

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais



Dissertação

Perfil de ácidos graxos do biodiesel obtido por esterificação *in-situ* da biomassa das algas *Palisada furcata*, *Phormidium sp.*, *Chroococcales sp.* e *Pseudanabaena sp.*

Carolina Elicker

Pelotas, 2014.

Carolina Elicker

Perfil de ácidos graxos do biodiesel obtido por esterificação *in-situ* da biomassa das algas *Palisada furcata*, *Phormidium sp.*, *Chroococcales sp.* e *Pseudanabaena sp.*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais (Área de concentração: Biomateriais)

Orientador: Prof. Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira

Pelotas, 2014.

Carolina Elicker

Perfil de ácidos graxos do biodiesel obtido por esterificação *in-situ* da biomassa das algas *Palisada furcata*, *Phormidium sp.*, *Chroococcales sp.* e *Pseudanabaena sp.*

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais (Área de concentração: Biomateriais), Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 20/03/2014

Banca examinadora:

.....
Prof. Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira (Orientador)
Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

.....
Prof. Dra. Katia Regina Lemos Castagno
Doutora em Ciência dos Materiais pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

.....
Dra. Cristiane Wienke Raubach Ratmann
Doutora em Química pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)

Mais uma vez, e sempre:
aos meus pais, Sergio e Ana Cristina,
pelo amor e incentivo,
DEDICO.

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida e por me permitir mais esta vitória;

Aos meus pais Sergio e Ana Cristina, por me ensinarem o valor do conhecimento e incentivarem sempre a busca pelos meus sonhos, e à minha irmã Camila, minha amiga e companheira de planos para o futuro;

Ao meu namorado Guilherme, pelo amor e companheirismo, por devolver minha sanidade em momentos de desespero e por sempre acreditar na minha capacidade;

Ao Prof. Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira, pela oportunidade, orientação e confiança em mim depositada;

Ao Prof. Dr. Sergio da Silva Cava, pelo auxílio desde antes do meu ingresso no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais;

Às entidades financiadoras: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS);

Aos colegas e amigos do Laboratório de Lipidômica e Bio-orgânica pela amizade durante esta jornada: ao Marco, Marina, Camila, Chayane, Caroline e André por contribuírem diretamente com a realização deste trabalho; a Priscila e Vanderléia que me orientaram na minha chegada ao laboratório; e Bruna, Rosiane, Silvana, Caroline Carapina, Bruno Nunes e Giulia pelo divertido convívio diário. A todos, sou grata pelos momentos e risadas compartilhadas;

Muito obrigada.

“Nunca duvide que um pequeno grupo de pessoas conscientes e engajadas possa mudar o mundo. Desde sempre foi assim que as mudanças aconteceram”. (Margaret Mead)

Resumo

ELICKER, Carolina. **Perfil de ácidos graxos do biodiesel obtido por esterificação *in-situ* da biomassa das algas *Palisada furcata*, *Phormidium sp.*, *Chroococcales sp.* e *Pseudanabaena sp.*** 2014. 78f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Neste trabalho, é investigada a eficiência de quatro diferentes solventes orgânicos na extração de lipídeos da biomassa da macroalga *Palisada furcata*, empregando ultrassom como promotor de reação. Adicionalmente, é mostrada síntese de biodiesel a partir da biomassa da macroalga *Palisada furcata* e das cianobactérias *Chroococcales sp.*, *Phormidium sp.* e *Pseudanabaena sp.*, utilizando uma metodologia de esterificação *in-situ* com catálise ácida e assistência por ultrassom. Dentre os solventes orgânicos, o clorofórmio apresentou maior eficiência na extração de lipídeos totais da macroalga *P. furcata*, entretanto, não houve diferenças significativas entre os perfis de ácidos graxos em função do solvente utilizado. Os perfis de ácidos graxos, elucidados por CG-FID e CG-MS, apresentaram de 69-76% de ácidos graxos saturados, 16-22% de ácidos graxos monoinsaturados e 7 a 10% de ácidos graxos poli-insaturados. O perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos do biodiesel derivado da biomassa de *P. furcata* foi semelhante ao determinado na extração empregando metanol. As cianobactérias *Chroococcales sp.*, *Phormidium sp.* e *Pseudanabaena sp.* apresentam conteúdo lipídico total de 5-11% e percentagem de conversão de lipídeos a biodiesel variável entre 11-14%. O biodiesel derivado da biomassa das cianobactérias apresentaram de 42-51% de ácidos graxos saturados, 33-46% de ácidos graxos monoinsaturados e 4-18% de ácidos graxos poli-insaturados. O procedimento descrito neste trabalho pode ser considerado uma metodologia econômica e ambiental para reações de esterificação com importância comercial. Vantagens significativas do método incluem baixo custo do catalisador, facilidade de execução da reação, manipulação simples, tempos de reação reduzidos e condução da reação a temperatura ambiente.

