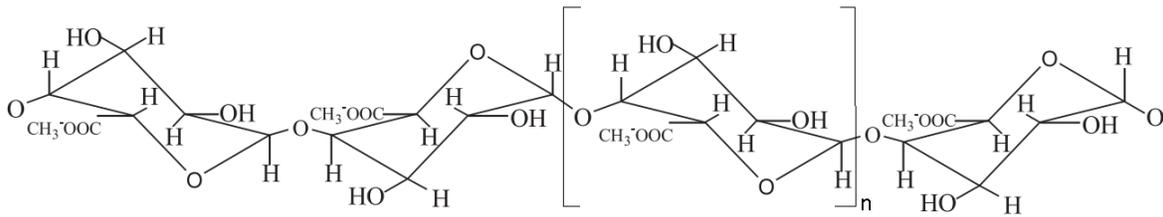
Figura 7 - Estrutura da parede celular de microalgas e vegetais



Fonte: <http://ies25abril.edu.gva.es> (ADAPTADO), 2017

A primeira destas camadas é a lamela média, que é uma fina camada extracelular constituída principalmente por pectina (KASHYAP *et al.*, 2000) cuja principal função é tornar o meio mais gelatinoso, promovendo interações entre a célula e água e interações entre as próprias células (UENOJO; PASTORE, 2007). A Pectina trata-se de um polissacarídeo do metil-éster do ácido galacturônico ligados entre si através de ligações glicosídicas alfa-1,4 ilustrado na Figura 8.

Figura 8 - Estrutura da Pectina

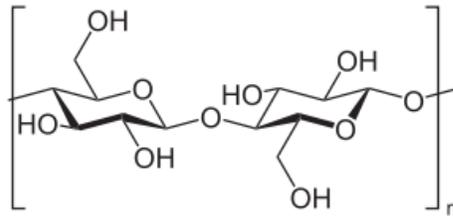


Fonte: PASTORE (ADAPTADO), 2007

A segunda camada após a lamela média é parede celular (PC) seguida da membrana plasmática. As microalgas, em geral, possuem uma parede celular forte e resistente, cuja principal função é proteger o material citoplasmático de extravasamentos celulares, além atuar como escudo para ataques químicos, físicos e biológicos. A PC é composta de um mistura de materiais chamada de esporopolenina (PASSOS *et al.*, 2016). A composição química da esporopolenina é divergente entre cada gênero e espécie de microalga, mas em geral é formada por uma biomassa lignocelulósica (GAI *et al.*, 2015), isto é, uma mistura de celulose, hemicelulose e lignina (LÓPEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2014), além de outras moléculas importantes que também são participam em menor quantidade da composição, como as glicoproteínas que atuam como transportadoras de substâncias necessárias ao funcionamento da célula (PESCHKE *et al.*, 2013).

A celulose é a molécula orgânica mais abundante do planeta terra que se apresenta na forma de microfibras que revestem a parede celular que está naturalmente presente nas algas, vegetais, fungos e bactérias (OSULLIVAN, 1997). Trata-se de um polissacarídeo formado pela polimerização da molécula de beta-glicose, apresentando forma molecular $(C_6H_{10}O_5)_n$ e sua estrutura está ilustrada na Figura 9. Paredes celulares de origens distintas podem apresentar formas distintas de celulose, refletindo a complexidade dos seres vivos e a vasto polimorfismo da celulose, apresentando estruturas amorfas ou cristalinas que podem ou não serem interconvertidas entre si pela biossíntese deste polímero (OSULLIVAN, 1997).

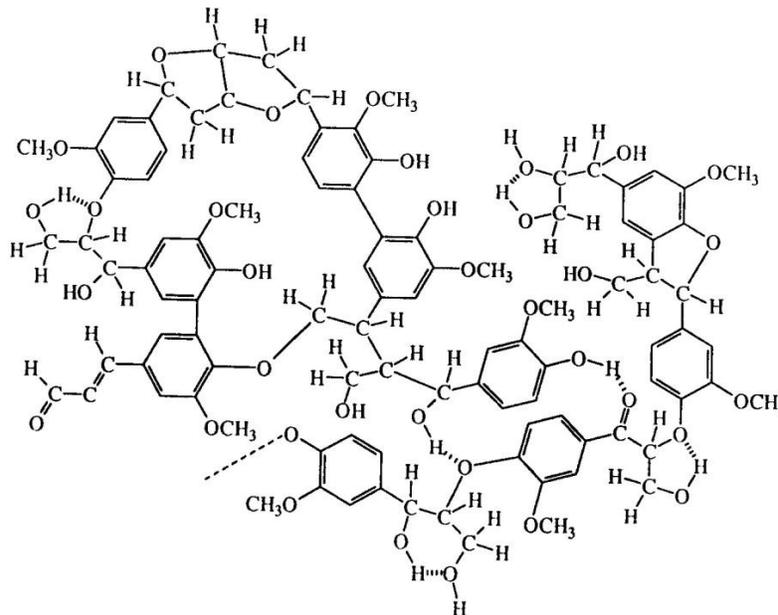
Figura 7 - Estrutura da celulose



Fonte: OSULLIVAN (ADAPTADO), 1997

A lignina (ilustrada na Figura 10) é uma macromolécula derivada de unidade fenilpropanóides (unidades C9) que são repetidas de forma irregular e oriundas da polimerização desidrogenativa do álcool coniferílico (OLIVEIRA *et al.*, 2001). A lignina é a segunda molécula orgânica em maior quantidade no planeta, perdendo apenas para a celulose, já que ambas são moléculas abundantes na composição de células vegetais e de microalgas possuindo um papel importante na parede celular, lhe conferindo rigidez e proteção aos ataques microbianos (PASSOS *et al.*, 2016).

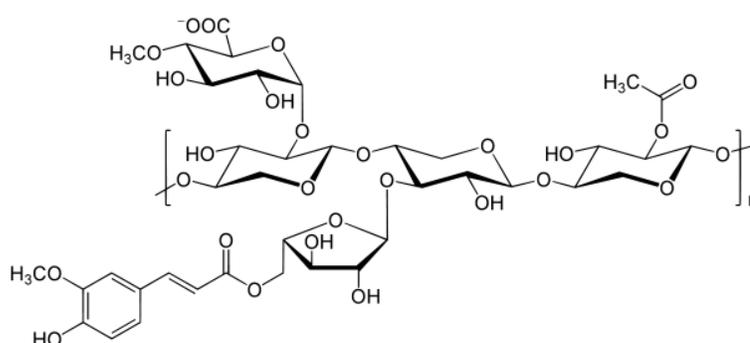
Figura 8 - Estrutura da lignina



Fonte: OLIVEIRA (ADAPTADO), 2001

A Hemicelulose (ou meia celulose) é um polissacarídeo heterogêneo e amorfo formado pela polimerização de hexoses como a glicose, manose e galactose com hidroxilas substituídas por moléculas derivadas de ácidos de açúcar, além de aldopentoses como a xilose e arabinose. (SAHA, 2003). O Xilano (estrutura ilustrada na Figura 11) é a hemicelulose mais abundante na parede celular e assim como a celulose, sofre polimorfismo, apresentando composição distinta com as variações biológicas (SAHA, 2003).

Figura 9 - Estrutura do xilano



Fonte: SAHA (ADAPTADO), 2003

3.7 Principais técnicas de rompimento da parede celular microalga para extração de lipídios

A parede celular representa uma barreira para a extração, pois é necessário o seu rompimento parcial ou total e é este o objetivo que em geral os métodos extrativos possuem, contudo são poucos os métodos de baixo custo e que promovem alta eficiência extrativa (KIRROLIA et al., 2013). Os métodos de rompimento celular se dividem em métodos biológicos, químicos e físicos. A grande diferença entre eles está no de agente utilizado para a agressão à parede celular. Nos métodos biológicos são utilizados seres que atuam na degradação natural da PC, como tipos de bactérias, fungos e micro-

organismos em geral, como no caso do fungo *Saccobolus saccoboloides* e sua atividade enzimática na degradação de carboidratos, como a hemicelulose (DIORIO et al., 2003).

Já nos métodos químicos são utilizados agentes que reagem com a parede celular promovendo sua degradação total ou parcial, são exemplos, o uso de bases, ácidos, agentes oxidantes e enzimas, tais como as pectinases, celulasas e hemicelulasas, estas já bastante utilizadas na indústria têxtil, indústria de papel, alimentos e bebidas (UENOJO; PASTORE, 2007). Em relação aos métodos físicos são aplicados perturbações mecânicas na PC, como o uso de radiação microonda, ultravioleta, choque térmico, pressurização, aplicação de tensão de cisalhamento ou sonicação e, mais recentemente, choque osmótico, eletropermeabilização e tratamento com lasers tem sido estudados (KIM et al., 2013). Dentre tais métodos físicos a radiação de micro-ondas é o mais eficiente, conseguindo aumentar o rendimento extrativo em 225% comparado à sonicação (LEE et al., 2010a) além de requerer 18% menos de energia (GULDHE et al., 2014a).

3.7.1 Oxidação da parede celular com uso de H₂O₂

O uso em baixa concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) nas extrações é um método químico baseado no alto poder do H₂O₂ em oxidar materiais orgânicos, em especial no rompimento da parede celular de microalgas, que com auxílio de um solvente orgânico é possível aumentar os rendimentos lipídicos em mais de 60% (STERITI et al., 2014). A grande vantagem do uso de peróxido de hidrogênio em baixas concentrações é sua adequação aos princípios da química verde (GOTI et al., 2008), e isto fica evidente quanto se compara o H₂O₂ com outros agentes oxidantes em relação à quantidade de oxigênio ativo e os resíduos gerados na Tabela 5. Dentre os agentes oxidantes comparados, o H₂O₂ possui a segunda maior taxa de oxigênio ativo (oxigênio presente na molecular que é capaz de oxidar outras substâncias), ficando atrás apenas do gás oxigênio (O₂), porém são extremamente raras reações em que ambos átomos de oxigênio são incorporados aos produtos de oxidação (SCHARBERT et al., 1995).

Quando se compara a produção de resíduos dos agentes oxidantes, apenas o peróxido de hidrogênio, ozônio e o gás oxigênio são capazes de gerar resíduos verdes, ou seja, totalmente inertes ao meio ambiente, ao contrário do outros agentes oxidantes que promovem a formação de resíduos contendo metais pesados, tóxicos, cancerígenos, bioacumulativos e de difícil ou caro tratamento, além de resíduos ao serem descartados sem tratamento alteram a salinidade e/ou pH do meio, ou que promovam o efeito estufa e/ou chuva ácida.

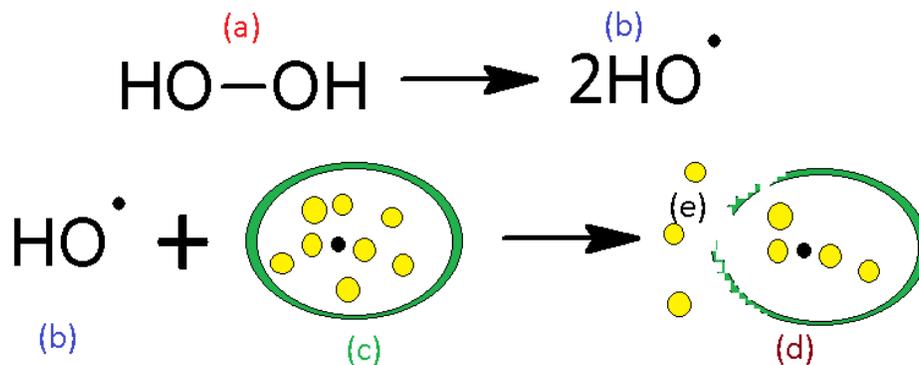
Tabela 2 - Principais oxidantes em sínteses

Agente oxidante	Percentagem de oxigênio ativo (m/m, %)	Resíduo
O₂	100	Nada ou H ₂ O ₂
H₂O₂	47	H ₂ O
N₂O	36.4	N ₂
O₃	33.3	O ₂
KMnO₄	30.4	Sais de Mn(II)
HNO₃	25.0	NO _x
CrO₃	24.0	Sais de Cr(III)
NaOCl	21.6	NaCl
CH₃COOH	21.1	CH ₃ COOH
tBuOOH	17.8	tBuOH
KHSO₅	10.5	KHSO ₄
mClC₆H₄COOH	9.3	<i>m</i> ClC ₆ H ₄ COOH
Me₃SiOOSiMe₃	9.0	Me ₃ SiOOSiMe ₃
NaIO₄	7.5	NaIO ₃
PHIO	7.3	PhI

Fonte: GOTI (ADAPTADO), 2008

A ação do peróxido de hidrogênio é bastante simples, inicialmente o H₂O₂ (a) se decompõe em radicais hidroxila (b) que passam reagir oxidando a parede celular (c) rompendo-a (d) deixando os lipídios disponíveis para interação com o solvente orgânico, como ilustra a Figura 12.

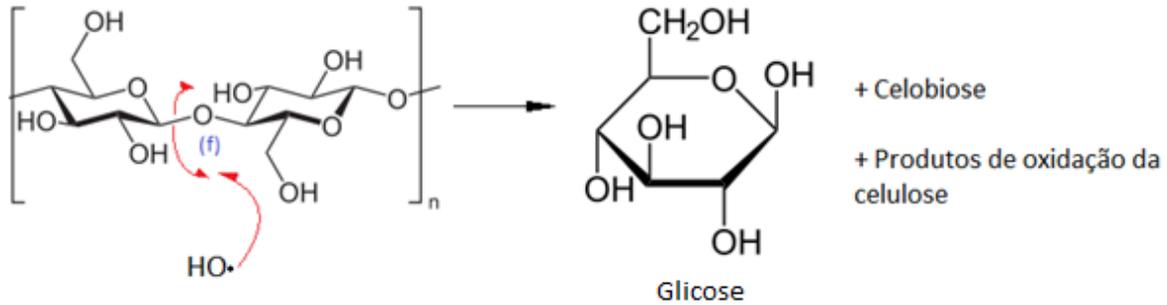
Figura 10 - mecanismo de ação do peróxido de hidrogênio na oxidação da parede celular



Fonte: AUTOR, 2016

A literatura não detalha o mecanismo reacional entre o peróxido de hidrogênio e os componentes da parede celular. A literatura descreve a degradação da Celulose via clivagem da ligação glicosídica β(1-4) ilustrada na Figura 13 (f), isto é, a quebra da ligação que une as moléculas de glicose (monômero), que são desprendidas do polímero (HONG; SUN, 2013) e que a oxidação promove ainda a formação de subprodutos da glicose, como a celobiose (HONG; SUN, 2013) além de produtos de oxidação da parede celular. Esse modelo pode ser usado, de forma análoga, para descrever a degradação da PC das microalgas se for considerado que as mesmas são constituídas essencialmente por microfibras de beta-celulose (principal componente da parede celular).

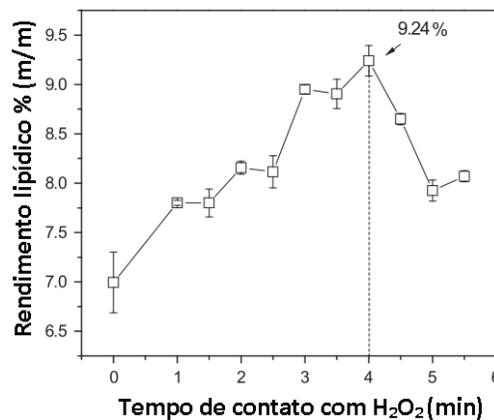
Figura 11- Mecanismo de decomposição da celulose



Fonte: AUTOR, 2016

O tempo de contato entre as microalgas e a solução de peróxido é um parâmetro muito importante, já que deve ser suficiente para oxidar e romper a parede celular sem comprometer os materiais citoplasmáticos de interesse, como os lipídios. Neste caminho, sob mesmas condições operacionais, Steriti reporta um tempo ideal de 4 minutos para obtenção do rendimento mássico maior em extrações de lipídios apolares da microalga *Chlorella vulgaris* como ilustra a Figura 14.

Figura 12 - Tempo de contato com solução de H₂O₂ x rendimento lipídico obtido

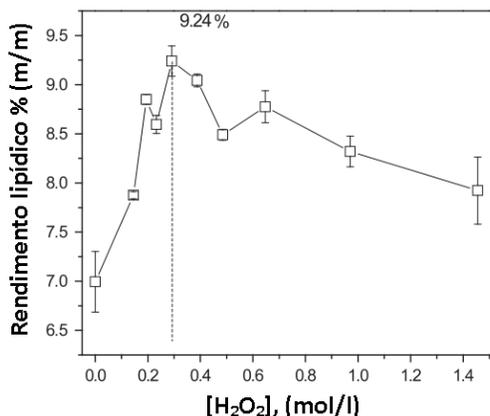


Fonte: STERITI (adaptado), 2014

Outro parâmetro importante é a concentração do agente oxidante, pois em valores elevados o rendimento lipídico tende a decair linearmente com o aumento da concentração (STERITI et al., 2014), conforme ilustra a Figura 15 que descreve a variação

de rendimento lipídico em função da concentração de H_2O_2 , 0,1 a 0,7 mol/L de H_2O_2 . Melhores resultados foram obtidos na faixa de concentração de 0,2 a 0,4 mol/L.

Figura 13 - Rendimento lipídico versus concentração de H_2O_2



Fonte: STERITI (adaptado), 2014

3.7.1.1 Tratamentos necessários antes da extração com rompimento da parede celular com H_2O_2

3.7.1.1.1 Métodos de secagem da biomassa

A retirada da água da biomassa é fundamental ao processo de extração lipídica, pois a água (composto de caráter fortemente polar) interage com as células de microalgas, solvatando a parede celular que é formada por polissacarídeos, criando uma interação bastante estável entre a parede celular e a água que impede a passagem dos solventes orgânicos (em geral pouco solúveis em meio aquoso) para a célula, assim dificultando a extração de lipídeos (MATA *et al.*, 2010).

Existem vários métodos para a secagem da biomassa como pré-tratamento para a extração lipídica, o método de mais baixo custo é a secagem ao sol, onde as microalgas são dispostas em grandes áreas abertas. Este método, contudo, apresenta como desvantagem a elevada exposição das microalgas a um ambiente externo sujeito às

mudanças climáticas como precipitações e variação de umidade e, ainda, contaminação por fungos e bactérias (GULDHE *et al.*, 2014), além de ser um método pouco eficiente se comparado a liofilização e secagem em estufas elétricas. A Tabela 6 compara o tempo necessário e a energia consumida nestas três técnicas para a secagem de uma mesma amostra de microalga.

Tabela 3 Consumo de energia e tempo necessário para cada técnica de secagem

Técnica de secagem	Consumo de energia (kW)	Tempo necessário (horas)
Liofilização	21,96	24
Secagem em estufa	6	12
Secagem ao sol	Não calculado	72

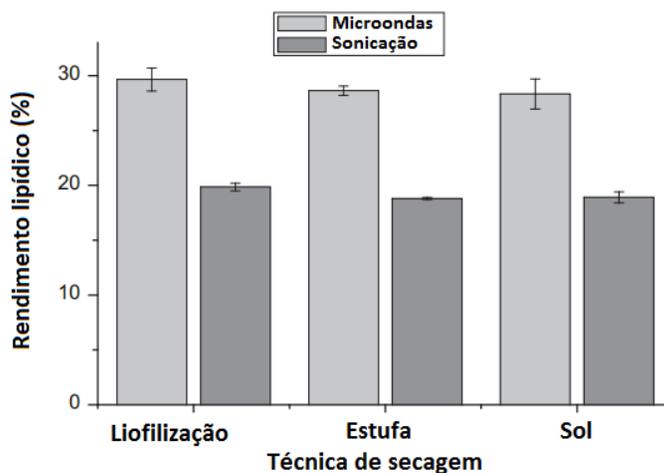
Fonte: GULDHE, 2014

O uso de estufas elétricas na secagem da biomassa de microalga apresenta mesma eficácia que a secagem ao sol, com a ressalva de diminuir os riscos com contaminação e degradação do material, além de ser um caminho menos oneroso energeticamente em relação à liofilização e requerer metade do tempo necessário à secagem (GULDHE *et al.*, 2014).

A liofilização é um processo em a biomassa microalgal é seca ao ser congelada sob vácuo, onde a umidade presente é sublimada e consequente retirada da amostra (KERANS *et al.*, 2015). Trata-se de um método vantajoso para estudos onde se deseja a secagem do material, porém mantendo a integridade biológica dos constituintes, como as proteínas e material genético (MEISTER; GIESELER, 2009). Outra grande vantagem da liofilização está na sua capacidade criogênica de fragilizar a parede celular de microalgas facilitando o rompimento da mesma e assim consequentemente aumentando os rendimentos lipídicos na extração (MATA *et al.*, 2010). A Figura 16 ilustra este efeito em um dos trabalhos de

Guldhe, percebe-se que a combinação da liofilização com microondas promoveu o maior rendimento lipídico em relação às outras combinações, cerca de 30% (m/m), valor próximo ao da combinação microondas com estufa, o uso do sol como forma de secagem promoveu o menores rendimentos.

Figura 14 – Comparação do rendimento lipídico após combinações de formas de secagem e rompimento celular



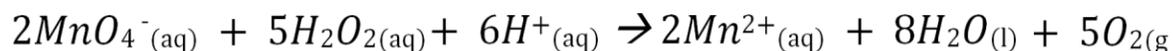
Fonte: GULDHE (ADAPTADO), 2014

3.7.1.1.2 Padronização da solução de H₂O₂

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é uma molécula relativamente instável nas condições ambientes, pois facilmente se decompõe em água e gás oxigênio, assim as soluções de peróxido possuem concentração variável ao longo do tempo, principalmente se forem armazenadas de forma inadequadas como em temperatura ambiente e em presença de luz (BOLWYREVF, 1935). Portanto existe uma incerteza quanto à concentração real das soluções concentradas de peróxido de hidrogênio disponíveis em laboratório, deste modo é necessário a padronização da concentração destas, para que assim se pudesse preparar as soluções utilizadas na oxidação da parede celular das microalgas deste trabalho.

A técnica de padronização aplicada foi a permanganometria, que consiste em análise volumétrica, em que uma solução de permanganato é o agente titulante, onde ocorre uma reação de oxirredução em meio ácido entre o íon permanganato e o peróxido de hidrogênio formando o íon manganês (II), água e gás oxigênio (BOLWYREVF, 1935) como descrito na reação 1 ilustrada na Figura 17.

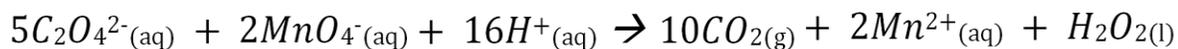
Figura 15 – Reação entre o íon permanganato e o peróxido de hidrogênio



Fonte: AUTOR, 2017

Contudo, o permanganato de potássio é um forte agente oxidante, ou seja, que é facilmente reduzido e que pode oxidar muitos materiais que tenham contato com ele, assim é um composto que pode sofrer forte influência do ambiente externo, deste modo ele não deve ser considerado um padrão primário. Portanto as soluções de permanganato de potássio preparadas devem ser submetidas à padronização via volumetria de titulação com oxalato de sódio (padrão primário) conforme demonstra a Figura 18.

Figura 16 - Reação entre o oxalato e o permanganato



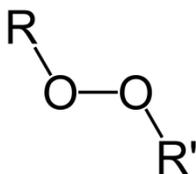
Fonte: AUTOR, 2017

3.8 Parâmetros de qualidade dos lipídios

3.8.1 Índice de peróxidos orgânicos

O índice de peróxidos orgânicos (IPO) é um parâmetro que quantifica a presença de peróxidos orgânicos (PO) em uma amostra. Os PO são funções químicas que apresentam uma ou duas cadeia carbônica (R e R') ligadas ao grupo $(O_2)^{2-}$ como ilustra a Figura 19.

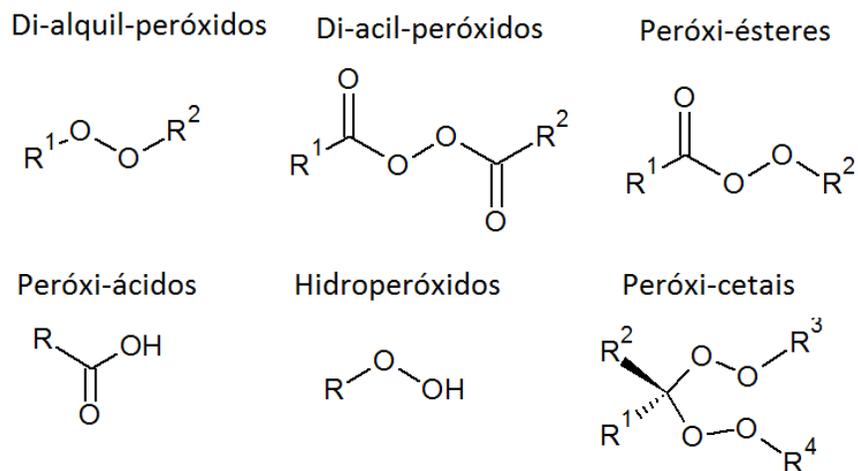
Figura 17 - Estrutura de peróxido orgânico



Fonte: AUTOR, 2017

Nos lipídios, os PO, moléculas intermediárias entre o material inicial e os indesejáveis produtos de oxidação, como cetonas, ácidos carboxílicos, aldeídos e polímeros de alto peso molecular são resultantes da reação da matéria com o oxigênio atmosférico, conforme ilustrado na Figura 20. A presença de calor, luz e umidade podem acelerar a formação de PO nos lipídeos, que obviamente degradam o material mais rapidamente, portanto o bom armazenamento garante maior longevidade ao material (PULLEN; SAEED, 2012). O monitoramento do índice de peróxidos orgânicos tanto no óleo ou no biodiesel é fundamental para o controle de qualidade, este parâmetro é proporcional à degradação por vias oxidativas (LÔBO et al., 2009)

Figura 18 - Principais peróxidos orgânicos formados



Fonte: PRANA (ADAPTADO), 2014

Para determinar o índice de peróxidos em óleos e gorduras existem diversas normas nacionais e internacionais, como, por exemplo, as normas AOCS cd 8b-90 e AOCS cd 12-57. O IPO é dado pelo consumo de iodo em mili-equivalentes por quilograma de óleo (*meq/Kg*). A Tabela 7 ilustra os valores máximos de IPO em óleos comestíveis permitidos pela ANVISA. O IPO máximo permitido pela ANVISA varia de óleo para óleo devido às suas distintas composições lipídicas, assim óleos mais ricos em ácidos graxos insaturados possuem limites maiores de IPO.

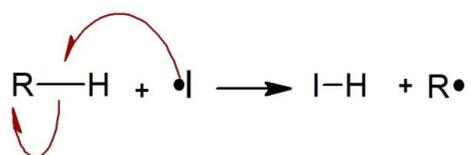
Tabela 4 - Valores máximos de IPO em óleos comestíveis permitidos pela ANVISA

Óleo	IPO Máximo Permitido (<i>meq/kg</i>)
Óleos e gorduras refinadas (exceto óleo de oliva refinado)	10
Azeite de oliva refinado	5
Azeite de oliva virgem	20
Óleo de bagaço ou caroço de oliva refinado	5

Fonte: ANVISA, 2016

Segundo Pullen, a degradação do material lipídico se dá em três importantes etapas, a primeira, a iniciação, ocorre na presença de um agente iniciador radicalar (I \cdot), que pode ser o próprio oxigênio atmosférico, uma espécie radicalar instável ou um radical orgânico gerado. O iniciador promove uma quebra de ligação heterolítica numa estrutura orgânica (R-H), abstraindo um hidrogênio radicalar e formando um radical orgânico instável (R \cdot) como ilustra a Figura 21.

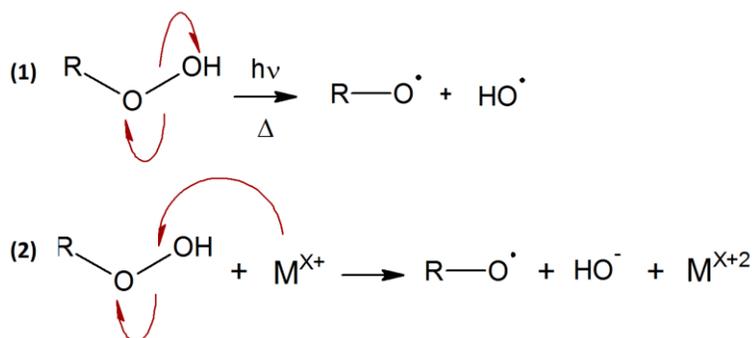
Figura 19 - Mecanismo de iniciação



Fonte: PULLEN (ADAPTADO), 2012

Um agente iniciador é uma espécie radicalar instável, de baixa seletividade, que pode ser formado por (1) dissociação térmica e/ou fotocatalítica de peróxidos presentes em impurezas do ML e (2) catálise por presença de metais ou íons metálicos contaminantes, como o ferro II (reação de Fenton), conforme ilustra a Figura 22. Para a formação fotocatalisada de iniciadores é necessário a exposição direta à radiação ultravioleta (PULLEN; SAEED, 2012).

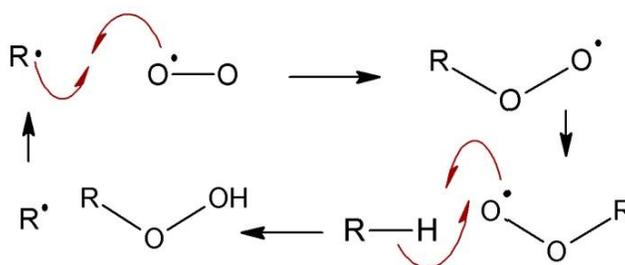
Figura 20 - Formação de um iniciador



Fonte: PULLEN (ADAPTADO), 2012

O segundo passo no processo de oxidação é a propagação, que consiste na reação entre o radical orgânico instável ($R\cdot$) e o oxigênio atmosférico formando um peróxido orgânico, espécie instável. Esse abstrai um hidrogênio de uma cadeia hidrocarbônica (RH) formando um novo radical orgânico ($R\cdot$) e, assim, sucessivamente, até todo o material lipídico estar convertido em PO, como ilustra a Figura 23.

Figura 21 - Mecanismo da propagação



Fonte: PULLEN (ADAPTADO), 2012

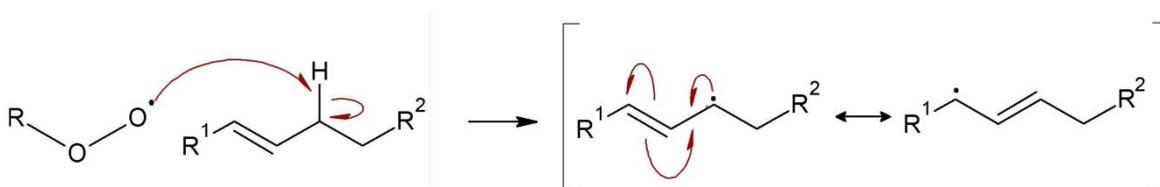
Na terceira e última etapa do processo de oxidação ocorre a formação de produtos secundários, estáveis, que podem ser gerados por diversos mecanismos, tais como a reação entre radicais orgânicos ($R\cdot$) formando polímeros ($R-R$) de alto peso molecular e viscosidade. Os principais tipos de peróxidos orgânicos formados após oxidação de cadeias orgânicas de lipídios é ilustrada na Figura 20 e devido a relativa baixa energia da ligação $O-O$, em torno de 20 a 50 kJ/mol, os PO são extremamente instáveis (PRANA *et al.*, 2014), e como consequência reagem em entre si por caminhos reacionais gerando uma gama de produtos secundário de oxidação, como aldeídos, alcoóis alifáticos, cetonas, éteres, ésteres e ácidos carboxílicos. Todos estes subprodutos são extremamente indesejáveis, pois diminuem a qualidade do material lipídico (PULLEN; SAEED, 2012).

Embora existam inúmeros trabalhos que apontam para suscetibilidade do material lipídico à oxidação, ainda não está descrita a influência do uso de agentes oxidantes na formação de peróxidos orgânicos nos lipídeos extraídos via método de extração oxidativo.

3.8.1.1 Susceptibilidade dos ácidos graxos poli-insaturados à formação de PO

Em geral, as microalgas são ricas em ácidos graxos poli-insaturados, como os ácidos graxos essenciais do tipo ômega-3 e 6, tornando o óleo de microalga em potencial para o consumo humano, já que tais ácidos exercem funções biológicas importantes no organismo, como propriedades anticoagulantes e anticancerígenas. Esses ácidos tornam o material lipídico mais propício à oxidação com o oxigênio atmosférico e formação de peróxidos orgânicos, pois na cadeia orgânica de um AGPI existem sítios alílicos e bi-alílicos que estabilizam significativamente a formação de radicais orgânicos por mesomeria como demonstra a Figura 24. Como ilustrado, a formação de um radical em um sistema alílico é deslocalizado em duas estruturas de ressonância. Portanto, quanto maior o número de grupos alílicos ou bi-alílicos mais estável é a formação de radicais e assim, mais propícia é a formação de PO (PULLEN; SAEED, 2012).

Figura 22 - Formação de um radical em um sistema alílico



Fonte: PULLEN (ADAPTADO), 2012

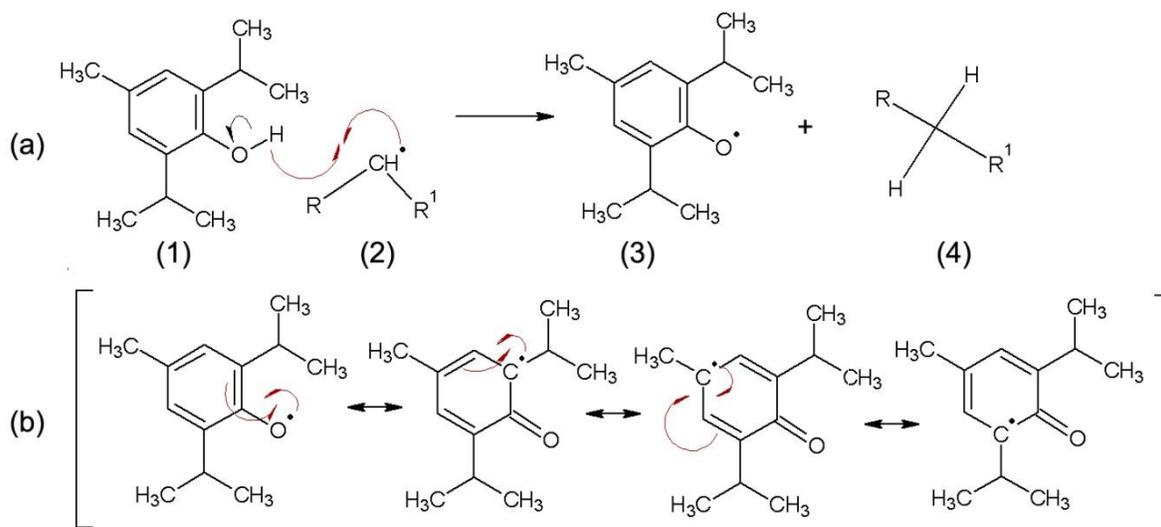
3.8.1.2 Antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias capazes de cessar o processo de oxidação pela inibição de radicais livres através da liberação de um radical de hidrogênio por uma espécie estabilizada (PULLEN; SAEED, 2012), como no bloqueio do oxi-radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e dos radicais hidroxila (OH^{\cdot}) e hidroperoxila (H_2O^{\cdot}) (CARDOSO, 1997).

O mecanismo de ação de um antioxidante se baseia na inativação de iniciadores oxidativos tal como o BHT (hidróxitolueno butilado), estrutura ilustrada na Figura 25, que

é um antioxidante sintético amplamente utilizado em combustíveis e alimentos. O BHT (1) impede o iniciador genérico (2), formando a molécula original (4) e uma espécie radicalar estabilizada (3) por ressonância onde o elétron se encontra deslocalizado por quatro sítios distintos (Figura 25-b).

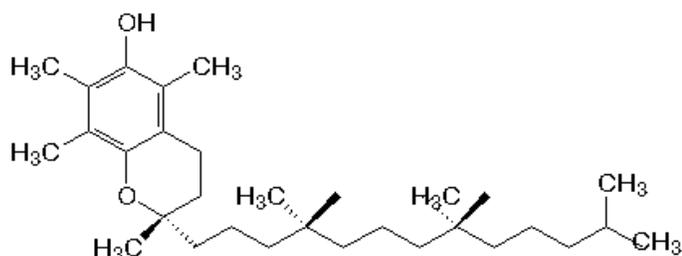
Figura 23 - Mecanismo de ação do BHT



Fonte: AUTOR, 2017

O material extraído de microalga contém espécies antioxidantes, tal como a vitamina E (Figura 26), possuindo, assim, uma natural resistência à oxidação, tanto pelo gás oxigênio atmosférico quanto por agente externos. O que também reflete na resistência oxidativa de seus derivados, como o biodiesel (RAWAT *et al.*, 2013).

Figura 24 - Estrutura do Alfa-tocoferol (vitamina E)



Fonte: AUTOR, 2017

3.8.2 Índice de acidez

O índice de acidez é um parâmetro de qualidade comumente empregado em óleos e gorduras, tanto para fins alimentícios quanto para síntese biodiesel, pois o aumento da acidez é um reflexo direto da degradação do material lipídico. A elevação da acidez pode se dar por vias oxidativas, em que ácidos carboxílicos podem ser gerados como produtos secundários de oxidação (PULLEN; SAEED, 2012), ou pelo aumento do número de ácidos graxos livres (AGL), que surgem principalmente devido a reações de hidrólise, onde ocorre a quebra da molécula de tri, di e monoglicerídeos pela água (CHEN *et al.*, 2012).

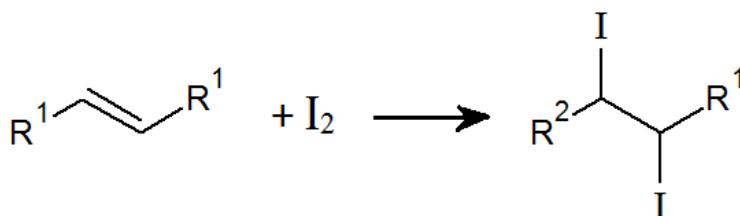
A elevada acidez de um óleo é indesejável à produção de biodiesel, pois promove o aumento viscosidade cinemática e causam corrosão aos tanques de estocagem de óleo e reatores. Os altos índices de ácidos graxos livre inviabilizam a reação de transesterificação como rota sintética. Tendo como único caminho reacional, a reação de esterificação, que exige condições mais onerosas como altas temperaturas, pressão e ausência de água. Outro ponto negativo em relação à esterificação é a competição com a reação de saponificação, pois os AGL reagem com catalisadores homogêneos básicos, formando sais orgânicos (sabões) que além de desativarem o catalisador, ainda promovem emulsões que dificultam a separação do biodiesel com os materiais polares produzidos na reação (CHEN *et al.*, 2012).

A determinação do índice de acidez consiste em uma análise volumetria do tipo ácido-base, entre o material lipídico, naturalmente de caráter ácido e uma solução de hidróxido de sódio (0,01M) previamente preparada e padronizada (EHIMEN *et al.*, 2010). Os valores obtidos são expressos em mg KOH/g, isto é, o quanto um grama de material lipídico consome de hidróxido de potássio numa reação ácido-base (ASHOKKUMAR; VARALAKSHMI, 2015). A agência nacional de petróleo, gás natural e bicomustíveis (ANP) normaliza o índice de acidez de óleos vegetais como igual a 0,5mg KOH/g.

3.8.3 Índice de iodo

Trata-se de um parâmetro analítico que mede o quanto uma amostra insaturada consome iodo através de uma reação de halogenação, descrita na Figura 27. Quanto mais iodo uma amostra absorve, maior é a quantidade de insaturações nas cadeias orgânicas presentes. A metodologia aplicada neste trabalho foi o método de Wijis descrito na norma oficial AOCS 1a-64-2009. O valor do índice de iodo é expresso em número de gramas de iodo absorvido por 100g de amostra.

Figura 25 – Reação de adição de iodo a uma cadeia insaturada



Fonte: AUTOR, 2017

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) determina através da instrução normativa de número 49, de 22 de dezembro de 2006, no anexo I, que os índices de iodo via método de Wijis para os óleos vegetais comestíveis devem estar dentro dos valores descrito na Tabela 8. Contudo, para síntese do biodiesel é recomendado um índice máximo de 120 g de $\text{I}_2/100\text{g}$ (ASHOKKUMAR; VARALAKSHMI, 2015), norma EN14214 (LÔBO et al., 2009b), pois a síntese de biodiesel a partir de óleos com índice de iodo a cima deste limite pode ter baixa estabilidade oxidativa (PULLEN; SAEED, 2012), como já discutido no item 3.8.1.1.

Tabela 5 - Índice de iodo de óleos vegetais refinados

Óleo	Tipo	Índice de iodo (g I ₂ /100g)
De algodão	1 e 2	100 a 123
De canola	1 e 2	105 a 126
De girassol	1	118 a 141
De milho	1 e 2	103 a 135
De soja	1 e 2	124 a 139

Fonte: MAPA, 2006

O índice de iodo limite (120 g I₂/100g) é facilmente alcançável ao realizar misturas (blendas) entre matérias graxas de diferentes graus de insaturação, assim, a norma EN14214 foi desenvolvida inicialmente para regulamentar os óleos vegetais e gordura animal para a produção de biodiesel, pois tal valor limite é naturalmente próximo dos índices principais óleos vegetais como mostra a Tabela 8.

Porém quando se objetiva produzir biodiesel de microalga, a norma é um gargalo ainda a ser superado, porque as microalgas são seres ricos em ácidos graxos mono e poli-insaturados que elevam significativamente o índice de iodo dos lipídios extraídos (SAMEK *et al.*, 2011), um exemplo é o óleo da microalga *Trachydiscus minutus* que é rica em ácido eicosapentaenoico (C20:5), que compões mais de 30% de sua fração lipídica e, como consequência, apresenta um elevado índice de iodo de aproximadamente 200 g I₂/100g (SAMEK *et al.*, 2011). A Tabela 9 ilustra os principais ácidos graxos e blendas encontrados no perfil lipídico das microalgas e os seus referidos índices de iodo.

Como esperado, ainda na Tabela 9, percebe-se que ácidos graxos saturados como o palmítico (16:0) possuem índices de iodo igual a 0g I₂/100g. Em contra partida, o aumento no número de insaturações aumenta proporcionalmente o índice de iodo, obtendo um valor de 420g I₂/100g para o ácido eicosapentaenoico (C20:5).

Tabela 6 - Índice de iodo obtido para os principais ácidos graxos de microalga

Ácido Graxo	Índice de Iodo (g I₂/100g)
Ácido Palmítico (C16:0)	0
Ácido oléico (C18:1)	90
Blenda 2:1 (m/m): Ácido oléico (C18:1)/Ácido araquidônico (C20:4)	158
Ácido linoleico (C18:2)	180
Blenda 6:5 (m/m): Ácido oléico (C18:1)/Ácido araquidônico (C20:4)	191
Ácido araquidônico (C20:4)	330
Ácido eicosapentaenoico (EPA – C20:5)	420

Fonte: SAMEK (adaptado), 2011

3.9 Técnicas analíticas utilizadas

Nesta seção é apresentada a fundamentação teórica das técnicas analíticas utilizadas no trabalho.

3.9.1 Espectroscopia de infravermelho

A espectroscopia do infravermelho é uma técnica analítica baseada na capacidade física de moléculas em absorver radiação nessa região espectral, fazendo vibrar ligações químicas em comprimentos de onda específicos, mudando o momento dipolo da ligação. Tal comprimento de onda depende da massa dos átomos envolvidos, do tipo de ligação e força, gerando um espectro distinto para cada tipo de substância. Deste modo, a técnica é muito útil na identificação de grupos funcionais e investigação da composição de moléculas (KAROUI *et al.*, 2010). Em geral, um espectro de infravermelho é dado pela absorbância ou transmitância (dadas em percentagem de radiação transmitida ou

absorvida) em função do número de onda em cm^{-1} (i.e, a quantidade de comprimentos de onda que cabem em 1 cm).

A técnica de infravermelho se subdivide no estudo de diversas regiões comprimento de onda, porém apenas duas regiões são amplamente aplicadas na investigação de moléculas, que são infravermelho próximo (NIR – *Near Infrared Spectroscopy*) que abrange 12500 a 4000 cm^{-1} e Infravermelho médio (MIR – *Mid infrared spectroscopy*) na região de 4000 a 400 cm^{-1} (STUART, 2004). No MIR são designadas quatro principais sub-regiões, a primeira de 4000 a 2500 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação hidrogênio-X (onde “X” representa qualquer átomo ametal), a segunda de 2500 a 2000 cm^{-1} , que é relacionada às vibrações de ligações triplas, a terceira de 2000 a 1500 cm^{-1} que são as vibrações das ligações duplas e por fim a região de *fingerpint* (identidade digital) de 1500 a 400 cm^{-1} (KAROUI *et al.*, 2010) que correspondem às vibrações grupos funcionais específicos que tornam a região muito sensível e única para da substância analisada, sendo muito importante para a identificação de moléculas (APARICIO; HARWOOD, 2000).

Atualmente, na obtenção do espectro é utilizada a transformada de Fourier (FTIR – *Fourier Transformer Infrared Spectroscopy*), que consiste numa técnica que dispensa a variação de comprimento de onda na radiação emitida na amostra, sendo necessário apenas a emissão de uma radiação que contém os contenha todos, assim se obtém um espectro bruto que passa por uma manobra matemática (Transformada de Fourier) e se obtém um espectro idêntico ao convencional em menos tempo, o que permite realizar múltiplos escaneamentos na amostra em segundos, tornando a análise mais confiável. Além de tornar a análise menos onerosa, já que os espectrômetros com transformada de Fourier são mais baratos, pois necessitam apenas de um interferograma no lugar de um monocromador.

O espectro de MIR é muito útil para analisar qualidade de óleos, podendo mostrar alterações significativas na composição lipídica, além de quantificar o índice de peróxidos orgânicos (PO) em até 50% (m/m) através da banda em 3444 cm^{-1} , alusiva ao estiramento

da ligação do oxigênio e hidrogênio da hidroxila (ROHMAN; MAN, 2010). As principais bandas presentes no extrato lipídico são descritas por Guillen e são mostradas na Tabela 10.

Dentre as bandas citadas na Tabela 10, duas são muito importantes para o trabalho realizado nesta dissertação, a primeira está em 3005 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação dupla, pois tal banda está correlacionada com o grau de insaturação dado pelo índice de iodo, assim variações significantes deste índice promovem notáveis alterações nesta banda. A segunda banda está em 1743 cm^{-1} , referente ao estiramento de carbonilas de ésteres e produtos carbonilados de oxidação (exceto ácido carboxílico que apresentará tal banda em outra região do espectro), indicando possíveis oxidações no extrato lipídico.

Tabela 7 - Principais grupos funcionais presentes no ML

Número de onda (cm^{-1})	Grupo funcional associado
3005	Ligação dupla <i>cis</i> (estiramento)
2924 e 2852	Estiramento simétrico e assimétrico de grupo metilênicos (- CH_2 -)
1743	Carbonila de ésteres de triglicerídeos
1465	Bending de grupos alifáticos CH_2 e CH_3
1417	Rocking
1402	Vibração de bending de $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$
1377	Vibração de bending de grupos CH_2
1236 e 1160	Estiramento carbono-oxigênio
1117 e 1098	Estiramento carbono-oxigênio de ésteres

Fonte: GUILLEN E CABO (ADAPTADO), 1997

3.9.2 Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)

A cromatografia consiste em uma técnica bastante utilizada para separação qualitativa e quantitativa de muitos compostos voláteis e semi-voláteis, utilizando uma fase móvel que pode ser líquida ou gasosa e uma fase estacionária, a simples combinação entre as distintas formas de fase móvel com a estacionária geram as diversas formas de cromatografia, que a tornam uma poderosa técnica utilizada para purificação/separação de substâncias e principalmente para fins analíticos (LI *et al.*, 2015).

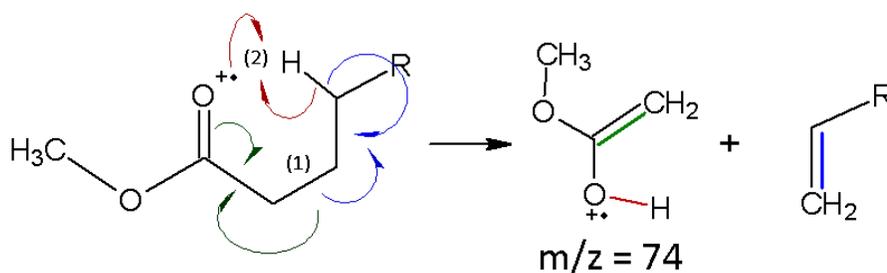
Já a espectrometria de massas é uma técnica que se baseia na determinação da massa molecular e quantificação relativa de fragmentos iônicos de substâncias, gerando um gráfico de duas dimensões entre massa do íon molecular (m/z) e intensidade relativa. Tal gráfico chama-se espectro de massas e é único para cada molécula distinta analisada (MENET, 2011). O pico m/z de maior intensidade é chamado de pico base e é relativo ao fragmento iônico de maior estabilidade química, logo o mais abundante entre os fragmentos. Já o pico m/z de maior massa é chamado de pico do íon molecular, e é associado à molécula original ionizada que sem fragmentações, em geral de baixa abundância relativa.

Assim, o GC-MS é a combinação da alta eficiência da separação em fase gasosa via utilização de colunas cromatográficas com a alta sensibilidade analítica com a espectrometria de massas, promovendo espectros de alto valor informacional na identificação de moléculas presentes no analito (MCEWEN; MCKAY, 2005). Numa análise com GC-MS é gerado um cromatograma, que é um gráfico de bandas cromatográficas contra o tempo de retenção do analito e um espectro de massa associado a cada banda cromatográfica. Em geral os softwares que operam um GC-MS possuem uma biblioteca que permite comparar os espectros obtidos com os já disponíveis e assim identificar a substância analisada, deste modo, não há a necessidade do uso de padrões analíticos.

3.9.2.1 Pico base do espectro de massas de ésteres alquílicos

O pico base de um éster alquílico, em geral, se trata de um rearranjo de McLafferty característico, isto é, uma clivagem $\beta(1)$ seguida da abstração de um hidrogênio γ carbonílico (2) pelo oxigênio da carbonila, como ilustra o mecanismo reacional na Figura 28, gerando o íon $m/z = 74$ para ésteres metílicos e 88 para os etílicos (MENET, 2011).

Figura 26 - Rearranjo de McLafferty para um éster metílico



Fonte: MENET (ADAPTADO), 2011

3.9.3 Termogravimetria

A termogravimetria reúne um conjunto de técnicas termo-analíticas que se baseia no comportamento de propriedades química e/ou físicas de uma amostra ou seus produtos frente à variação programada de temperatura ao longo de um tempo controlado em um determinado tipo de atmosfera (SKOOG, *et al.*, 2002). A Tabela 11 ilustra as diferentes técnicas térmicas e suas correlações com as propriedades físico-químicas avaliadas.

Tabela 8 - Principais Técnicas termicas e suas propriedades avaliadas

Propriedade avaliada	Técnica	Abreviatura (Inglês)
Massa	Análise termogravimétrica	TGA
	Termogravimetria Derivada	DTG
	Deteção de gás desprendido	EGD
	Análise de gás desprendido	EGA
	Análise Térmica por Emancipação	ETA
Temperatura	Análise Térmica Diferencial	DTA
Entalpia	Calorimetria Exploratória Diferencial	DSC
Características mecânicas	Análise Termomecânica	TMA
Características elétricas	Análise Dinâmico-Mecânica	DMA
Características Acústicas	Termoeletrometria	**
Características Magnéticas	Termossonimetria	TS
Características ópticas	Termomagnetometria	TM
	Termoluminescência	TE
	Termoptometria	TO

Fonte: AUTOR, 2017

Cada análise, especificada na Tabela 11, requer equipamentos específicos e aparatos distintos à necessidade de resposta de uma respectiva análise térmica. As principais propriedades avaliadas nos trabalhos relacionados ao estudo de interesse desta dissertação são a variação de massa na análise termogravimétrica (TGA) e na

termogravimetria derivada (DTG) que são mais bem discutidas na seção 3.8.3.1 e variação de temperatura na análise térmica diferencial (DTA), discutida na seção 3.8.3.2.

A avaliação da entalpia na calorimetria exploratória diferencial (DSC) também é um análise muito importante, pois é capaz de aferir o calor que é emitido ou absorvido em reações ou processos físicos analisados (SKOOG, et al., 2002). As outras propriedades ilustradas na Tabela 11 como as características mecânicas, elétricas, acústicas, ópticas e magnéticas são de grande interesse na engenharia de materiais.

3.9.3.1 Análise termogravimétrica (TGA) e termogravimetria derivada (DTG)

As análises termogravimétricas (TGA, sigla em Inglês para *thermogravimetric analysis*) são conduzidas em balanças de alta precisão alojadas dentro de um forno equipado com sensores de temperaturas (termopar) e sistema de vazão contínua de gás (que serve para dar saída aos materiais volatilizados ou decompostos termicamente). As análises termogravimétricas como demonstra a Tabela 11 medem a variação de massa com a temperatura gerando a curva DTG.

Diferentes compostos presentes no analito, em geral, se decompõem em temperaturas distintas, gerando perfis de decomposição distintos chamados de eventos termogravimétricos. Contudo, tais eventos não são visualmente detectados com facilidade, assim a derivada matemática da curva TGA, isto é, a variação da massa sobre a variação da temperatura, chamada de curva DTG (do Inglês *Derivative thermogravimetric*) facilita a localização da temperatura inicial e final de decomposição em um evento, além de fornecer a temperatura onde o decaimento mássico é maior (SKOOG, et al., 2002). Uma importante combinação com a análise termogravimétrica é a acoplagem do sistema de saída de gás de purga com um espectrômetro de massa (MS) ou com espectrômetro de infravermelho (IR/FTIR), para análise mais detalhada sobre a composição dos subprodutos gerados na análise termogravimétrica (YANG et al., 2007).

3.9.3.2 Análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Como ilustra a Tabela 11, a análise térmica diferencial (DTA, do Inglês *Differential Thermal Analysis*) mede a variação da temperatura em processos exo e endotérmicos que ocorrem durante a análise. A DTA mede indiretamente o fluxo de calor por meio da diferença entre dois sensores de temperatura, um dentro da balança e outro fora (de referência).

Outra análise importante é a calorimetria exploratória diferencial (DSC, do Inglês *Differential Scanning Calorimetry*), que mede a variação do calor durante a análise térmica, medindo de forma direta o fluxo de calor, gerando uma análise mais detalhada que a análise térmica diferencial (DTA), permitindo, por exemplo, obtenção dos valores de calor de reação. Porém ambas as análises, DTA e DSC, podem trazer informações relevantes sobre o fluxo de calor e processos endo ou exotérmicos durante a análise.

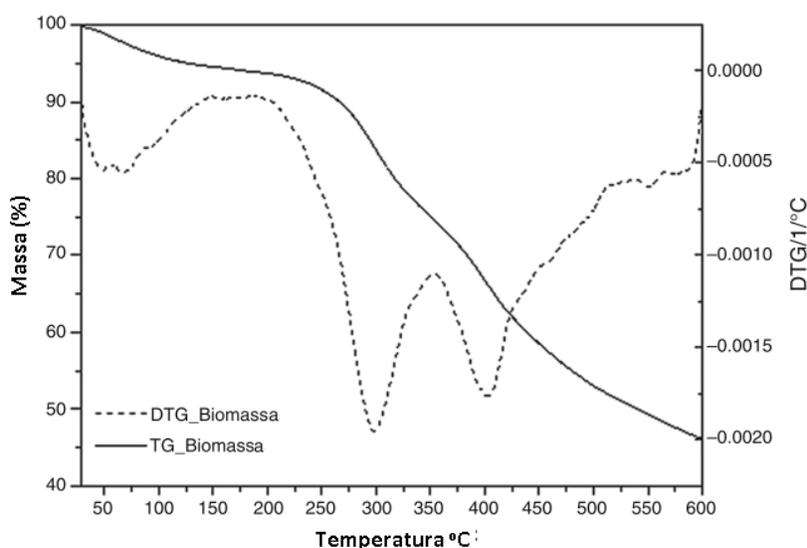
3.9.3.3 Perfil termogravimétrico da biomassa de microalga

As variações nas características biológicas das microalgas, como variação da composição lipídica ou tipo de revestimento na parede celular garantem composições mássicas distintas entre os mais variados gêneros e espécies. Além que as microalgas são extremamente sensíveis às condições do meio de cultivo, como pH, intensidade da luz, temperatura, salinidade, suplementação de gás carbônico e nutrientes (AHMAD *et al.*, 2011). Deste modo é impossível observar um mesmo perfil termogravimétrico para microalgas distintas ou até mesmo para microalgas do mesmo gênero e espécie quando submetidas condições distintas de crescimento.

Porém em uma análise termogravimétrica típica de microalga é observado a decomposição/volatilização dos seus principais componentes, como a água, carboidratos,

proteínas e lipídeos (GOMES *et al.*, 2015). Assim, é possível obter informações importantes sobre sua composição e especificar a melhor destinação da microalga, como uso para produção de biodiesel, bioálcool, biogás ou estratégias para biorrefinaria. A Figura 29, ilustra o comportamento térmico da biomassa da microalga *Monoraphidium sp*, onde a curva contínua é a curva que mede a perda massa com acréscimo da temperatura (curva TGA) e a curva não contínua é a sua derivada em relação à temperatura (DTG).

Figura 27 - Análise termogravimétrica da biomassa da microalga *Monoraphidium sp*.



Fonte: GOMES (adaptado), 2015

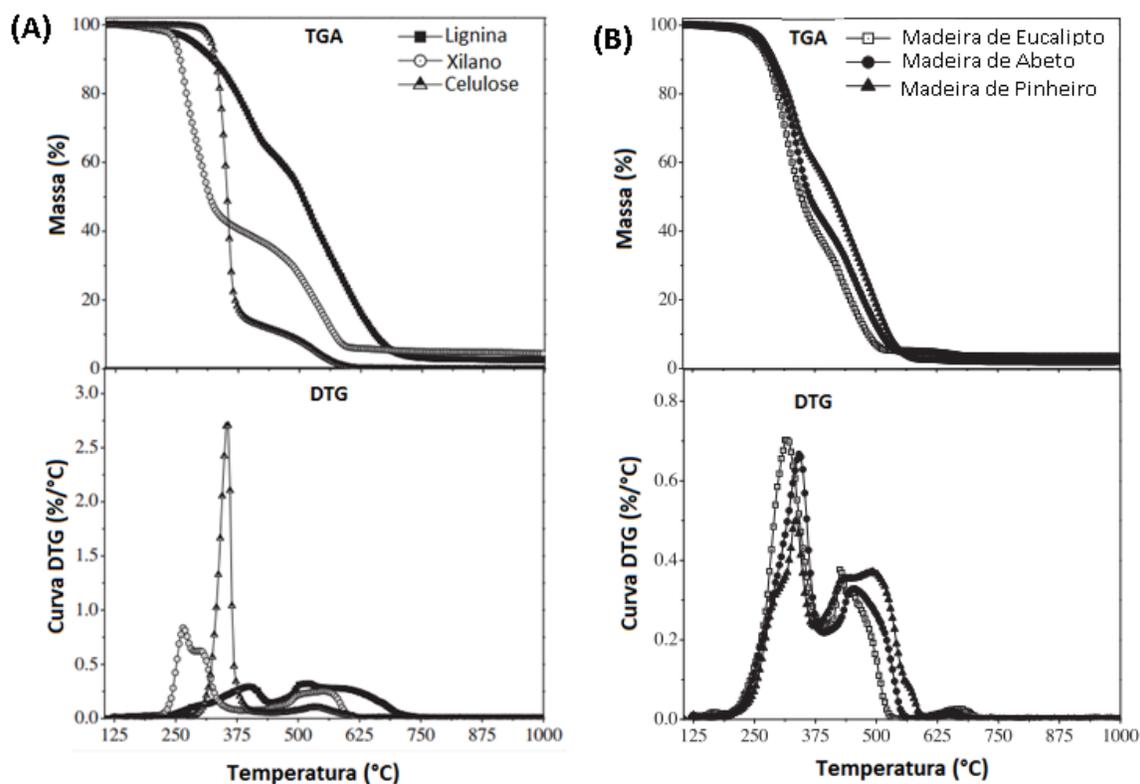
Ainda na Figura 29 são observados três eventos térmicos relatado por Gomes, *et al*, 2015. O primeiro, entre 29 e 151 °C, relacionado à evaporação de água presente na amostra; o segundo, entre 190 a 350 °C, referente a decomposição simultânea de carboidratos e proteínas e o último, de 352 a 521 °C, a volatilização e decomposição de lipídeos.

3.9.3.4 Análise termogravimétrica de substâncias presentes na parede celular da microalga

Em geral, a composição da biomassa de origem vegetal é de cerca 90% carboidratos, grande parte deles está na forma de biopolímeros que são os polissacarídeos, principal material que reveste a parede celular de microalgas (MATA *et al.*, 2010). A análise térmica de carboidratos apresenta em geral dois grandes eventos de perda de massa exotérmicos, o primeiro ocorre acima de 200 °C e é relativo à desidratação, despolimerização da estrutura e decomposição por pirólise de carboidratos mais simples com saída principalmente de água, monóxido de carbono e metano (BOTHARA; SINGH, 2012). O segundo evento ocorre em temperaturas maiores, referente à degradação oxidativa do material de maior resistência térmica (ZOHURIAAN; SHOKROLAHI, 2004).

A mistura de carboidratos e substâncias que compõe a parede celular das microalgas é chamada de biomassa lignocelulósica, isto é, celulose, lignina e hemicelulose (descritos com mais detalhes na seção 3.6). A análise térmica destes materiais já está bem descrita na literatura, e embora a biomassa lignocelulósica possa ter composição distinta ao variar a origem da biomassa, o perfil da análise térmica dos seus constituintes sofre pouca variação. A Figura 30 pertence a um dos trabalhos de LÓPEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2013, e ilustra o perfil térmico da celulose, lignina e do xilano (hemicelulose) de três origens distintas, madeira de eucalipto, madeira de abeto e madeira de pinheiro, ficando bastante evidente na Figura 30-B que as três, ressaltando pequenas diferenças nas curvas TGA e DTG, elas possuem o mesmo perfil térmico.

Figura 28 - Análise Termogravimétrica dos principais componentes da PC de microalgas

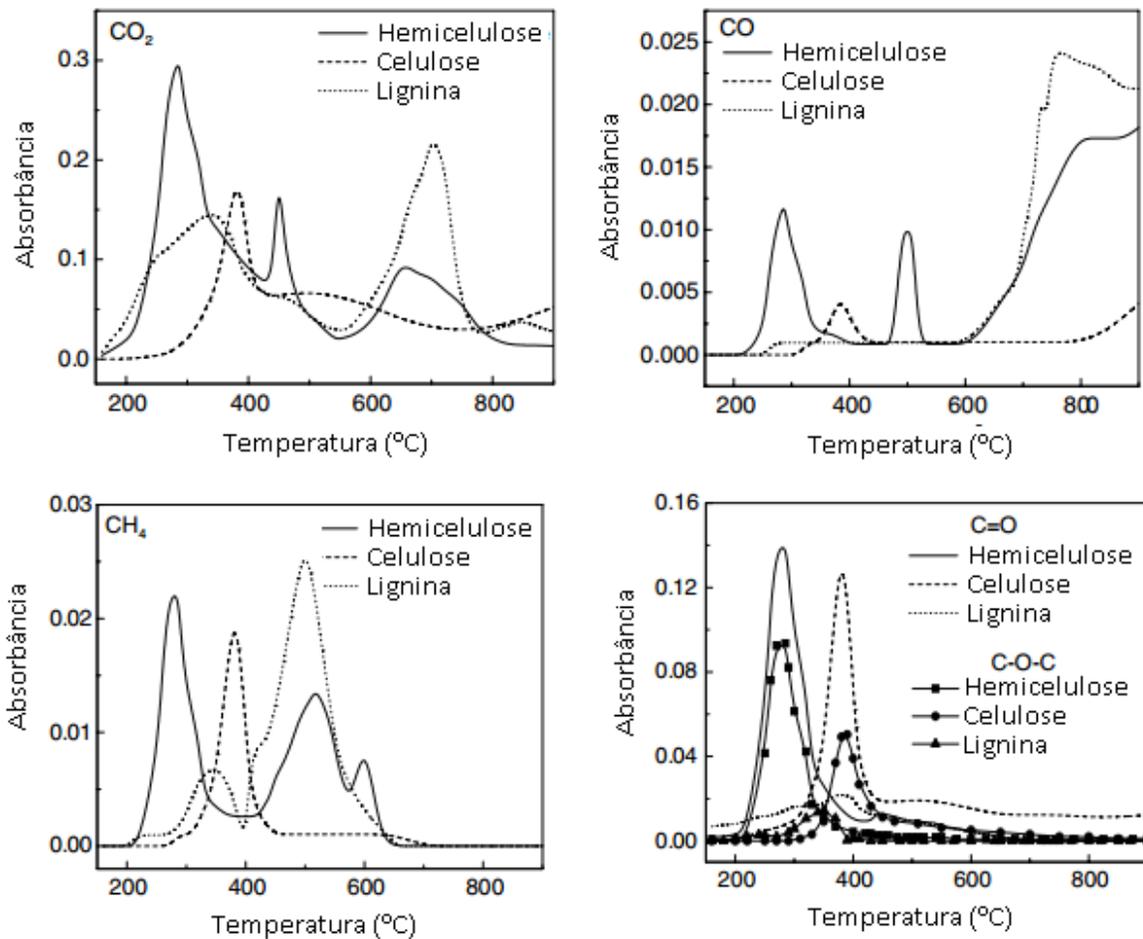


Fonte: LÓPEZ-GONZÁLEZ (ADAPTADO), 2013

A Figura 30-A traz as curvas DTA e DTG para a celulose, lignina e do xilano, demonstrando claramente o polissacarídeo de menor estabilidade térmica é xilano (Hemicelulose), começando a se decompor em cerca de 240 °C. Já a lignina, devido a sua estrutura complexa e resistente é o componente com maior estabilidade térmica (resultado semelhante ao já obtido em 1970 por Ramiah), se decompondo em dois eventos um iniciando em aproximadamente 250 °C e outro em 550 °C. A celulose, como é notável, possui estabilidade térmica intermediária entre o xilano e a lignina, começando a se decompor em aproximadamente 290 °C até 370 °C.

Outro estudo relevante foi publicado por Yang em 2007 que estudou o gás residual da pirolise da biomassa lignocelulósica via acoplamento de um sistema cromatográfico com detecção FTIR numa balança DTG-DSC. As curvas são mostradas na Figura 31.

Figura 29 - Principais moléculas liberadas na decomposição térmica da biomassa lignocelulósica



Fonte: YANG (ADAPTADO), 2007

Nota-se na Figura 31 que a hemicelulose se degradou em temperaturas mais baixas 220-315 °C, a celulose em 315-400 e a lignina a 150 a 900°C (i.e. toda faixa de temperatura analisada), como reporta a literatura. O perfil do gás de pirolise liberado foi bem distinto de uma substância para outra. A celulose e hemicelulose por possuírem estruturas químicas parecidas (Figuras 9 e 11) liberaram um alto teor de substâncias orgânicas ricas em grupos carbonila (C=O) e grupos éter (C-O-C) em baixas temperaturas (300-450 e 200-400 °C, respectivamente). Contudo, em temperaturas mais elevadas a hemicelulose liberou mais gás carbônico (CO₂) e a celulose liberou monóxido de carbono (CO), atribuído ao craqueamento dos grupos funcionais oxigenados. Já a lignina devido a

alta presença de anéis aromáticos, o craqueamento pirolítico liberou um alto teor de metano (CH_4) e gás hidrogênio (H_2).

Um estudo relevante ao trabalho desenvolvido nesta dissertação foi publicado, em 2012 por Bothara relacionado ao estudo térmico de polissacarídeos naturais. Concluindo que quando um polissacarídeo sofre algum tipo de agressão química, como o contato com agentes oxidantes, sua estrutura química é danificada refletindo na estabilidade térmica do material. Dois indícios comprovam isto, a redução da temperatura dos eventos de decomposição e pela diminuição de calor liberado na oxidação térmica destes eventos (BOTHARA; SINGH, 2012)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo apresenta a metodologia, equipamentos e reagentes utilizados no cultivo da microalga estudada, secagem, oxidação da parede celular a obtenção do material lipídico. Assim como a aplicação e adaptação de métodos para determinação dos parâmetros de qualidade estudados, obtenção do perfil lipídico e espectroscópico. Também é relatada a metodologia, aparato e materiais aplicados na caracterização do perfil físico e térmico da biomassa residual, além da síntese do biodiesel e sua análise.

4.1 Cultivo da microalga *Chlamydomonas sp*

A microalga estuda foi cedida pelo projeto de pesquisa intitulado “*Implementação de uma planta piloto para produção de biomassa de microalgas, visando à obtenção de biodiesel*” pela parceria institucional entre a Petrobrás S.A., a UFRN e o CENPES. As microalgas foram cultivadas por sete dias em sistema outdoor via raceway de 10m de comprimento na planta de produção localizada na fazenda Samiza (Figura 32) no município de Extremoz-RN, Brasil. O meio de cultivo estava com 15% de salinidade e foi suprido com nitrato e gás carbônico.

Figura 30 - Fazenda Samiza



Fonte: GOMES, 2013

4.2 Secagem das microalgas

As microalgas foram secas via técnica de liofilização por 28 horas em liofilizador da marca Thermo Scientific Heto Power Dry modelo PL6000, idêntico ao ilustrado na Figura 33 e, posteriormente, acondicionadas em sacos plásticos tipo *ziplock* para controle da entrada de ar atmosférico e umidade. Em seguida, as embalagens foram envolvidas com papel alumínio para proteção da luz e armazenados em um *freezer* sob temperatura de -14°C.

Figura 31 - Liofilizador Thermo Scientific Heto PowerDry modelo PL6000



Fonte: <https://www.thermofisher.com/br/en/home.html>, 2016

4.3 Preparação e padronização da solução de H₂O₂

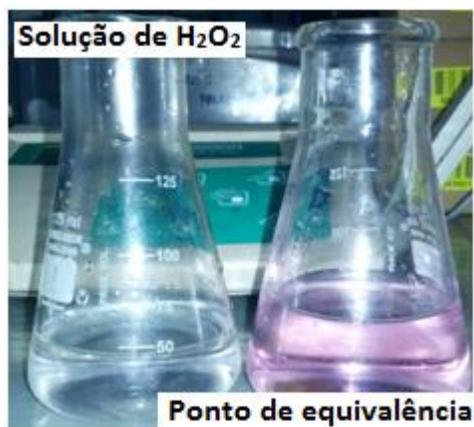
Foram preparadas soluções de oxalato de sódio (Na₂C₂O₄) a uma concentração de 0,01M que foram utilizadas como padrão primário e agente titulante na titulação de uma solução de 0,01M de permanganato de potássio (KMnO₄). O indicativo do ponto de equivalência é a mudança de coloração rosada incolor do titulado. A concentração real de permanganato de potássio é dada pela Equação 1, onde C1 é a concentração da solução

de oxalato de sódio (em mol/litro), V1 é o volume da solução de oxalato de sódio gasto (em litros) e V2 é o volume da solução de permanganato de potássio utilizado como titulado (em litros). A titulação ocorreu sob agitação magnética e foi repetida por quatro vezes (quadruplicata)

$$\text{Concentração de KMnO}_4 = \frac{\left(\frac{C1 \cdot V1}{2,5}\right)}{V2} \quad (1)$$

A Solução de peróxido de hidrogênio utilizada foi da marca Vetec 30% (m/m) 100 volumes, armazenada sob refrigeração de 2 °C, que foi padronizada pelo método da permanganometria em triplicata. Em seguida foram preparadas por diluição as soluções com concentrações de 0,158, 0,250, 0,382, 0,528 e 0,715M, em que seguida foram padronizadas por permanganometria em triplicata. O ponto de equivalência na permanganometria é ilustrado na Figura 34, pela mudança de cor do titulado de incolor para levemente rosado.

Figura 32 - Ponto de equivalência na permanganometria



Fonte: Autor, 2017

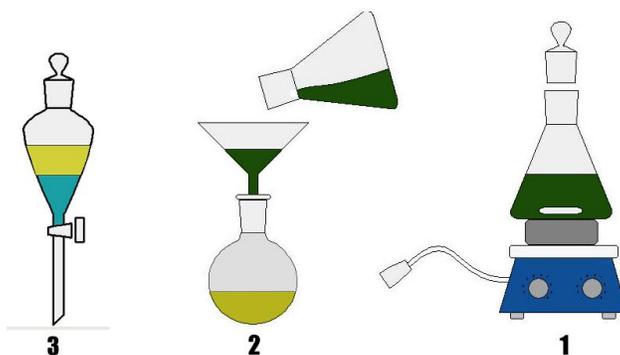
4.4 Extrações e concentração de material lipídico

As extrações foram conduzidas em uma capela com sistema de exaustão de gases, sob condições normais de pressão atmosférica e a temperatura ambiente do laboratório, cerca de 23°C. As microalgas previamente secas foram pesadas em um Erlenmeyer de 500ml com boca esmerilhada. Foram testadas cinco concentrações distintas da solução de peróxido de hidrogênio (em mol por litro) que foram 0,158, 0,250, 0,382, 0,528 e 0,715.

Em seguida, nas extrações com ação oxidativa, adicionou-se a cada Erlenmeyer a solução de peróxido de hidrogênio na proporção de 8g de solução para 1g de microalga seca e deixou-se sob agitação por 4 minutos. Após isto, diluiu-se o volume em 10 vezes com solvente *n*-hexano de 99,8% de pureza, fechando o Erlenmeyer com tampa de vidro vedada com fita veda-rosca, mantendo agitação magnética por 18 horas (Figura 35-1) como sugerido por Steriti, 2014. As condições operacionais, como tempo, agitação e temperatura das extrações sem ação oxidante foram semelhantes às com presença de H₂O₂, tomou-se o cuidado de adicionar a mesma quantidade de solvente *n*-hexano que foi adicionado às outras extrações, seguindo uma proporção de 72ml para 1g de microalga seca.

Após o contato com o solvente, o material extraído passou por uma filtração simples, usando um funil de vidro com um pequeno chumaço de algodão como filtro como mostra a Figura 27-2 Após isto, apenas o material lipídico que teve contato com solução de H₂O₂ foi colocado em um funil de decantação e lavado com água destilada por das vezes na proporção volumétrica de 1:1 (Figura 35-3)

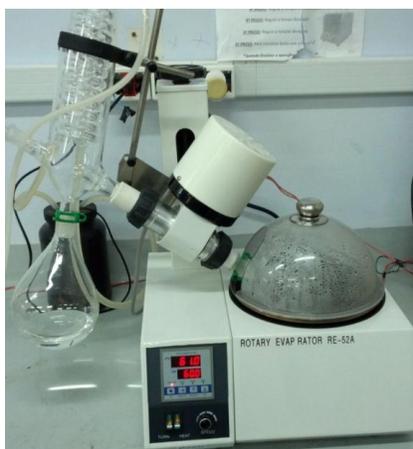
Figura 33 - Aparato para extração



Fonte: AUTOR, 2017

O Material lipídico foi concentrado usando uma rota-evaporador China RE 52A (Figura 36) sob sistema de baixa pressão, banho de aquecimento a 60 °C e rotação do balão em 20ppm.

Figura 34 - Rota-evaporador utilizado



Fonte: AUTOR, 2017

4.5 Análise de índice de peróxidos orgânicos e índice de iodo

Para a análise de peróxidos orgânicos das amostras foi seguido rigorosamente a metodologia descrita na norma oficial AOCS 8b-90 da *American Oil Chemist's Society*. Já

para determinação do índice de iodo foi seguido o método de Wijjs, descrito na norma oficial AOCS Tg 1a-64 também pertencente *American Oil Chemist's Society*.

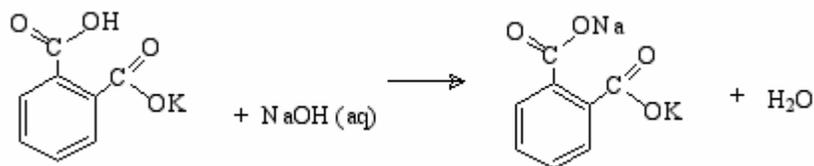
4.6 Análise de índice de acidez

Antes da determinação dos valores de acidez se padronizou a solução de hidróxido de sódio como é descrito no item 4.7.1.

4.6.1. Padronização da solução de hidróxido de sódio

A solução de hidróxido de sódio de concentração de 0,01M foi padronizada em quadruplicada com uma solução padrão de 0,001M de biftalato ($\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$) de potássio como agente titulante via volumetria ácido-base através da reação descrita abaixo (Figura 37).

Figura 35 - Reação ente o biftalato de potássio e hidróxido de sódio



Fonte: AUTOR, 2017

A padronização ocorreu em quadruplicata (repetição da análise quatro vezes) em presença de indicador fenolftaleína no titulado, pingando-se lentamente a solução de biftalato de potássio até surgir uma coloração levemente rosada. A concentração final da solução de hidróxido de sódio é dada pela média dos valores obtidos da concentração de

hidróxido de sódio, e estes são obtidos individualmente pela Equação 2 abaixo.

$$C_{\text{NaOH}} = V_{\text{bif}} \times C_{\text{bif}} / V_{\text{NaOH}} \quad (2)$$

Onde C_{NaOH} é a concentração de hidróxido de sódio (mol/litro), V_{bif} é volume da solução de biftalato de potássio (litros), C_{bif} é a concentração de biftalato de potássio (mol/litro) e V_{NaOH} é o volume da solução de hidróxido de sódio (litros).

4.6.2 Análise do índice de acidez

Para a determinação do índice de acidez, foi utilizada uma micropipeta para transferir cerca de 0,1g do material lipídico para um Becker de 500ml, previamente tarado na balança analítica, em seguida adicionou-se 25ml de uma solução éter-dimetílico/etanol 2:1 (v/v) e 50ml de água destilada. E como em geral, os extrato lipídicos de microalgas são ricos em pigmentos, a mudança de cor do indicador fenolftaleína não é facilmente percebido, deste modo foi necessário o auxílio de um pHmetro. A célula do pHmetro foi inserida dentro do Becker durante titulação, que ocorreu sob forte agitação magnética. O índice de acidez é calculado pela equação 3. A determinação foi realizada em duplicata.

$$IA = (V - B) \times C \times 5,61 / m \quad (3)$$

Onde IA é o índice de acidez (mg KOH/g), V é o volume de solução de hidróxido de sódio gasto na titulação (ml), B é o volume de solução de hidróxido de sódio gasto na determinação do valor em branco (ml), C é a concentração de hidróxido de sódio (mol/litro), 5,61 é o fator de conversão de hidróxido de sódio para hidróxido de potássio, e m é o valor da massa do material lipídico (gramas).

4.7 Análise de FTIR do material lipídico

Os extratos concentrados foram analisados em modo ATR em um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) fabricado pela Shimadzu, modelo IRAffinity-1 acoplado com um módulo PIKE Technologies HATR MIRacle com prisma de ZnSe (Figura 38). Os espectros foram obtidos com varredura de 32 escaneamentos na faixa de 700 a 4000 cm^{-1} com resolução de 4cm^{-1} . Os espectros foram obtidos logo após concentração do ML de todas as extrações realizadas neste trabalho, além de um material extraído na ausência de peróxido de hidrogênio que foi envelhecido em ambiente aberto por durante 4 semanas, exposto a umidade, luz natural e temperatura ambiente.

Figura 36 - Equipamento de FTIR utilizado



Fonte: AUTOR, 2017

4.8 Microscopia óptica da biomassa

As análises foram realizadas com um microscópio da marca Liepzig como ilustra Figura 39, utilizando um aumento de imagem de 400x. A Biomassa analisada foi colocada em lâmina de vidro e dispersada com ajuda de um pincel de 5mm de espessura, após isto adicionou-se duas gotas de glicerina à lâmina e prensou-se com uma lamela de vidro.

Figura 37 - Microscópio óptico utilizado



Fonte: AUTOR, 2016

4.9 Análise de termogravimétrica da biomassa residual

Os ensaios foram realizados em um analisador termogravimétrico e calorimétrico simultâneo da marca TA Instruments, modelo SDTQ600 (Figura 40). Usou-se cerca de 7mg de amostra em um cadinho de alumina, sob ar sintético como gás de purga na vazão de 50ml/min, a razão de aquecimento foi de 20°C/min e a faixa de temperatura foi 25 a 900°C.

Figura 38 - Balança termogravimétrica utilizada



Fonte: AUTOR, 2016

4.10 Transesterificação do material lipídico e tratamento do biodiesel

A reação de transesterificação do MLE foi conduzida pela rota metílica na proporção de 20 mols para 1 mol de triglicérido em catálise básica de 1% (m/m) de hidróxido de sódio, que foi previamente dissolvido em metanol e adicionado à mistura reacional dentro de um balão de fundo redondo e boca esmerilhada encaixada em um condensador sob refrigeração (sistema de refluxo) como ilustra a Figura 41. O meio foi mantido na temperatura de 65°C e agitado magneticamente.

A reação durou por 4 horas, onde se marcou o término reacional como a finalização da agitação magnética e o instantâneo transporte do material reacional para um funil de decantação - seguindo tratamento do biodiesel formado.

Figura 39 - Transesterificação do MLE

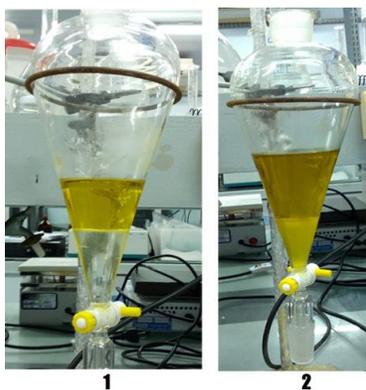


Fonte: AUTOR, 2016

No funil de decantação foi adicionado hexano na proporção de 0,5 volumes para volume total de material reacional (v/v), seguido de decantação por 1 hora e eliminação do meio polar. Após este procedimento foi adicionado água de destilada na proporção de 0,5:1 (v/v), deixou-se quebrar as emulsões formadas pela decantação da fase polar do meio por 30 minutos e daí eliminada do funil – repetiu-se adição de água por mais duas vezes. Por fim adicionou-se uma solução salina saturada na proporção de 1:1 (v/v) e

seguiu-se procedimento idêntico ao supracitado. O aspecto de antes e depois da adição de água é ilustrado na Figura 42.

Figura 40 - Tratamento da adição de água destilada



1- Depois de adição, 2-antes de adição

Fonte: AUTOR, 2016

Transportou-se a fase biodiesel/hexano para um Erlenmeyer de 250ml e adicionou-se sulfato de sódio seco para a eliminação de água no meio, deixou-se em repouso por uma hora seguida por uma filtração simples e concentração do biodiesel no rota-evaporador ilustrado na Figura 36.

4.11 Análise do biodiesel via GC-MS

As amostras foram diluídas à concentração de 400ppm em solvente hexano próprio para fins espectroscópicos e foram analisadas em um cromatógrafo a gás Thermo Scientific modelo FOCUS GC acoplado a espectrômetro de massas ISQ II (Figura 43), com coluna VF-5MS 30m x 0,25mm x 0,25mm. A rampa de aquecimento foi semelhante a utilizada por (SILVA; CORAZZA, 2014) que foi temperatura inicial do forno a 80°C, mantido por 1minuto e aquecido a 150°C numa taxa de 10°C/min, depois novamente aquecido a 200°C numa taxa de 5°C/min e por fim aquecido a 280°C na mesma taxa de aquecimento.

O gás de arraste utilizado foi hélio sob vazão de 1ml/minuto. Injeção split 10:1 com temperatura do forno de 315°C.

Figura 41- GC-MS utilizado



Fonte: AUTOR, 2016

4.11.1 Método de triangulação na análise quantitativa de GC

Os picos cromatográficos foram integrados pelo método da triangulação, que consiste em aproximar as curvas gaussianas do cromatograma para triângulos isósceles, calculando sua área pela usando a equação matemática 4 assim como descreve (VALENTE et al., 2003), onde A é área do triângulo, H é altura e W é a base do triângulo.

$$A = \frac{1}{2} H \cdot W \quad (4)$$

Para cada área das bandas foi atribuídas uma percentagem em relação à área total integrada, utilizando a equação 5, desta forma atribui-se a composição lipídica aproximada do biodiesel injetado no cromatógrafo. Onde, C é composição em

percentagem da banda no cromatograma, A_{tri} é a área do triângulo da banda e A_{tot} é a área total

$$C = \frac{A_{tri}}{A_{tot}} \cdot 100\% \quad (5)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

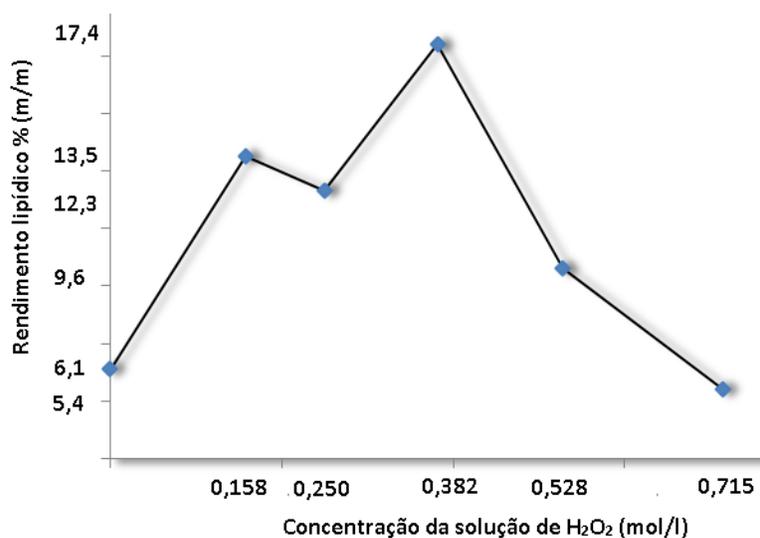
5.1 Rendimentos das extrações

A Figura 44 ilustra os rendimentos mássicos obtidos. Nota-se que na ausência do método de rompimento de parede celular proposto neste trabalho, o rendimento foi mínimo, porém ao aplicar a concentração de 0,382M de H₂O₂ na biomassa crua, o rendimento foi aumentado em 2,9 vezes, saltando de 6,1 para 17,4%. Tal dado, juntamente com as análises de microscopia óptica e termogravimetria comprovam a eficiência do peróxido de hidrogênio em romper a parede celular da microalga estudada.

Contudo ao elevar a concentração de 0,382 para 0,528 e 0,715M os rendimentos lipídicos caem bruscamente para 9,6 e 5,4%. O mesmo fenômeno foi relatado por Steriti (2014), onde em estudo de rompimento da parede celular da microalga *Chlorella vulgaris*, em que após a concentração de 0,29 até 1,4M de H₂O₂ se observou uma queda acentuada dos rendimentos lipídicos de 9,4 para 7,9%. Isto pode estar relacionado ao aumento do poder oxidativo da solução que se torna menos seletiva à parede celular e passa a degradar o material lipídico extraído, levando à formação de produtos de oxidação, como cetonas, ácidos carboxílicos e aldeídos (PULLEN; SAEED, 2012) que são eliminados no processo de lavagem do extrato no processo de purificação e consecutivamente diminuem o rendimento da extração.

Em comparação ao trabalho de Steriti nota-se grande semelhança na concentração de peróxido de hidrogênio mais eficiente que foi de 0,29 mol/l para *Chlorella vulgaris*, extraíndo 9,24% de lipídios apolares, enquanto neste trabalho com o gênero *Chlamydomonas sp.*, obteve-se um rendimento superior, inclusive até em relação ao trabalho de Lee (2010), onde se obteve apenas 8,8% de rendimento em uma extração de lipídios polares e apolares numa adaptação do método Bligh *and* Dyer submetida à sonicação.

Figura 44 - Variação do rendimento em função da concentração de H₂O₂



Fonte: AUTOR, 2017

Quando os valores obtidos após rompimento oxidativo da parede celular da microalga estudada neste trabalho são comparados aos da literatura na Tabela 13, nota-se que entre as extrações que usaram solventes apolares, como hexano, gás carbônico supercrítico e acetato de etila/hexano, o uso de peróxido de hidrogênio representou um ganho significativo de rendimento para a *Chlamydomonas sp.* (b). Todavia em termos numéricos ainda não é competitiva com técnicas extrativas que utilizam solventes polares, principalmente com a metodologia *Bligh and Dyer* desenvolvida em 1959 inicialmente para extração de óleos de peixe (BLIGH; DYER, 1959), que consiste no uso de clorofórmio e metanol (2:1, v/v) e atualmente ainda é bastante utilizada nas extrações de lipídios de microalga (CHENG *et al.*, 2011).

Embora o método *Bligh and Dyer* seja bastante eficiente na obtenção de bons rendimentos, ele não é indicado para extrair lipídios para fins transesterificáveis, pois a metodologia é pouco seletiva e extrai tanto lipídios apolares (desejáveis à produção de biodiesel) quanto os polares e ainda é capaz de carrear contaminantes como açúcares, aminoácidos, sais e, pigmentos e proteínas hidrofílicas (MATA *et al.*, 2010).

Tabela 12 Comparação entre rendimento lipídicos obtidos na literatura

Microalga	Rendimento lipídico % (m/m)	Solvente utilizado na extração/método	Referência
<i>Chlamydomonas sp.</i> (a)	<u>6,1</u>	Hexano	(AUTOR, 2016)
<i>Chlamydomonas sp.</i> (b)	<u>17,4</u>	Hexano	(AUTOR, 2016)
<i>Botryococcus</i>	8,8	Bligh and Dyer	(LEE et al., 2010b)
<i>Cheatoceiros sp.</i>	31 (aproximado)	Bligh and Dyer	(CHEIRSILP; TORPEE, 2012a)
<i>Chlorella minutissima</i>	15,5	Hexano	(NETO et al., 2013)
<i>Chlorella sp.</i>	13 (aproximado)	Bligh and Dyer	(CHEIRSILP; TORPEE, 2012b)
<i>Chlorella vulgaris</i>	9,2	Hexano	(STERITI et al., 2014)
<i>Nannochloropsis sp.</i>	28 (aproximado)	Bligh and Dyer	(CHEIRSILP; TORPEE, 2012b)
<i>Nostoc sp.</i>	15	Bligh and Dyer	(PRABAKARAN, 2011)
<i>Pavlov sp.</i>	44,7	Acetato de etila/Metanol (2:1)	(CHENG et al., 2011b)
<i>Pavlov sp.</i>	13,5	Acetato de etila/Hexano (2:1)	(CHENG et al., 2011b)
<i>Pavlov sp.</i>	10,4	CO ₂ supercrítico	(CHENG et al., 2011b)
<i>Scenedesmus sp</i>	>10	Bligh and Dyer	(LEE et al., 2010b)
<i>Spirogyra sp.</i>	4	Bligh and Dyer	(PRABAKARAN, 2011)

Fonte: AUTOR, 2017

5.2 Rompimento e degradação da parede celular

O aspecto físico da biomassa residual (Figura 44) é um indício claro que ocorreram alterações na estrutura celular das microalgas em todas as extrações. Percebe-se que após a agitação magnética e ação do solvente n-hexano que a biomassa 2 obtém um tom de verde mais claro em relação a biomassa 1, o aspecto físico também muda, formando uma torta de biomassa envolvida em ambiente aquoso.

Figura 42 - Aspecto da biomassa antes e depois da extração



1- Crua e liofilizada, 2-Após extração na ausência de H_2O_2 , 3- Após extração na presença de H_2O_2

Fonte: AUTOR, 2017

Durante o contato da biomassa crua com a solução oxidante, nota-se que logo após a adição de peróxido de hidrogênio à extração, é formado uma espuma esverdeada (Figura 45), que é o resultado da decomposição de H_2O_2 em água (H_2O) e gás oxigênio (O_2) além da oxidação do material biológico microalgal, principalmente a parede celular (STERITI *et al.*, 2014). E a biomassa residual gerada após ação oxidativa é totalmente distinta da biomassa 1 e 2, pois toma um aspecto mais gelatinoso devido à maior presença de água. Tal biomassa não possui uma forma física definida, sugerindo que ocorreu uma degradação química, transformando as células originalmente íntegra em apenas fragmentos menores que são percebidos na Figura 46 na seção 5.2.1.

Figura 43 - Formação de espuma após adição de H₂O₂ às microalgas

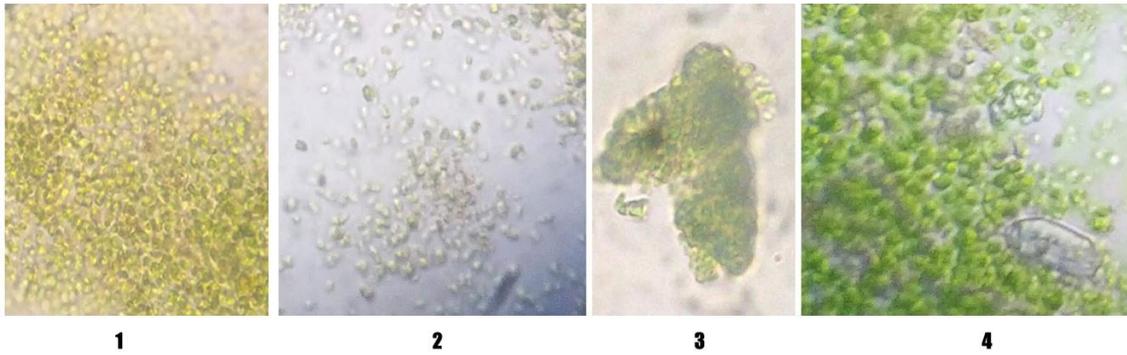


Fonte: AUTOR, 2017

5.2.1 Microscopia óptica da biomassa crua e residual

As análises de microscopia óptica (Figura 46) mostraram claramente que a biomassas obtidas após oxidação com e sem presença de H₂O₂ (1, 2 e 3) tiveram seus pigmentos naturais quimicamente alterados em relação às microalgas antes das extrações (4) que apresentou uma tonalidade mais verde. Nas fotos 2 e 3 (Figura 46) percebe-se na biomassa residual, após ação oxidante que formato das células está totalmente distinto da foto 4, sendo formado apenas por células vazias e aglomerações de fragmentos celulares, o que também foi percebido nos estudos de rompimento oxidativo da parede celular da microalga *Chlorella Vulgaris* por Steriti, 2014, indicativo o sucesso do método para permitir a extração do conteúdo citoplasmático (STERITI *et al.*, 2014) na Figura 47. Na Figura 46-1 ao contrário da 46-2 e 46-3 ainda se percebe o formato original das células de microalgas em meio aos fragmentos gerados, ou seja, apenas o solvente n-hexano e a agitação não foram capazes de romper integralmente à parede celular.

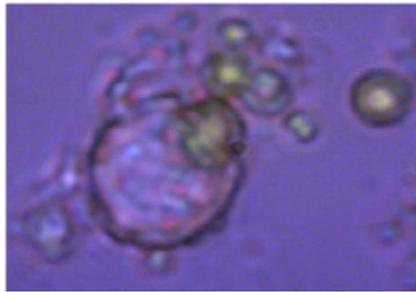
Figura 44 - Microscopia da biomassa



1- Após extração sem H_2O_2 , 2,3 – Após extração com H_2O_2 , 4- Microalga crua

Fonte: AUTOR, 2016

Figura 45 - Parede celular rompida

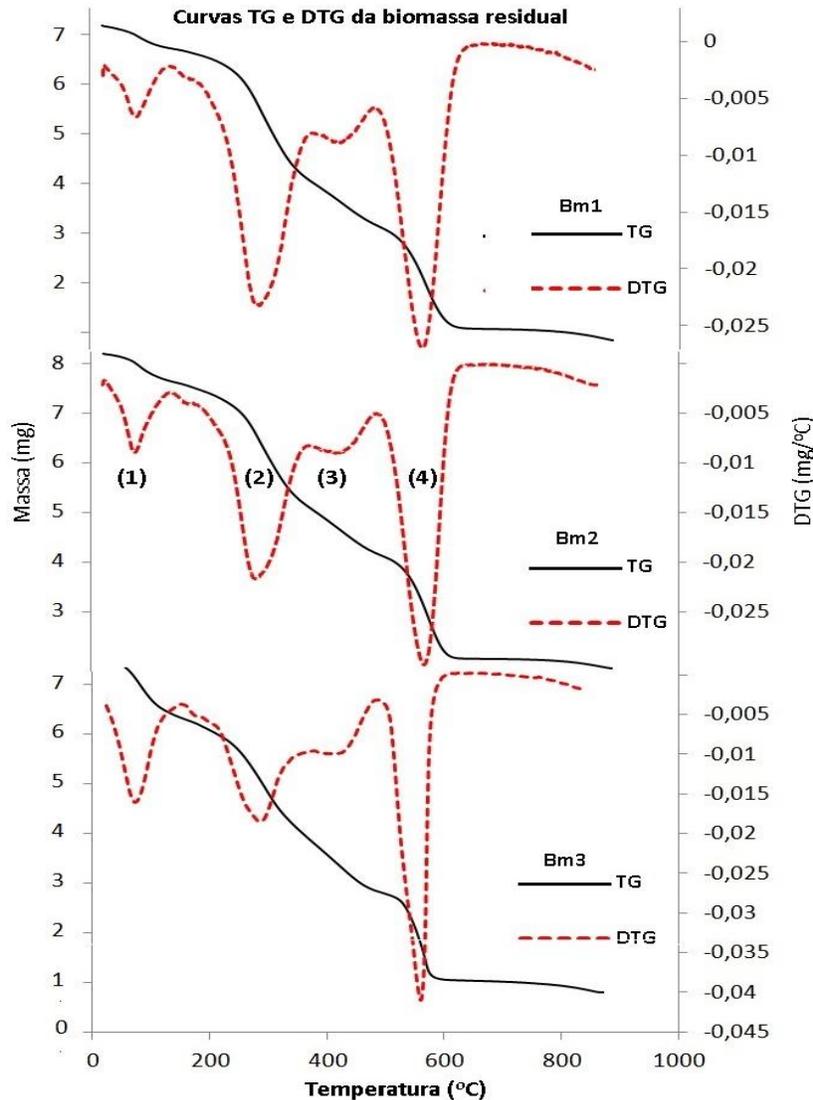


Fonte: STERITI, 2014

5.2.2 Termogravimetria da biomassa crua e residual

As análises termogravimétricas de TG e DTG são mostradas na Figura 48, onde Bm1 é a curva para a biomassa crua, isto é, sem passar por nenhum processo de extração, Bm2 é a curva para a biomassa residual da extração sem contato com H_2O_2 e Bm3 é a curva para a biomassa residual da extração que foi aplicado o método de rompimento oxidativo utilizando a concentração de 0,715M de H_2O_2 .

Figura 46- Curvas TG e DTG da biomassa residual



Fonte: AUTOR, 2017

A curva DTG aponta para quatro grandes eventos térmicos que ocorreram para todas a biomassas analisadas, o primeiro (1) entre 30 a 150 °C trata-se da evaporação de umidade na amostra e evaporação de solvente residual (GOMES *et al.*, 2015). O segundo evento (2) entre 150 a 350°C trata-se da decomposição de carboidratos simples (GAI *et al.*, 2015), como amido (CARBINATTO *et al.*, 2012), pectina (CARBINATTO *et al.*, 2012), carboidratos complexos da biomassa lignocelulósica (i.e. celulose e hemicelulose) e lignina (LÓPEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2013) além de proteínas e glicoproteínas (CAMPANELLA *et al.*,

2012). O terceiro evento (3) entre 350 e 520 °C trata-se a decomposição da fração lipídica (GARCIA *et al.*, 2007) e por fim no quarto evento (4) entre 550 a 650 °C é atribuído à decomposição apenas da lignina, que ocorre em dois eventos (LÓPEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2013). A Tabela 12 resume as principais moléculas presentes na biomassa com suas faixas de temperatura em que se decompõem na análise térmica em presença de gás oxigênio.

Tabela 9 - Principais substâncias presentes na análise térmica da microalga analisada

Faixa de temperatura (°C)	Principais componentes	Referências
30-150	Água	(GOMES <i>et al.</i> , 2015)
	Solventes residuais	(GOMES <i>et al.</i> , 2015)
150-350	Carboidratos simples	(GAI <i>et al.</i> , 2015)
	Celulose	(LÓPEZ-GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2013)
	Lignina	(LÓPEZ-GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2013)
	Hemicelulose	(LÓPEZ-GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2013)
	Amido	(CARBINATTO <i>et al.</i> , 2012)
	Pectina	(CARBINATTO <i>et al.</i> , 2012)
	Proteínas e glicoproteínas	(CAMPANELLA <i>et al.</i> , 2012)
350-520	Lipídeos	(GARCIA <i>et al.</i> , 2007)
550-650	Lignina	(LÓPEZ-GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2013)

Fonte: AUTOR, 2017

A Tabela 13 mostra as perdas de massa das biomassas analisadas que se correlaciona a Figura 49 permitindo uma comparação visual das curvas DTA e DTA. Em todas as amostras analisadas foi inevitável a presença de umidade (evento 1), pois faz

parte da natureza dos polissacarídeos a boa interação com a água (IQBAL *et al.*, 2013), contudo em Bm3 a sua presença aumentou em 3,4 vezes em relação a Bm1, fato justificável, já que ocorreu o contato com a solução aquosa de peróxido de hidrogênio. No segundo evento percebe-se uma acentuada queda da composição da composição mássica de Bm1 a Bm3, isto é, quanto mais agressivo é o rompimento da PC mais polissacarídeos são degradados e perdidos, principalmente celulose e hemicelulose ao longo do processo extrativo.

O Terceiro evento tem suas massas diminuídas de acordo com a eficiência da extração de lipídeos, isto é, Bm2 e Bm3 em relação a Bm1 possuem menos lipídeos, pois passaram por processo de extração lipídica. Já o quarto evento é relativo à presença de lignina, onde sua composição em massa é diminuída em Bm3. O que sobra após as análises térmicas são apenas materiais inorgânicos presentes na microalga como os sais minerais (GOMES *et al.*, 2015).

Tabela 10 Composição mássica dos eventos termogravimétricos (%)

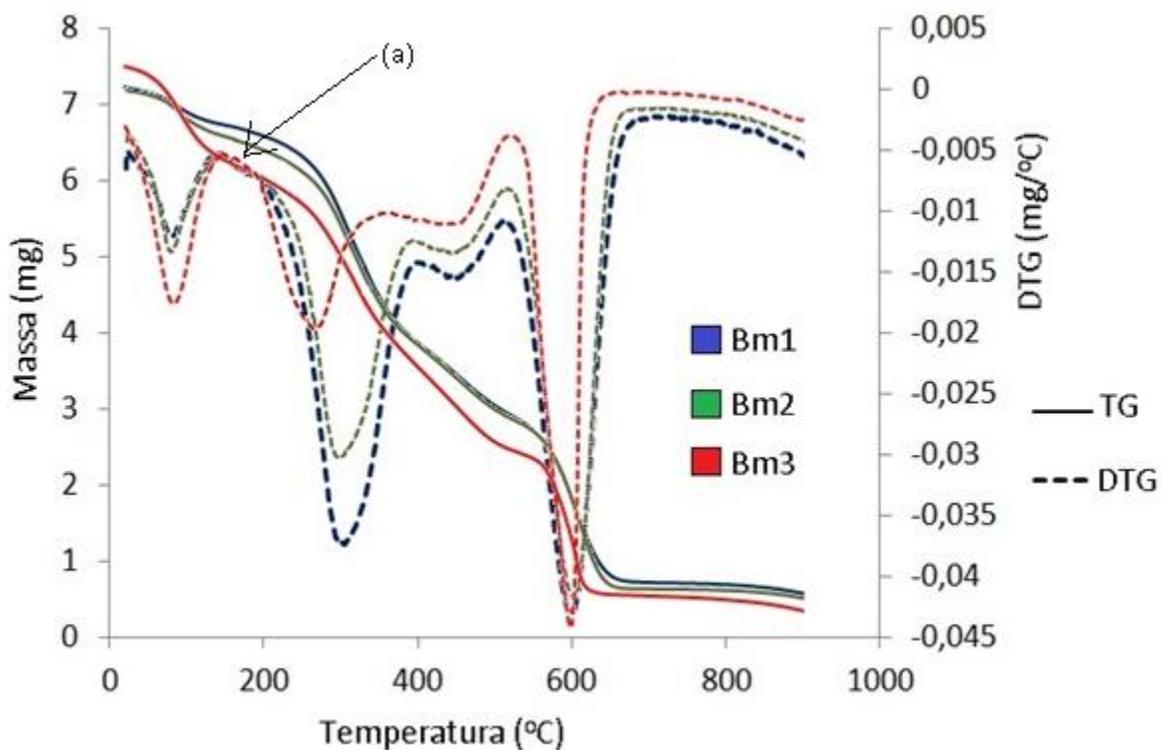
Biomassa	Evento 1	Evento 2	Evento 3	Evento 4	Resíduos
Bm1	6,5	38,9	12,0	28,7	13,9
Bm2	7,2	34,9	10,7	29,5	17,7
Bm3	22,3	30,5	8,6	26,4	12,2

Fonte: AUTOR, 2017

Ainda sobre a tabela 13, nota-se que lignina está presente em torno de 29% da biomassa crua (Bm1), este valor é semelhante ao encontrado na Bm2, indicando que os solventes orgânicos foram ineficientes para quebrar as ligações e interações da lignina, e que devido às propriedades químicas da molécula que garantem alta rigidez e impenetrabilidade à parede celular, o que naturalmente dificulta a entrada de solventes orgânicos na célula, o que explica o baixo rendimento extrativo obtido. Por outro lado,

Bm3 apresentou uma pequena diminuição na presença de lignina, indicando que o uso de peróxido de hidrogênio promoveu o desprendimento de fragmentos de lignina durante o processo extrativo o que facilitou a entrada de solvente orgânico.

Figura 47 - Sobreposição das curvas TG e DTG



Fonte: AUTOR, 2017

A Tabela 14 ilustra o decaimento de massa máximo obtido pela curva DTG. Percebe-se que a biomassa Bm3 (que sofreu rompimento oxidativo da PC) apresentou todos eventos ocorrendo em temperaturas menores, principalmente os eventos relativos a decomposição de carboidratos (evento 2) que fica mais evidenciado na Figura 49-a, onde todas as curvas estão sobrepostas. Isto representa a diminuição da estabilidade térmica destes carboidratos, que é consequência da agressão causada pelo efeito oxidativo da solução de peróxido de hidrogênio na estrutura polimérica destes polissacarídeos (IQBAL *et al.*, 2013).

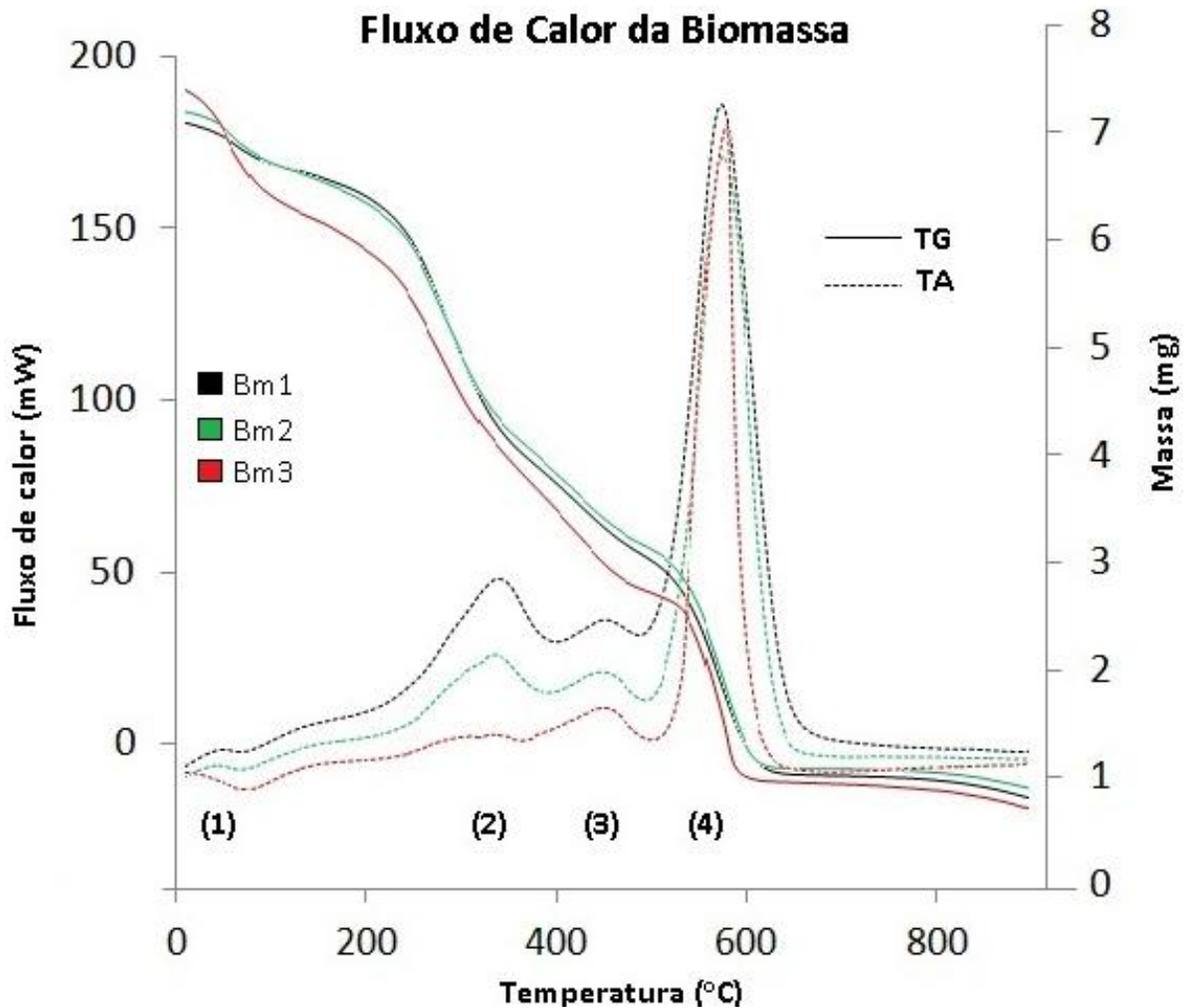
Tabela 11 Temperatura de máximo decaimento mássico (°C)

Biomassa	Evento 1	Evento 2	Evento 3	Evento 4
Bm1	78,8	283,0	421,3	594,8
Bm2	79,2	282,4	420,2	589,2
Bm3	76,3	278,3	421,1	578,5

Fonte: AUTOR, 2017

A curva DTA (Figura 50) demonstra que apenas o primeiro evento tem um caráter endotérmico (curva côncava) o que é esperado, pois tal evento ocorre pela absorção de calor pela água e solventes ainda presentes na amostra que são volatilizados (GOMES *et al.*, 2015). Nos eventos exotérmicos que acontecem a partir do segundo evento a principal forma de liberação de energia ocorre por reações de combustão do material analisado. E percebe-se claramente que os decaimentos 2 e 4 da amostra crua (Bm1) liberam mais calor que nos eventos da Bm2 e Bm3. A integração da área da curva TA do evento 2 mostra Bm2 e Bm3 liberando 29 e 68%, respectivamente, menos calor que em Bm1, já no terceiro evento, estes valores para Bm2 e Bm3 diminuem, respectivamente, 12 e 42%.

Figura 48 - Fluxo de calor da biomassa



Fonte: AUTOR, 2017

Além da diminuição do calor emitido, em todos os eventos as curvas Bm2 e principalmente Bm3 diminuem o fluxo máximo de calor como ressalva a Tabela 15. No segundo evento o fluxo máximo de calor em Bm1 cai de 49 mW para 7,2 mW em Bm3, isto é, uma queda de 85%, que é bem perceptível na Figura 50. Tal fenômeno é mais um indicativo que o processo de extração agrediu a composição da material que reveste a parede celular e que ação oxidativa empregada teve um significativo efeito de degradação (GARCIA *et al.*, 2007), que é confirmado com a diminuição das temperaturas de máximo decaimento de massa (Tabela 15) no evento 2 em Bm2 e principalmente em Bm3,

apontando para a diminuição da estabilidade térmica destes polissacarídeos (IQBAL *et al.*, 2013).

Porém, ao analisar o quarto evento, relativo à presença de lignina, nota-se que Bm2 emitiu 1,5% menos calor que Bm1, já Bm3 emitiu 7,1% menos calor que Bm1, tais valores são relativamente baixos quando comparados aos valores obtidos para o segundo evento térmico. Isto pode ser explicado pela atividade antioxidante que a lignina exerce para célula (POUTEAU *et al.*, 2003)

Tabela 12 Fluxo máximo de calor dos eventos termogravimétricos (mW)

Biomassa	Evento 1	Evento 2	Evento 3	Evento 4
Bm1	-6,4	49,0	37,9	188,6
Bm2	-10,7	25,5	23,0	185,7
Bm3	-18,6	7,2	13,8	175,2

Fonte: AUTOR, 2017

5.3 Espectros de FTIR

A Figura 51 apresenta os espectros de FTIR dos extratos, envelhecido (EE); com ação oxidante (ECO) com 0,715M de H₂O₂ e sem ação oxidante (ESO). Percebe-se no EE uma absorção (a) alargada e mediana em 3444cm⁻¹, característica do estiramento oxigênio-hidrogênio, que pode ser relacionada tanto para hidroxilas de água presente na amostra, como para hidroxilas de ácidos carboxílicos (incluindo os ácidos graxos livres), além de hidroxilas de peróxidos orgânicos gerados, que em geral na aparecem com muita intensidade em óleos oxidados (GUILLEN; CABO, 2002).

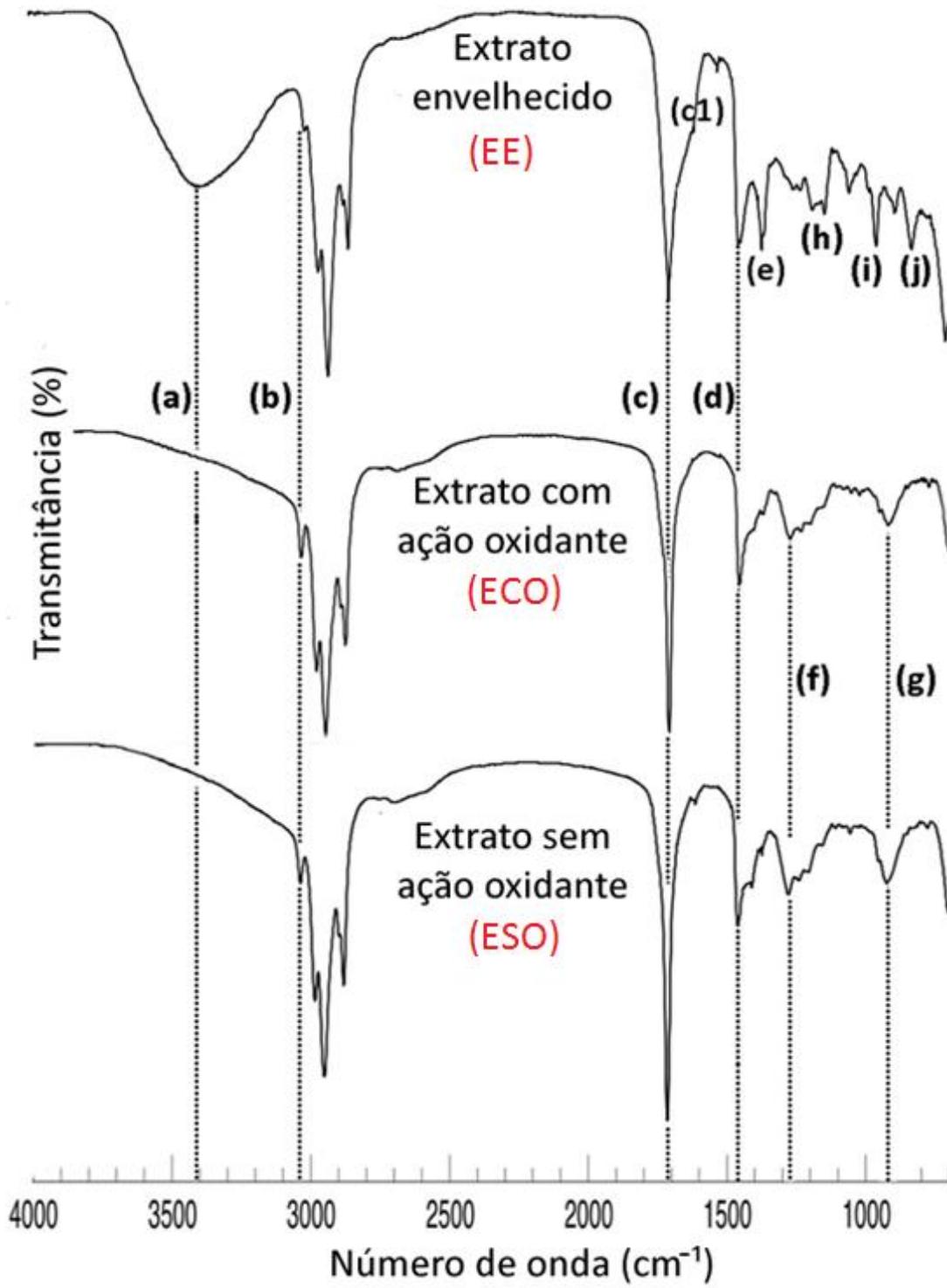
A banda (b), em 3006 cm⁻¹, relacionada ao estiramento H-C=, é atribuída à presença ligações duplas no material lipídico (ROHMAN; MAN, 2010). Nota-se que, no EE,

esta absorção é de menor intensidade relativa quando comparada às presentes em ECO e ESO, e que entre estas praticamente não há diferença visual.

As bandas (c), em 1743cm^{-1} , correspondente ao estiramento da carbonila de éster, aparece em todos os extratos enquanto que a absorção (c1), em 1710cm^{-1} , característica de ácidos carboxílicos e cetonas, está presente apenas em EE. De 1743 e 1710cm^{-1} correspondem ao estiramento da carbonila de éster e aldeídos/cetonas respectivamente, onde os três espectros apresentam a banda (c) e apenas o do EE aparece a banda (c1), comprovando que apenas o EE sofreu maior degradação. Outra grande distinção entre o ECO, ESO e EE está na região *fingerprint*, onde as absorções (e), (h), (i), e (j) aparecem apenas em ECO e ESO. Já em EE aparecem (f) e (g).

Através dos espectros FTIR, percebe-se que existe diferença significativa entre o EE e os outros extratos. Em contrapartida, nota-se forte semelhança no perfil espectral entre o ECO e ESO, indicando que embora a ação oxidativa promova reações indesejáveis no material lipídico (GUILLEN; CABO, 2002), não foi suficientemente forte para degradar totalmente o material de interesse. As principais funções orgânicas se mantiveram intactas, sem grandes alterações que possam ser percebidas qualitativamente pela espectroscopia de infravermelho. Dentre os fatores que possivelmente contribuíram para integridade dos grupos funcionais estão (1) a escolha das concentrações entre 0,158 e 0,715M da solução de peróxido de hidrogênio, que segundo Steriti (2014), trata-se de uma faixa ideal para o rompimento celular e maior eficiência na extração de lipídeos e (2) a presença de antioxidantes naturais no material citoplasmático das células de microalgas (MAADANE *et al.*, 2015) que agiram protegendo os lipídios da ação degradante do peróxido de hidrogênio.

Figura 49 - Espectro de Infravermelho com transformada de Fourier dos extratos



Fonte: AUTOR, 2017

5.4 Aspecto físico do material lipídico

A Figura 52 mostra o aspecto dos extratos obtidos sem e com ação oxidante. Como ilustrado, o material extraído via rompimento oxidativo se tornou mais claro em comparação ao extraído na presença de n-hexano, o que possivelmente foi resultado da oxidação de pigmentos naturalmente presentes na microalga e no extrato (MATA *et al.*, 2010). Tal resultado é semelhante ao obtido por Zagarese (2001) que estudou o efeito da radiação ultravioleta sobre microalgas e relatou que espécies oxidantes, como o H_2O_2 , oxidam moléculas fotossintetizantes, provocando o clareamento da cor dos extratos e, conseqüentemente, impactando na diminuição da absorbância região visível (CARDOSO, 1997).

Figura 50 - Aspecto físico do extrato lipídico



Fonte: AUTOR, 2017

Além disto, tal clareamento do material lipídico pode ser interpretada como uma resposta à presença de H_2O_2 por moléculas corantes, pois em geral, também possuem função antioxidante, tal como o betacaroteno. Esses pigmentos agem se auto-oxidando, inibindo a oxidação de outros materiais extraídos (ZAGARESE *et al.*, 2001). Assim fica claro

que a presença de pigmentos e antioxidantes diminuíram após as extrações com H_2O_2 , deste modo é muito provável que a estabilidade oxidativa do MLE e seus derivados diminuam significativamente sem a adição de antioxidantes sintéticos para compensar estas perdas. Tal efeito pode ser melhor avaliado em estudos futuros.

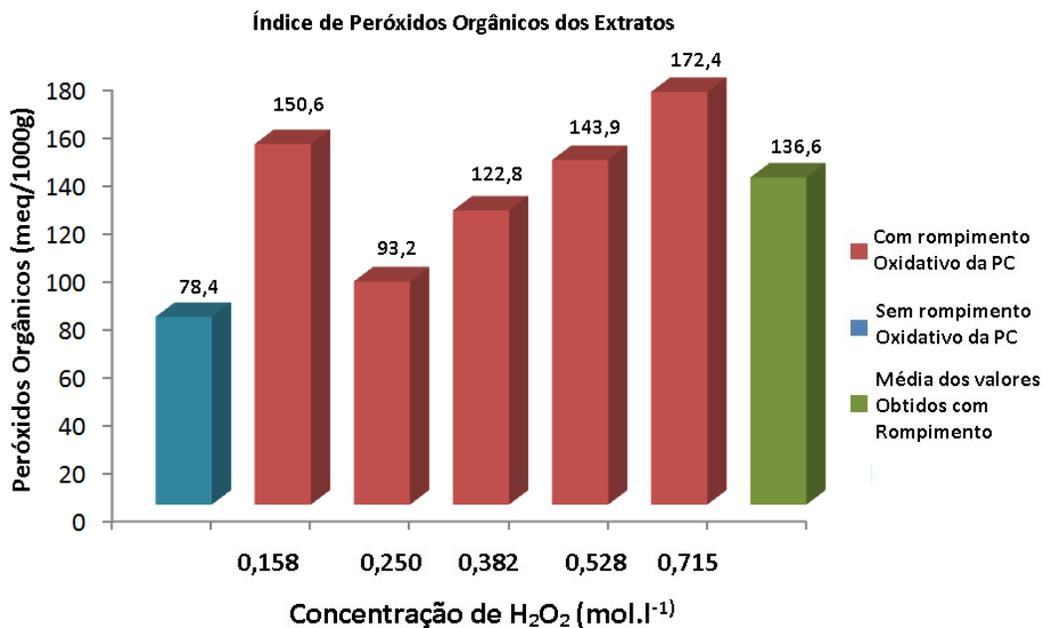
5.5 Índices de peróxidos orgânicos

A Figura 53 expressa os valores do índice peróxidos orgânicos (IPO) dos extratos ECO e ESO. O óleo ESO, ausência de contato com H_2O_2 , foi o apresentou menor índice de peróxidos orgânicos, 78,4 meq/1000 g.

A literatura pouco reporta valores IPO como estudo de avaliação de qualidade de lipídeos de microalga, porém quando o IPO do óleo de oliva comestível refinado é tomado como referência, o valor obtido neste estudo está cerca de 4 vezes acima do máximo permitido pela ANVISA que é de 20 meq/kg. Contudo esta relação cai de 4 para 2,8 ao comparar o IPO da *Chlamydomonas sp.* deste trabalho com o IPO do óleo de bruto (27,28 meq/1000g) recém extraído de polpa da macaúba (matéria-prima promissora para a produção de biodiesel), (AMARAL, 2007).

O acréscimo da concentração de peróxido de hidrogênio aumentou proporcionalmente os índices de peróxido orgânicos dos extratos, partindo de 78,4 para 136,6 meq/kg (média dos IPO do material lipídico obtido via rompimento oxidativo da PC), representando um aumento de 74% do IPO. O que pode ser explicado pelo contato dos lipídeos com a solução oxidante, mas também favorecido pela presença de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) no material lipídico da microalga, que apresentou altos índices de iodo (discutido no subtópico 5.6).

Figura 51 - Índice de peróxidos obtidos



Fonte: AUTOR, 2017

Outros fatores relevantes para o aumento do IPO são exposição à luz durante o processo extrativo e ao aquecimento na evaporação do solvente orgânicos (WIDJAJA *et al.*, 2009). Dentre as concentrações estudadas, o valor de 0,382M de peróxido de hidrogênio, além de apresentar maior eficiência na obtenção de maior rendimento lipídico, provocou no extrato um IPO de 122,8 meq/kg, valor menor que a média de 136,6 meq/kg

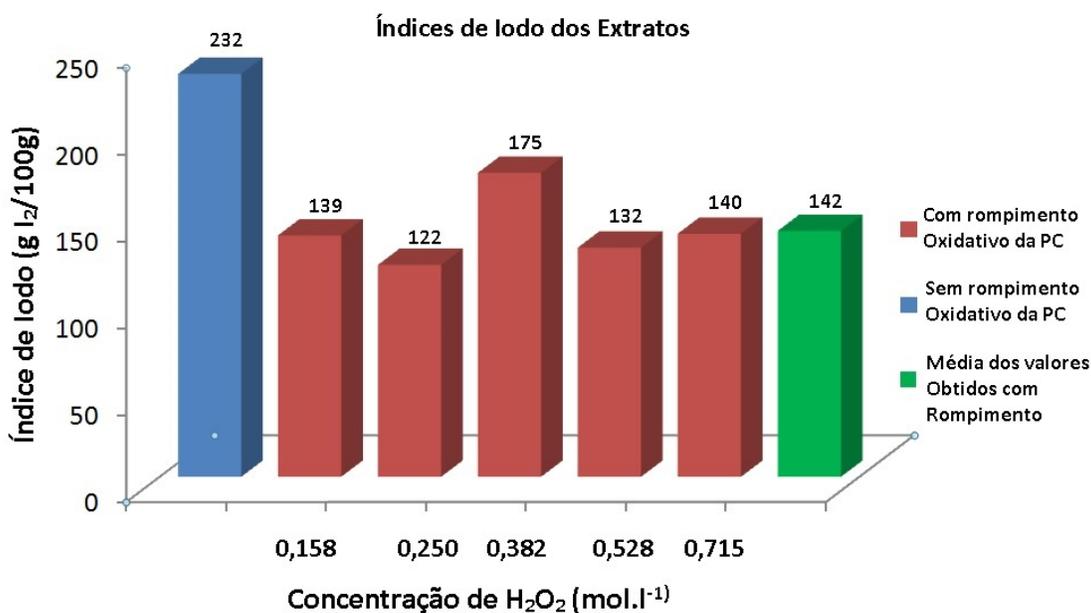
5.6 Índice de iodo

A Figura 54 traz os valores dos índices de iodo obtidos neste trabalho. Percebe-se que o Material extraído é rico em insaturações, calculando-se inicialmente um valor de 232g I₂/100g. Tal índice, embora seja bastante elevado em relação aos óleos vegetais é

condizente com os dados da literatura para microalgas com alto concentração de ácido graxos poli-insaturados como a microalga *Trachydiscus minutus* estudada Samek, *et al.* (2011), que relata um índice de iodo 200g I₂/100g.

Os valores de índice de iodo para os extratos lipídicos obtidos a partir do rompimento oxidativo para parede celular da *Chlamydomonas sp.* foram menores ao da amostra controle, caindo para uma média de 142 I₂/100g, isto é, uma diminuição de 38,8%. Tal fenômeno é explicado pela degradação que dos ácidos graxos insaturados (PULLEN; SAEED, 2012).

Figura 52 - Índices de iodo calculado



Fonte: AUTOR, 2017

A Tabela 17 traz alguns dados da literatura sobre o índice de iodo de algumas microalgas, nota-se que muitas delas naturalmente já possuem baixos índices de iodo, isto devido às variações da composição lipídica de cada gênero ou espécie.

Tabela 13 - Índice de iodo de extratos de microalga encontrados na literatura

Microalga	Índice iodo (g I ₂ /100g)	Referência
<i>Botryococcus sudeticus</i>	78	(SAMEK et al., 2011)
<i>Chlamydomonas sp.</i>	105	(SAMEK et al., 2011)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	121	(GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009)
<i>Meyrella sp</i>	77,7	(ASHOKKUMAR; VARALAKSHMI, 2015)
<i>Nannochloropsis sp</i>	52	(GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009)
<i>Neochloris oleabundans</i>	102	(GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	69	(GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009)
<i>Scenedesmus rubescens</i>	104,9	(LIN et al., 2012)
<i>Trachydiscus minutus</i>	200	(SAMEK et al., 2011)

Fonte: AUTOR, 2017

Porém SAMEK, *et al.* (2011) determinou o índice de iodo do gênero *Chlamydomonas sp.* o mesmo estudado neste trabalho, onde obteve o índice de iodo cerca de duas vezes menor, um indicativo de perfis lipídicos distintos, o que pode ser explicado por variações das espécies estudadas e/ou condições de cultivo diferentes (MATA *et al.*, 2010).

Dentre as microalgas apresentadas na Tabela 17, apenas a *Trachydiscus minutus* apresentou um índice de iodo semelhante à microalga *chlamydomonas sp.* estudada neste trabalho. Isto ocorre porque o perfil lipídico da *Trachydiscus minutus*, apresentado na Tabela 18 é bastante semelhante ao perfil da *Chlamydomonas sp.* que é discutido no tópico 5.9. A Figura 55 mostra a semelhança no perfil lipídico entre essas duas microalgas.

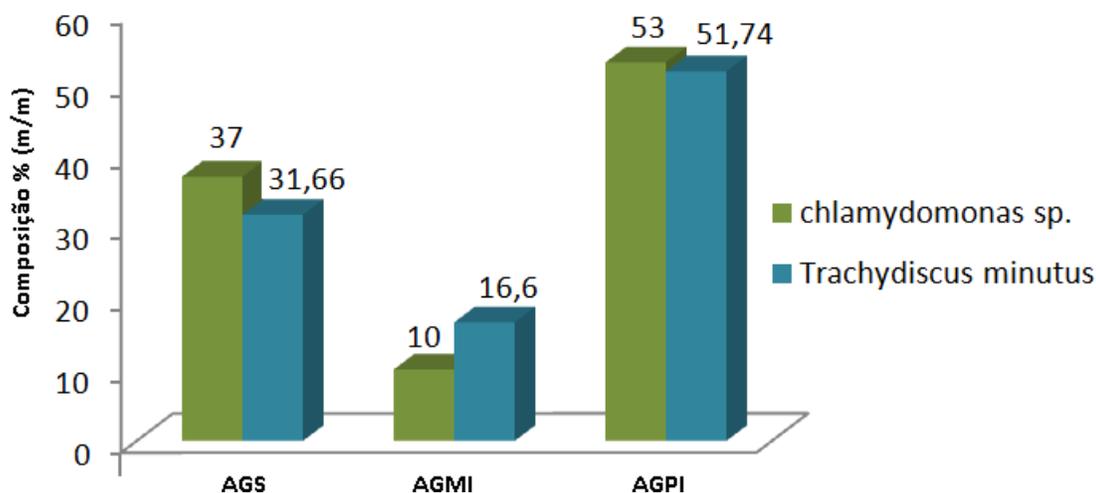
Tabela 14 - Análise de GC-MS do perfil lipídico da *Trachydiscus minutus*

Ácido Graxo	Abundância % (m/m)
C14:0	5,13
C16:1	7,48
C16:0	9,90
C18:2	12,95
C18:1	9,12
C18:0	1,99
C20:4	8,54
C20:5	30,25
C21:0	11,58
C23:0	3,06
Ácidos Graxos Saturados (AGS)	31,66
Ácidos Graxos monoinsaturados (AGMI)	16,6
Ácidos Graxos poli-insaturados (AGPI)	51,74
Total	100,00

Fonte: SAMEK (adaptado), 2011

Como já foi discutido na seção 3.7.3, um alto valor do índice de iodo é indesejável à produção de biodiesel. Neste sentido Lin et al, 2012, estudou como concentração de ferro II no meio de cultivo influencia no perfil lipídico da microalga *Scenedesmus rubescens*, notando-se uma diminuição de ácidos graxos mono e poli-insaturados em contra posição ao aumento dos saturados, o que consequentemente refletiu na diminuição do índice de iodo, de 83,5 para 79,2 I₂/100g, ao aumentar a concentração de Fe²⁺ 0,05 para 20,0 mg/l. Tal estudo é um possível caminho para controle do índice de iodo da microalga estudada neste trabalho.

Figura 53 – Semelhança do perfil lipídico entre a microalga estudada e a *Trachydiscus minutus*



Fonte: AUTOR, 2017

5.7 Índices de acidez

A Tabela 19 traz os valores do índice de acidez para os extratos lipídicos. Nota-se que o rompimento oxidativo da parede celular torna o material cerca de 1,64 vezes mais ácido, saltando de 2,65 para 4,34 mg KOH.g⁻¹ (média da acidez dos extratos obtidos via rompimento oxidativo).

O índice de acidez de todos os extratos está dentro do valor permitido pela ANP para um óleo transesterificável, que é de 0,5 mg KOH.g⁻¹. Contudo, esta determinação foi elaborada inicialmente para óleos vegetais transesterificáveis que naturalmente possuem baixos valores de ácidos graxos livres (AGL) e consecutivamente uma acidez menor (FRANCO *et al.*, 2013).

A elevação da acidez após o rompimento celular é um indicativo que a técnica de rompimento oxidativo não é seletiva apenas à parede celular. Assim, inevitavelmente alguns lipídios presentes no citoplasma da célula microalgal entraram em contato com a

solução de peróxido de hidrogênio e foram degradados, formando subprodutos oxidativos, dentre eles, os ácidos carboxílicos. Porém a presença destes ácidos não foi significativamente grande para o surgimento da banda em 3444 cm^{-1} no espectro de FTIR (seção 5.3).

Tabela 15 Índice de acidez obtidos

Concentração de peróxido de hidrogênio (mol/l)	Índice de acidez (mg KOH.g⁻¹)
Ausência	2,65*
0,158	3,11
0,250	5,03
0,382	4,63
0,528	5,45
0,715	3,47
Média dos índices obtidos via rompimento oxidativo (a)	4,34

*Este valor não entra no cálculo da média (a)

Fonte: AUTOR, 2017

Contudo, quando são comparados os valores obtidos neste trabalho com os valores reportados na literatura para as microalgas mais comuns na Tabela 20, percebe-se que o aumento da acidez de 2,65 para 4,34 mg KOH.g⁻¹ provocado pelo rompimento oxidativo ainda está longe da média dos valores de acidez da literatura que é de 14,9 mg KOH.g⁻¹ para extratos lipídicos obtidos por métodos convencionais de extração com solventes orgânicos, como hexano, etanol e o método Bligh and Dyer (clorofórmio/metanol - 2:1 v/v), todos sem uso de nenhum método de rompimento oxidativo da parede celular.

Tabela 16 Comparação dos índices de acidez obtidos com os da literatura

Microalga	Solvente de extração	Índice acidez (mg KOH.g ⁻¹)	Referência
<i>Chlmydomonas</i> <i>sp</i> ^(A)	Hexano (C ₆ H ₁₄)	2,65	(AUTOR, 2017)
<i>Chlmydomonas</i> <i>sp</i> ^(B)	Hexano (C ₆ H ₁₄)	5,45	(AUTOR, 2017)
<i>Chlorella</i> <i>protothecoides</i>	Hexano (C ₆ H ₁₄)	8,97	(MIAO; WU, 2006)
<i>Chlorella sp.</i>	Hexano (C ₆ H ₁₄)	10,21	(EHIMEN <i>et al.</i> , 2010)
<i>Chlorella</i> <i>Vulgaris</i>	Clorofórmio (CHCl ₃)/Metanol (CH ₃ OH) (2:1 v/v)	24,67	(KUMAR <i>et al.</i> , 2016)
<i>Scenedesmus</i> <i>accuminatus</i>	Hexano (C ₆ H ₁₄)	6,8	(BRANCO; TREVISAN, 2014)
<i>Scenedesmus</i> <i>sp.</i>	Clorofórmio (CHCl ₃)/Etanol (CH ₃ CH ₂ OH) (1:1 v/v)	29,75	(GULDHE <i>et al.</i> , 2014)
<i>Scenedesmus</i> <i>sp.</i>	Etanol (CH ₃ CH ₂ OH)	9,1	(CHEN <i>et al.</i> , 2012)
Média de índice de acidez obtido na literatura pesquisada*		14,9	

(A) Obtida sem rompimento oxidativo da parede celular

(B) Obtida com rompimento oxidativo da parede celular sob 0,528 M de H₂O₂

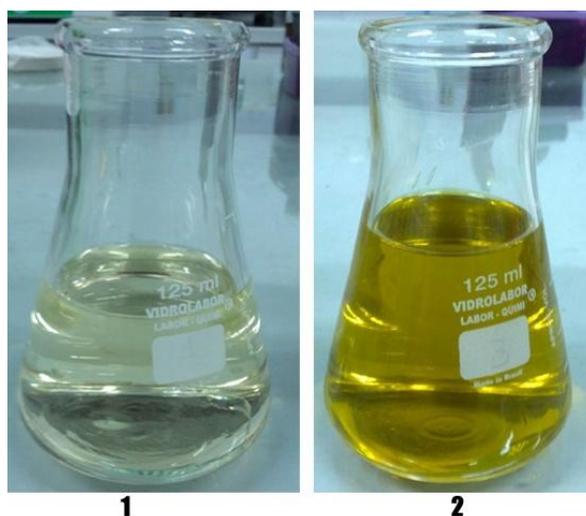
*Os valores de (A) e (B) não entram neste cálculo de média

Fonte: AUTOR, 2017

5.8 Aspecto físico do biodiesel gerado

Após a reação notou-se que o produto transesterificado do MLE com ação oxidante tem coloração mais clara em comparação ao outro biodiesel formado, como ilustra a Figura 56 apresentando uma diferença de cor bem maior do que entre extratos com e sem contato com H_2O_2 . Isso sugere os pigmentos naturalmente presentes no material tiveram suas estruturas alteradas pelo ambiente oxidativo e, ainda que, o aquecimento promovido durante a transesterificação provocou uma aceleração degradativa, sugerindo que o biodiesel do MLE na presença de peróxido de hidrogênio perdeu pigmentos que, em sua maioria, atuam como antioxidante naturais.

Figura 54 - Aspecto físico do biodiesel obtido



1-Biodiesel com ação oxidante, 2- Biodiesel sem ação oxidante

Fonte: AUTOR, 2017

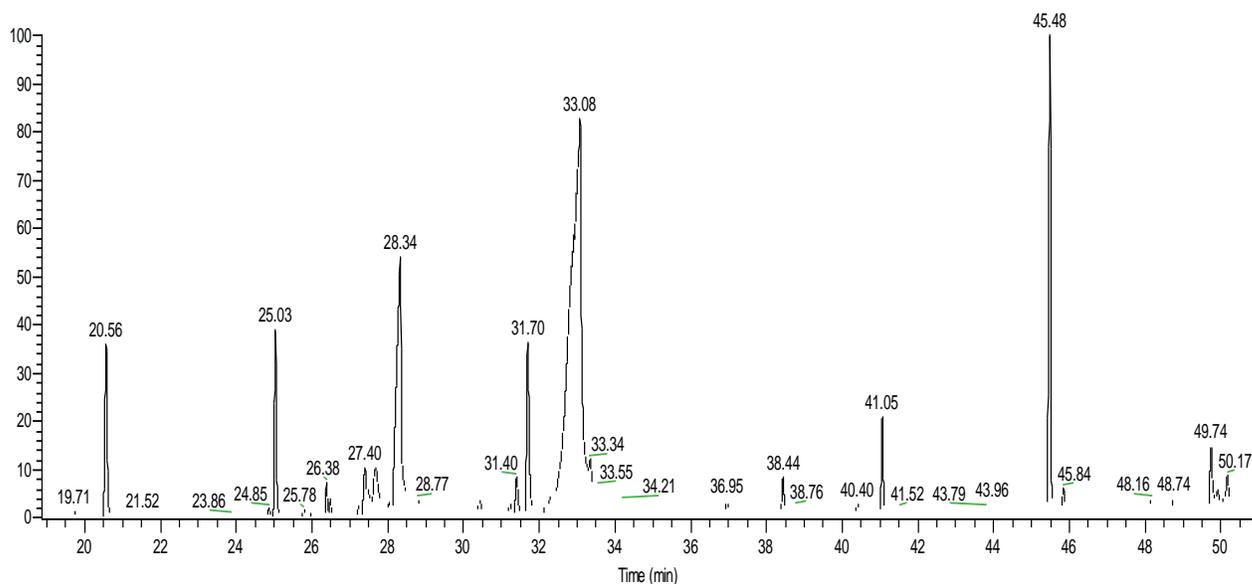
Porém o aspecto biodiesel sintetizado a partir do material lipídico obtido com e sem rompimento da parede celular microalgal segue fielmente a recomendação da norma 07/2008 da ANP, que preza por um combustível límpido e sem impurezas aparentes (LÔBO *et al.*, 2009).

5.9 Perfil lipídico do biodiesel via CG-MS e índices conversão

Os cromatogramas do biodiesel do material lipídico extraído (MLE) sem ação oxidante (B0) é dado na Figura 57 e o biodiesel do MLE com 0,715M de H₂O₂ (B1) dado na Figura 58. Os ésteres metílicos identificados pela biblioteca do espectrômetro de massa (MS), tempo de retenção (TR) em minutos, abundância no biodiesel (AB) em percentagem e semelhança entre espectros de massa (SEE) obtidos com o padrão de referência interno em percentagem e suas respectivas fórmulas moleculares (FM) são dados na Tabela 21.

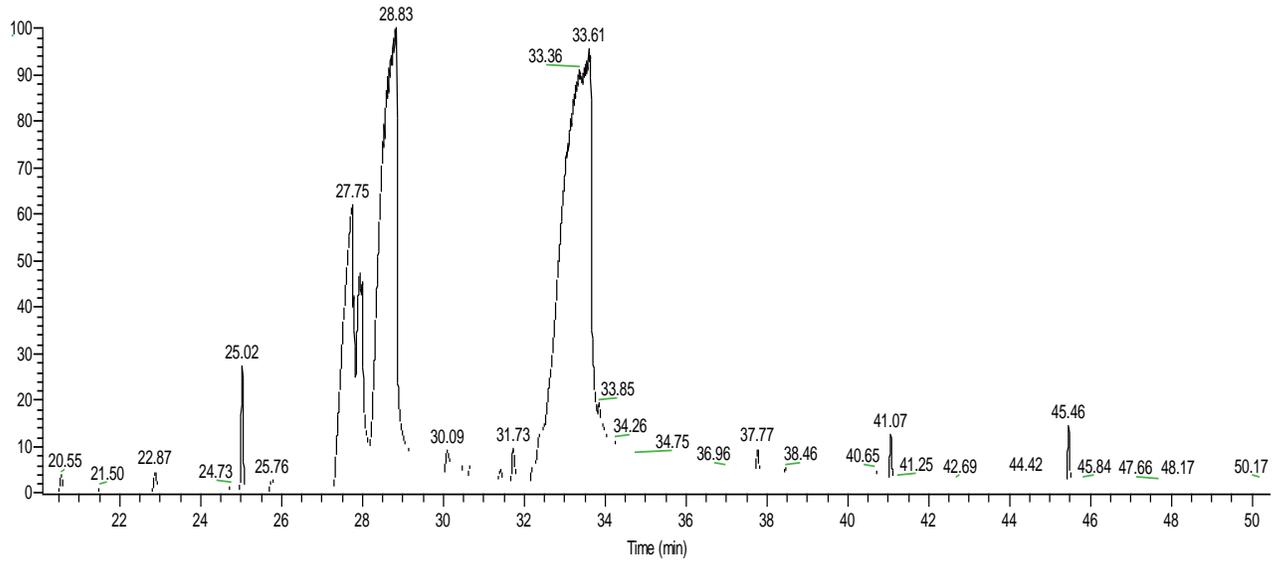
A Figura 59 ilustra o espectro de massa obtido na identificação do éster metílico do ácido palmítico (hexadecanóico – C16:0), apontando para o pico do íon molecular na razão carga/massa 270 e o pico base em 74. Este pico se repetiu em todos os espectros de massa, e é uma confirmação da formação dos ésteres metílicos, como já discutido na seção 3.9.2.1.

Figura 55 - Cromatograma do biodiesel do MLE sem ação oxidante



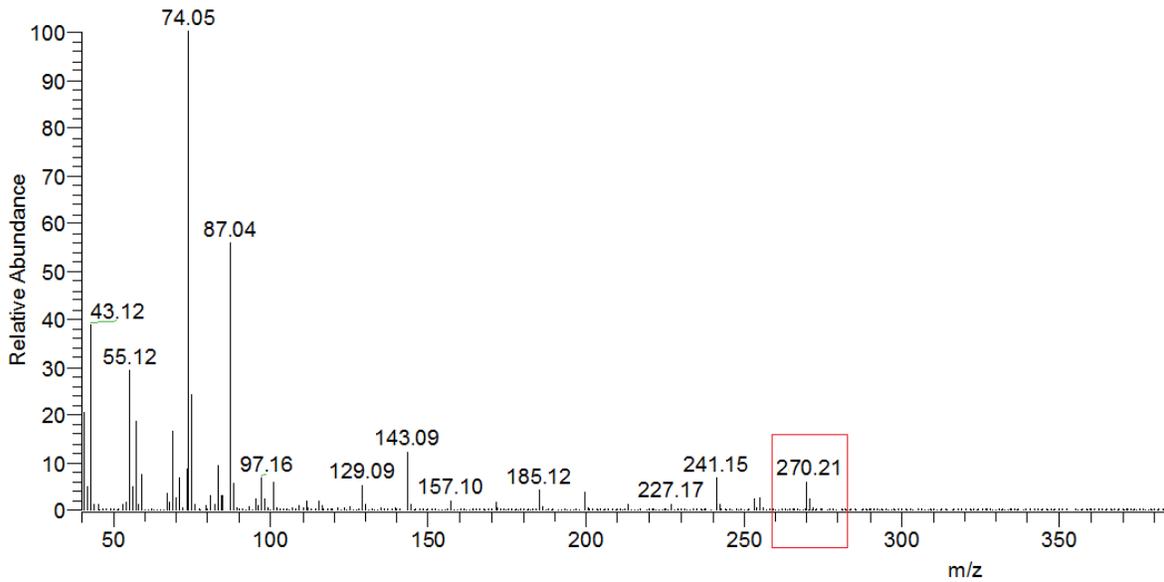
Fonte: AUTOR, 2017

Figura 56 - Cromatograma do MLE com 0,715M de H₂O₂



Fonte: AUTOR, 2017

Figura 57 - Espectro de massa obtido para o EM do C16:0



Fonte: AUTOR, 2017

Tabela 17 Perfil lipídico do biodiesel obtido

Ésteres metílicos (EM) de ácidos graxos (Biodiesel)							
EM	FM	TR (min)	B0		B1		
			AB (%)	SEE (%)	TR (min)	AB (%)	SEE (%)
C14:3	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	25,03	6,5	68	25,02	2,6	57
C14:0	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	27,40	14,4	86	27,75	17,9	92
C16:1	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	27,69	6,6	71	27,83	5,1	81
C16:0	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	28,34	16,8	93	28,83	19,3	89
C18:1	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	30,09	2,8	89	30,09	1,7	75
C18:3	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	31,40	4,3	64	31,73	3,8	68
C20:4	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	32,88	38,4	89	33,36	30,3	78
C20:0	C ₂₁ H ₃₄ O ₂	33,08	5,2	78	33,61	13,9	91
C22:4	C ₂₃ H ₃₈ O ₂	38,44	3,2	89	38,46	1,5	68
TOTAL* (%)			98,2			96,1	

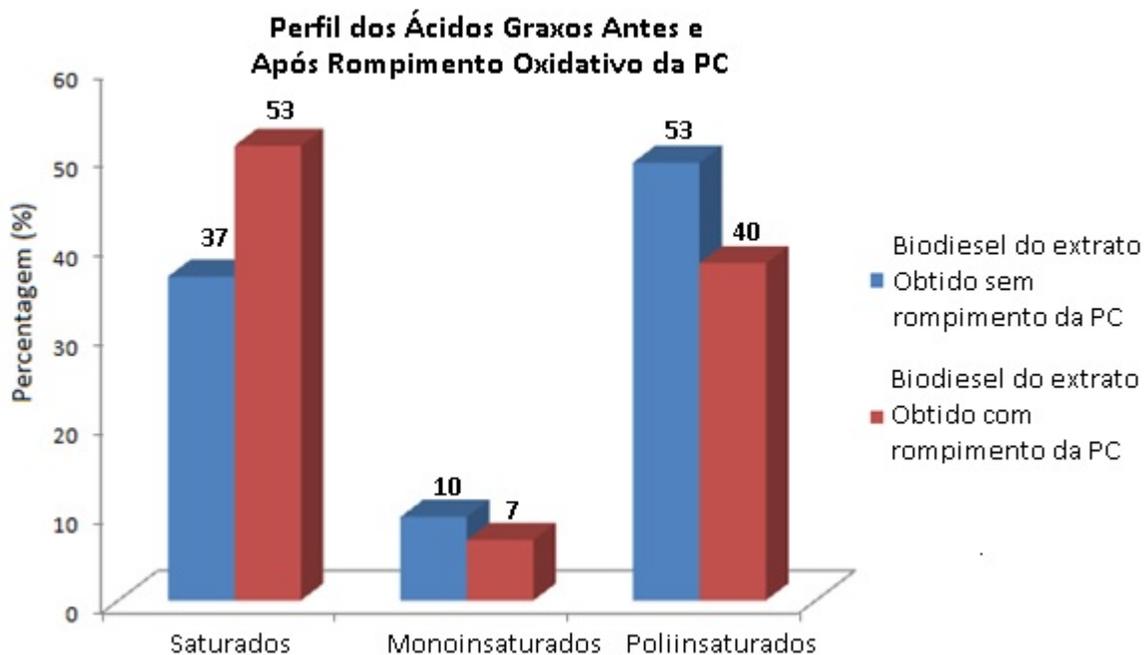
*Em relação a composição total

Fonte: AUTOR, 2017

A composição lipídica da microalga estudada foi semelhante aos trabalhos de (ICE-L *et al.*, 2013) que estudou a variação do perfil lipídico após variações de temperaturas.

Sob mesmas condições de síntese, o MLE com ação oxidante obteve conversões semelhantes ao MLE na ausência de H₂O₂ ambos acima de 96% de conversão em ésteres metílicos. Contudo, como já relatado por STERITI *et al.* (2014), a presença peróxido de hidrogênio nas extrações promoveu um aumento de 40% na composição de cadeias saturadas, uma diminuição de 28 e 23% quantidade de cadeias mono e poli-insaturados, respectivamente, como ilustra a Figura 53.

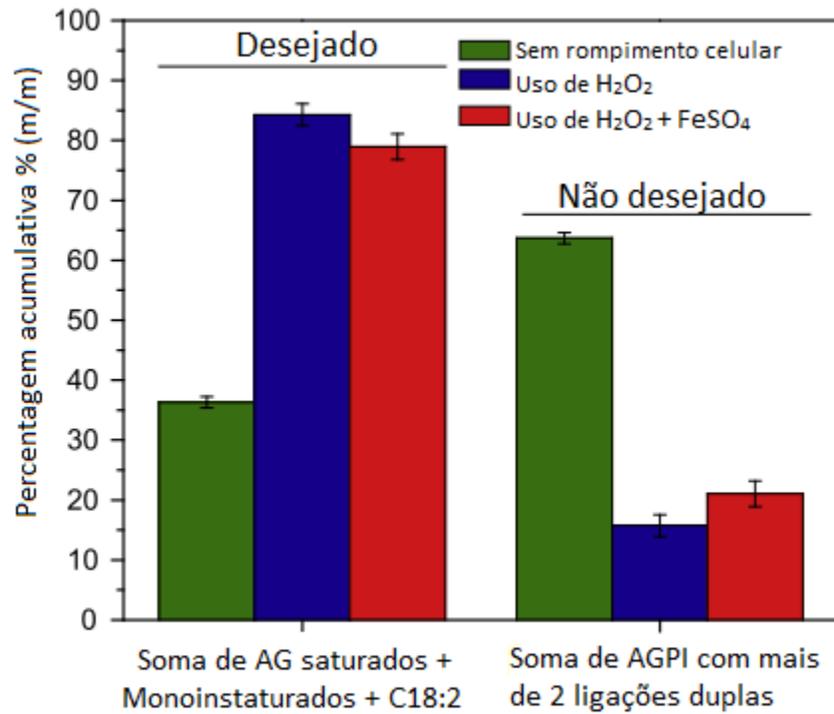
Figura 58 - Alteração de composição do ML após contato com H₂O₂



Fonte: AUTOR, 2017

Tal resultado também observado por Steriti como e ilustra a Figura 61 que pertence a um dos seus trabalhos, onde ilustra o aumento acentuado de ácido graxos saturados, monoinsaturados e C18:2 após rompimento celular com H₂O₂ e H₂O₂ + FeSO₄. Ainda segundo Steriti tal perfil é mais desejado para síntese de biodiesel, principalmente pelo aumento da resistência oxidativa da cadeia carbônica (PULLEN; SAEED, 2012) e a diminuição do índice de iodo.

Figura 59 - Diminuição do número de insaturações no MLE após uso de H₂O₂



Fonte: STERITI, 2014 (ADAPTADO)

A Tabela 22 ilustra a mudança no perfil lipídico da microalga *Chlorella Vulgaris* após rompimento oxidativo da PC estudado por STERITI *et al* (2014), tais resultados se assemelham aos obtidos neste trabalho, como o aumento da concentração de C14:0, C16:0 e C18:0 e diminuição de C18:3.

Tabela 18 Mudança do perfil lipídico da *Chlorella Vulgaris* após rompimento oxidativo da PC

Ácido Graxo	Abundância % (m/m)		
	Sem Rompimento	Com rompimento- H ₂ O ₂	Com rompimento- H ₂ O ₂ + FeSO ₄
C14:0	0.6 ± 0.23	1.28 ± 0.01	0.59 ± 0.1
C16:0	9.1 ± 0.1	30.45 ± 1.35	29.88 ± 0.59
C16:1	2.07 ± 0.02	8.52 ± 0.31	18.37 ± 0.07
C17:0	6.26 ± 0.73	10.83 ± 0.27	1.38 ± 0.14
C17:1	0.33 ± 0.07	ND	1.02 ± 0.09
C18:0	1.35 ± 0.27	2.94 ± 0.05	2.89 ± 2.07
C18:1	4.99 ± 0.21	14.12 ± 2.74	13.48 ± 0.11
C18:2	8.38 ± 0.88	15.51 ± 0.65	8.51 ± 0.31
C18:3	42.32 ± 0.45	15.72 ± 1.29	16.32 ± 1.53
C20:0	2.05 ± 0.33	0.63 ± 0.07	2.82 ± 2.57
C20:5	1.19 ± 1.19	ND	ND
C22:0	21.37 ± 1.12	ND	ND

Fonte: STERITI, 2014 (ADAPTADO)

5.10 Outras moléculas presentes na composição do biodiesel

A análise de GC-MS identificou outras moléculas além de ésteres metílicos presentes em quantidades pequenas (cerca de 4% da composição total) no biodiesel gerado, as principais são listadas na Tabela 23.

Tabela 19 Compostos identificados no biodiesel

Grupo	Composto	FM	TR (min)
Hidrocarbonetos de cadeia curta	Solvente	C_xH_y	1-16 e 20,56
	Fitol	$C_{20}H_{40}O$	31,70
	3,7,11-trimetil-dodecan-1-ol	$C_{15}H_{32}O$	21,52
Álcoois	1-heptatriacontanol	$C_{37}H_{76}O$	23,86
	Heptriacontan-1-ol	$C_{37}H_{76}O$	45,84
Ácidos graxos	Ácido cis-eicos-13-enóico (C20:1)	$C_{21}H_{42}O_2$	49,74
TAGs	Monoglicerídeo de ácido alfa-linolênico	$C_{21}H_{36}O_4$	40,40
Terpenos	Esqualeno	$C_{30}H_{50}$	45,48
Esteróides	Etil iso-allocholate	$C_{26}H_{44}O_5$	48,74
	(3 β ,5 α)-2-metileno-colestan-3-ol	$C_{28}H_{48}O$	19,71
Outros	diiso-octil-ftalato	$C_{24}H_{48}O_4$	41,05

Fonte: AUTOR, 2017

O Heptriacontan-1-ol, 3,7,11-trimetil-dodecan-1-ol e o Heptriacontan-1-ol são alcoóis graxos, ou seja, de cadeias longas e provavelmente vieram da hidrólise de ceras. Já o fitol (Figura 62) é uma molécula terpenóide presente na composição comum dos tipos de clorofila e naturalmente presente na composição nos extrato lipídicos de microalgas, dentre as suas funções está atividade anti-oxidante e microbiológica (SANTOYO *et al.*, 2012)

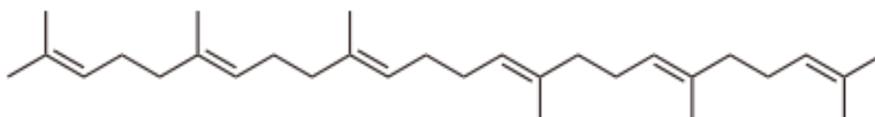
Figura 60 - Estrutura do fitol



Fonte: AUTOR, 2017

Foram identificados ainda resquícios de ácidos graxos e monoglicerídeos, como resultado da síntese incompleta de biodiesel, além de esteroides que desempenham funções biológicas importantes para as microalgas. Em 45,48 minutos foi identificado o esqualeno (Figura 63), um importante intermediário na biossíntese de esteroides, além de apresentar atividade antioxidante e cumprir inúmeras funções biológicas, como a função de controle de mutação de genes. É comumente encontrado em microalgas e espécies marinhas, sendo a principal fonte para extração é o óleo de tubarão. (KAJIKAWA *et al.*, 2015). O esqualeno também foi encontrado no extrato lipídico da microalga *botryococcus sp.* agindo como um importante metabólito na síntese de outros isoprenos e antioxidantes (VOLKMAN, 2014).

Figura 61 - Estrutura do esqualeno



Fonte: AUTOR, 2017

6 CONCLUSÕES

Após o estudo do método oxidativo com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como agente oxidante no rompimento da parede celular, pode-se concluir que:

1. O uso de H_2O_2 promoveu um aumento significativo nos rendimentos lipídicos até uma concentração limite (0,382 mol/L); a partir desta concentração se observa a diminuição do rendimento extrativo;
2. A oxidação não foi restrita apenas à parede celular, pois o contato com H_2O_2 promoveu degradação de pigmentos, tornando o material com tonalidade mais clara;
3. A microscopia óptica mostrou que as células das microalgas submetidas à oxidação ficaram mais claras, sem material intracelular e com parede danificada, indicando a eficiência do rompimento, o que pode ser comprovado por termogravimetria da biomassa residual através dos eventos de decomposição do material que reveste a parede celular.
4. As análises térmicas sugeriram um alto teor de lignina na biomassa analisada. Após a ação oxidativa do peróxido de hidrogênio, a substância foi pouco alterada sugerindo que a presença natural de lignina na parede celular representa uma barreira contra a extração de lipídeos, pois garante rigidez e impenetrabilidade à célula da microalga estudada;
5. O rompimento oxidativo da PC elevou os índices acidez dos extratos, porém tais valores ainda estão menores em relação aos valores das microalgas encontrados na literatura;
6. O material lipídico também sofreu degradação promovendo acréscimo do índice de peróxidos orgânicos gerados. Tal aumento, contudo, não desqualifica o uso deste material para produção de biodiesel, já que extratos brutos de oleaginosas também apresentam índices de IPO elevados;

7. Os espectros de FTIR dos extratos mostram que o uso de peróxido nas concentrações empregadas não alterou significativamente os lipídios e seu perfil espectroscópico;
8. As análises de GC-MS e índice de iodo comprovaram que a uso do agente oxidante promoveu alteração nas cadeias mono e poli-insaturadas, fato que pode ser visualizado através do percentual de ácidos graxos saturados no perfil lipídico. Fato que também se refletiu na diminuição dos índices de iodo, o que é vantajoso para a estabilidade oxidativa do biodiesel gerado a partir deste material lipídico;
9. As análises de GC-MS identificaram também antioxidantes naturais no biodiesel provenientes do material lipídico bruto da microalga;
10. A fração lipídica obtida com tratamento H_2O_2 foi transesterificada obtendo-se acima de 96% biodiesel.

7 SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS ESTUDOS

1. Detalhar a composição química da parede celular da microalga e adequar métodos de extração baseada nesta composição e que permitam seletividade no rompimento da parede celular;
2. Aplicar o método estudado neste trabalho com outros gêneros e espécies de microalga;
3. Avaliar o efeito fotocatalítico da luz ultravioleta em distintos comprimentos de ondas na oxidação da PC e como isto afeta as propriedades do material extraído;
4. Estudar os efeitos catalíticos da reação de Fenton no método oxidativo utilizando H_2O_2 como agente oxidante;
5. Estudar a eficiência de hipoclorito como agente oxidante da parede celular da microalga;
6. Estudar a associação de métodos físicos, químicos e/ou biológicos ao método de oxidação da parede celular para fins de extração de lipídeos;
7. Associar o método de oxidação da parede celular com métodos de transesterificação *in situ* do material lipídico da microalga;
8. Quantificar a estabilidade oxidativa do MLE e o biodiesel formado após oxidação da PC via uso de método Rancimat e/ou PDSC.

REFERÊNCIAS

AHMAD, A. L.; YASIN, N. H. M.; DEREK, C. J. C.; LIM, J. K. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production : A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 1, p. 584–593, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2010.09.018>>. .

AMARAL, F. P. Estudo das características físico-químicas dos óleos da amêndoa e polpa da macaúba. **Dissertação de mestrado**, p. 52, 2007. Disponível em: <<http://www.pg.fca.unesp.br/Teses/PDFs/Arq0213.pdf>>. .

AN, M.; MOU, S.; ZHANG, X.; et al. Expression of fatty acid desaturase genes and fatty acid accumulation in *Chlamydomonas* sp. ICE-L under salt stress. **Bioresource Technology**, v. 149, p. 77–83, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.027>>. .

APARICIO, R.; HARWOOD, J. **The Handbook of Olive Oil**. Springer, 2000.

ASHOKKUMAR, B.; VARALAKSHMI, P. Fatty Acid Biosynthesis from a New Isolate *Meyerella* sp. N4: Molecular Characterization, Nutrient Starvation, and Fatty Acid Profiling for Lipid Enhancement. , p. 2–8, 2015.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1139/o59-099>>. .

BOLWYREVF, A. A. W. INTERFERENCE OF HYDROGEN IN THE During the course of a reinvestigation on the kinetics of the I-I , O , -KSCN reaction , the classical permanganometric estimation of hydrogen peroxide was found to be impracticable owing to the reducing action of the thio. **System of chemical analysis**, v. 15, p. 413–414, 1935.

BOTHARA, S. B.; SINGH, S. Thermal studies on natural polysaccharide. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2 SUPPL., p. S1031–S1035, 2012. Asian Pacific Tropical Biomedical Magazine. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60356-6](http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60356-6)>. .

BRANCO, K. B. Z. F.; TREVISAN, E. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DA MICROALGA *S. cenedesmus accuminatus* VISANDO A PRODUÇÃO DE BIODIESEL. xx Congresso Brasileiro de Engenharia Química. **Anais...** . v. 20, p.1–8, 2014.

CAMPANELLA, A.; MUNCRIEF, R.; HAROLD, M. P.; et al. Thermolysis of microalgae and duckweed in a CO₂-swept fixed-bed reactor: Bio-oil yield and compositional effects. **Bioresource Technology**, v. 109, p. 154–162, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.115>>. .

CARBINATTO, F. M.; CASTRO, A. D. DE; CURY, B. S. F.; MAGALHÃES, A.; EVANGELISTA, R. C. Physical properties of pectin-high amylose starch mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, n. 2, p. 281–288, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.11.042>>. .

CARDOSO, S. L. FOTOFÍSICA DE CAROTENÓIDES E O PAPEL ANTIOXIDANTE DE β -CAROTENO. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 535–540, 1997.

CHEIRSILP, B.; TORPEE, S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 510–516, 2012a. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.125>>. .

CHEIRSILP, B.; TORPEE, S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 510–516, 2012b. Elsevier Ltd.

CHEN, L.; LIU, T.; ZHANG, W.; CHEN, X.; WANG, J. Bioresource Technology Biodiesel production from algae oil high in free fatty acids by two-step catalytic conversion. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 208–214, 2012a. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.033>>. .

CHEN, L.; LIU, T.; ZHANG, W.; CHEN, X.; WANG, J. Bioresource Technology Biodiesel production from algae oil high in free fatty acids by two-step catalytic conversion. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 208–214, 2012b. Elsevier Ltd.

CHENG, C. H.; DU, T. B.; PI, H. C.; et al. Comparative study of lipid extraction from microalgae by organic solvent and supercritical CO₂. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 21, p. 10151–10153, 2011a. Elsevier Ltd. Disponível em:

<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-80053094188&partnerID=40&md5=38930ead2d2f7633cd8f0624ed088dcc\http://ac.els-cdn.com/S0960852411011709/1-s2.0-S0960852411011709-main.pdf?_tid=f0b945a0-faea-11e2-b1e5-00000aab0f02&acdnat=1375389954_49c419b>. .

CHENG, C. H.; DU, T. B.; PI, H. C.; et al. Comparative study of lipid extraction from microalgae by organic solvent and supercritical CO₂. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 21, p. 10151–10153, 2011b. Elsevier Ltd.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 126–131, 2008. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>>. .

CONINCK, H. DE; STEPHENS, J. C.; METZ, B. Global learning on carbon capture and storage: A call for strong international cooperation on CCS demonstration. **Energy Policy**, v. 37, n. 6, p. 2161–2165, 2009. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.enpol.2009.01.020>>. .

DEMIRBAS, M. F. Biofuels from algae for sustainable development. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3473–3480, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.01.059>>. .

DIORIO, L. A.; FORCHIASSIN, F.; PAPINUTTI, V. L.; SUELDO, D. V. Actividad enzimática y degradación de diferentes tipos de residuos orgánicos por *Saccobolus saccoboloides* (Fungi , Ascomycotina). **Revista Iberoamerica de Micología**, v. 20, p. 11–15, 2003.

DONOHUE, A.; ARMOUR, K. C.; PENDERGRASS, A. G.; BATTISTI, D. S. Shortwave and longwave radiative contributions to global warming under increasing CO₂. , 2014.

EHIMEN, E. A.; SUN, Z. F.; CARRINGTON, C. G. Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids. **Fuel**, v. 89, n. 3, p. 677–684, 2010a. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2009.10.011>>. .

EHIMEN, E. A.; SUN, Z. F.; CARRINGTON, C. G. Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids. **Fuel**, v. 89, n. 3, p. 677–684, 2010b. Elsevier Ltd.

FRANCO, A. L. C.; LÔBO, I. P.; CRUZ, R. S. DA; et al. Biodiesel De Microalgas: Avanços E Desafios. **Quimica Nova**, v. 36, n. 3, p. 437–448, 2013.

GAI, C.; LIU, Z.; HAN, G.; PENG, N.; FAN, A. Combustion behavior and kinetics of low-lipid microalgae via thermogravimetric analysis. **Bioresource Technology**, v. 181, p. 148–154, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.045>>. .

GARCIA, C. C.; FRANCO, P. I. B. M.; ZUPPA, T. O.; FILHO, N. R. A.; LELES, M. I. G. Thermal stability studies of some cerrado plant oils. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 87, n. 3, p. 645–648, 2007.

GOMES, A. F.; GOMES, M. P. S.; SOUZA, L. DI; COSTA, M. Thermal and chromatographic characterization of biomass, lipid material, and microalgal biodiesel from *Monoraphidium* sp. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 119, n. 3, p. 1861–1866, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10973-014-4347-5>>. .

GOTI, A.; CARDONA, F.; ORGANICA, C.; SCHIFF, U. Hydrogen peroxide in green oxidation reactions: recent catalytic processes andrea goti* and francesca cardona. **Green Chemical Reactions**. p.191–212, 2008.

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

GUERRA, D. A.; DUTRA, L.; ANDRADE, S. F. DE; BEATRIZ, N. Future scenarios and trends in energy generation in brazil : supply and demand and mitigation forecasts Baltazar Salgueirinho Os o. , v. 103, p. 197–210, 2015.

GUILLEN, M. D.; CABO, N. Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and anisidine values to determine oxidative stability of edible oils. **Food Chemistry**, v. 77, n. 4, p. 503–510, 2002.

GULDHE, A.; SINGH, B.; RAWAT, I.; RAMLUCKAN, K.; BUX, F. Efficacy of drying and cell disruption techniques on lipid recovery from microalgae for biodiesel production. **FUEL**, v. 128, p. 46–52, 2014a. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2014.02.059>>. .

HONG, K. H.; SUN, G. Photohydrolysis of Cotton Cellulose for Producing Bioethanol. , p. 3782–3786, 2013.

ICE-L, C.; FAN, X.; WANG, Y.; MIAO, J. Bioresource Technology Temperature regulates fatty acid desaturases at a transcriptional level and modulates the fatty acid profile in the Antarctic microalga. **Bioresource Technology**, v. 134, p. 151–157, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.142>>. .

IQBAL, M. S.; MASSEY, S.; AKBAR, J.; ASHRAF, C. M.; MASIH, R. Thermal analysis of some natural polysaccharide materials by isoconversional method. **Food Chemistry**, v. 140, n. 1–2, p. 178–182, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814613002069>>. .

JUNIOR, P.; MARTINS, C. Biodiesel's production in brazil: a strategy for social, Economic and environmental sustainability. **Sustainable Bussiness**, v. 40, p. 1–16, 2014.

KAJIKAWA, M.; KINOHIRA, S.; ANDO, A.; SHIMOYAMA, M.; KATO, M. Accumulation of Squalene in a Microalga *Chlamydomonas reinhardtii* by Genetic Modification of Squalene Synthase and Squalene Epoxidase Genes. , p. 1–22, 2015.

KAROUI, R.; DOWNEY, G.; BLECKER, C. Mid-Infrared Spectroscopy Coupled with Chemometrics : A Tool for the Analysis of Intact Food Systems and the Exploration of Their Molecular Structure - Quality Relationships - A Review. **American Chemical Society**, v. 110 (10), p. 6144–6168, 2010.

KASHYAP, D. R.; CHANDRA, S.; KAUL, A.; TEWARI, R. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 3, p. 277–282, 2000.

KIM, J.; YOO, G.; LEE, H.; et al. Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 6, p. 862–876, 2013. Elsevier Inc.

KIRROLIA, A.; BISHNOI, N. R.; SINGH, R. Microalgae as a boon for sustainable energy production and its future research & development aspects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 20, p. 642–656, 2013. Elsevier.

KUMAR, A.; KUMAR, P.; SINGHAL, S.; JOSHI, G. Bioresource Technology Exploration of upstream and downstream process for microwave assisted sustainable biodiesel production from microalgae *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 793–800, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.013>>. .

LEE, J. Y.; YOO, C.; JUN, S. Y.; AHN, C. Y.; OH, H. M. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1 SUPPL., p. S75–S77, 2010a. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.058>>. .

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

LI, D.; GAN, L.; BRONJA, A.; SCHMITZ, O. J. Analytica Chimica Acta Gas chromatography coupled to atmospheric pressure ionization mass spectrometry (GC-API-MS): Review. **Analytica Chimica Acta**, v. 891, p. 43–61, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.08.002>>. .

LIN, Q.; GU, N.; LIN, J. Effect of ferric ion on nitrogen consumption, biomass and oil accumulation of a *Scenedesmus rubescens*-like microalga. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 242–247, 2012.

LÔBO, I.; FERREIRA, S.; CRUZ, R. Biodiesel: quality parameters and analytical methods. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1596–1608, 2009a. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422009000600044&script=sci_arttext>. .

LÔBO, I.; FERREIRA, S.; CRUZ, R. Biodiesel: quality parameters and analytical methods. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1596–1608, 2009b.

LÓPEZ-GONZÁLEZ, D.; FERNANDEZ-LOPEZ, M.; VALVERDE, J. L.; SANCHEZ-SILVA, L. Thermogravimetric-mass spectrometric analysis on combustion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 562–574, 2013.

LÓPEZ-GONZÁLEZ, D.; FERNANDEZ-LOPEZ, M.; VALVERDE, J. L.; SANCHEZ-SILVA, L. Kinetic analysis and thermal characterization of the microalgae combustion process by thermal analysis coupled to mass spectrometry. **Applied Energy**, v. 114, p. 227–237, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.09.055>>. .

MAADANE, A.; MERGHOU, N.; AINANE, T.; et al. Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles, carotenoids and phenolic content. **Journal of Biotechnology**, v. 215, p. 13–19, 2015. Elsevier B.V. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.400>>. .

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010.

MCEWEN, C. N.; MCKAY, R. G. LC / MS : GC / MS Ion Source : Advantages of Dual AP-LC / MS : GC / MS Instrumentation. , 2005.

MEISTER, E. V. A.; GIESELER, H. Freeze-Dry Microscopy of Protein / Sugar Mixtures : Drying Behavior , Interpretation of Collapse Temperatures and a Comparison to Corresponding Glass Transition Data. , v. 98, n. 9, p. 3072–3087, 2009.

MENEGHETTI, S. P.; MENEGHETTI, M. R.; BRITO, Y. C. A Reação de Transesterificação , Algumas Aplicações e Obtenção de Biodiesel A Reação de Transesterificação , Algumas Aplicações e Obtenção de Biodiesel. , v. 5, n. 1, p. 63–73, 2013.

MENET, M. Principes de la spectrométrie de masse. **RFL Revue francophone des laboratories**, v. 2011, n. 437, p. 41–53, 2011. Elsevier.

MIAO, X.; WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 841–846, 2006.

MOLINUEVO-SALCES, B.; MAHDY, A.; BALLESTEROS, M.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. From piggery wastewater nutrients to biogas: Microalgae biomass revalorization through anaerobic digestion. **Renewable Energy**, v. 96, p. 1103–1110, 2015.

NAKANISHI, A.; AIKAWA, S.; HO, S. H.; et al. Development of lipid productivities under different CO₂ conditions of marine microalgae *Chlamydomonas* sp. JSC4. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 247–252, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.009>>. .

NETO, A. M. P.; SOTANA DE SOUZA, R. A.; LEON-NINO, A. D.; et al. Improvement in microalgae lipid extraction using a sonication-assisted method. **Renewable Energy**, v. 55, p. 525–531, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2013.01.019>>. .

OLIVEIRA, E. DE; SALIBA, S.; MÁRIO, N.; SÉRGIO, R.; LEMOS, A. LIGNINAS – MÉTODOS DE

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA LIGNINS – ISOLATION METHODS AND CHEMICAL CHARACTERIZATION. , p. 917–928, 2001.

OSULLIVAN, A C. Cellulose: the structure slowly unravels. **Blackie Academic & Professional**, v. 4, n. 3, p. 173–207, 1997. Disponível em: <<Go to ISI>://A1997XU50800001>. .

PASSOS, F.; FELIX, L.; ROCHA, H.; PEREIRA, J. DE O.; AQUINO, S. DE. Reuse of microalgae grown in full-scale wastewater treatment ponds: Thermochemical pretreatment and biogas production. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 305–312, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.006>>. .

PESCHKE, M.; MOOG, D.; KLINGL, A.; MAIER, U. G.; HEMPEL, F. Evidence for glycoprotein transport into complex plastids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 26, p. 10860–5, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3696800&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

POUTEAU, C.; DOLE, P.; CATHALA, B.; AVEROUS, L.; BOQUILLON, N. Antioxidant properties of lignin in polypropylene. **Polymer Degradation and Stability**, v. 81, n. 1, p. 9–18, 2003.

PRABAKARAN, P.; RAVINDRAN, A. D. A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 150–154, 2011.

PRANA, V.; ROTUREAU, P.; FAYET, G.; et al. Prediction of the thermal decomposition of organic peroxides by validated QSPR models. **Journal of Hazardous Materials**, v. 276, p. 216–224, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.05.009>>. .

PULLEN, J.; SAEED, K. An overview of biodiesel oxidation stability. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 8, p. 5924–5950, 2012. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2012.06.024>>. .

RAWAT, I.; KUMAR, R. R.; MUTANDA, T.; BUX, F. Biodiesel from microalgae : A critical evaluation from laboratory to large scale production. **Applied Energy**, v. 103, p. 444–467, 2013a. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.10.004>>. .

REMACLE, C.; EPPE, G.; COOSEMANS, N.; FERNANDEZ, E.; VIGEOLAS, H. Combined intracellular nitrate and NIT2 effects on storage carbohydrate metabolism in *Chlamydomonas*. , v. 65, n. 1, p. 23–33, 2014.

RESERVES, P.; REMAINING, R.; OIL, C.; EXPORTS, N. Caspian ' s oil problems . Is gas the answer ? , p. 1–4, 2017.

ROHMAN, A.; MAN, Y. B. C. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil. **Food Research International**, v. 43, n. 3, p. 886–892, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.12.006>>. .

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279–291, 2003.

SAMEK, O.; ZEMÁNEK, P.; JONÁŠ, A.; TELLE, H. H. Characterization of oil-producing microalgae using Raman spectroscopy. **Laser Physics Letters**, v. 8, n. 10, p. 701–709, 2011.

SANTOYO, S.; JAIME, L.; PLAZA, M.; et al. Antiviral compounds obtained from microalgae commonly used as carotenoid sources. , p. 731–741, 2012.

SCHARBERT, B.; ZEISBERGER, E.; PAULUS, E. Aerobic epoxidation with a ruthenium-porphyrin catalyst: formation of an inactive carbonyl complex. **ELSEVIER Journal of Organometallic Chemistry** 493, v. 493, p. 143–147. Journal, 1995.

SILVA, G. D. S.; CORAZZA, M. L. Oil extraction of microalgae for biodiesel production. **Espaço Energia**, v. 1, n. 21, p. 12–19, 2014.

SKOOG, DOUGLAS A.; HOLLER, F. JAMES; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental** Bookman. Elsevier Ltd, 2002.

SOUZA, M. P. DE; BJERK, T. R.; GRESSLER, P. D.; et al. As Microalgas Como Uma Alternativa Para a Produção De Biocombustíveis Parte I : Bioetanol. , p. 108–116, 2012.

STERITI, A.; ROSSI, R.; CONCAS, A.; CAO, G. A novel cell disruption technique to enhance lipid extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 164, p. 70–77, 2014. Elsevier

Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.056>>. .

STUART, B. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. Wiley: Chichester, UK, 2004.

SUAREZ, P.; MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, MARIO R. WOLF, C. R. TRANSFORMAÇÃO DE TRIGLICERÍDEOS EM COMBUSTÍVEIS, MATERIAIS POLIMÉRICOS E INSUMOS QUÍMICOS: ALGUMAS APLICAÇÕES DA CATÁLISE NA OLEOQUÍMICA. **Quim. Nova**, v. 30, n. 3, p. 667–676, 2007.

TAI-IL MAH, KRISTIN A. KELLER, RONALD J. KERANS, M. K. C. Reduced Cracking in Oxide Fiber-Reinforced Oxide Composites via Freeze-Dry Processing. **The American Ceramic Society**, v. 1443, p. 1437–1443, 2015.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: Aplicações industriais e perspectivas. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 388–394, 2007.

VALENTE, A.; AUGUSTO, F.; RIEDO, C. Análise quantitativa por cromatografia. **Chemskeys**, v. 1, p. 1–18, 2003.

VOLKMAN, J. K. Organic Geochemistry Acyclic isoprenoid biomarkers and evolution of biosynthetic pathways in green microalgae of the genus *Botryococcus* q. **Organic Geochemistry**, v. 75, p. 36–47, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.orggeochem.2014.06.005>>. .

WIDJAJA, A.; CHIEN, C. C.; JU, Y. H. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 40, n. 1, p. 13–20, 2009.

YANG, H.; YAN, R.; CHEN, H.; LEE, D. H.; ZHENG, C. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. **Fuel**, v. 86, n. 12–13, p. 1781–1788, 2007.

ZAGARESE, H. E.; DIAZ, M.; PEDROZO, F.; et al. Photodegradation of natural organic matter exposed to fluctuating levels of solar radiation. , v. 61, p. 35–45, 2001.

ZOHURIAAN, M. J.; SHOKROLAHI, F. Thermal studies on natural and modified gums. , v. 23, p. 575–579, 2004.