Palavras-chave: *Palisada furcata*. *Chroococcales sp.* *Phormidium sp.* *Pseudanabaena sp.* Ácidos graxos. Biodiesel. Cromatografia gasosa.

Abstract

ELICKER, Carolina. **Perfil de ácidos graxos do biodiesel obtido por esterificação *in-situ* da biomassa das algas *Palisada furcata*, *Phormidium sp.*, *Chroococcales sp.* e *Pseudanabaena sp.*** 2014. 78f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

In this work, is investigated the effect of four different organic solvents on lipids extraction from biomass of macroalgae *Palisada furcata*, using ultrasound as a reaction promoter. Also, is showed biodiesel synthesis from biomass of macroalgae *Palisada furcata* and cyanobacteria *Chroococcales sp.*, *Phormidium sp.* and *Pseudanabaena sp.*, using an *in-situ* esterification method with acid catalysis and ultrasound assistance. Among organic solvents, the chloroform showed greater efficiency to extract total lipids, however, there were no significant differences between the fatty acids profiles due to the solvent used. The fatty acids profiles, elucidated by GC-FID and GC- MS, showed 69-76% of saturated fatty acids, 16-22% of monounsaturated fatty acids and 7-10% of polyunsaturated fatty acids. The fatty acids methyl esters profile of biodiesel derived from the biomass of *P. furcata* was similar to that determined in extraction using methanol. Cyanobacterias *Chroococcales sp.*, *Phormidium sp.* and *Pseudanabaena sp.* present the total lipid content of 5-11% and the conversion of lipids to biodiesel variable between 11-14%. Biodiesel derivated of cyanobacteria biomass showed 42-51% of saturated fatty acids, 33-46% of monounsaturated fatty acids and 4-18% of polyunsaturated fatty acids. The procedure described in this work could be considered an economical and environmental methodology to esterification reactions with commercial importance. Significant advantages of the method include low cost of the catalyst, the reaction is easy to execute, simple manipulation, the required reaction times are shorter and the reaction can be conducted at room temperature.

Key-words: *Palisada furcata*. *Chroococcales sp.* *Phormidium sp.* *Pseudanabaena sp.* Fatty acids. Biodiesel. Gas chromatography.

Lista de Figuras

Figura 1	Gráfico do consumo final de energia por fonte (%)	18
Figura 2	Gráfico do uso da energia no Brasil por setor (%)	19
Figura 3	Gráfico do consumo de energia nos transportes (%)	19
Figura 4	Esquema da reação de transesterificação de triglicerídeos	21
Figura 5	Fluxograma do processo tradicional com duas etapas: extração e posterior transesterificação de ácidos graxos de algas	24
Figura 6	Fluxograma do processo alternativo, com extração e transesterificação simultâneas de lipídeos de algas	25
Figura 7	Cromatograma do Padrão FAME Mix 37	35
Figura 8	Fluxograma das etapas do processo de esterificação <i>in-situ</i> neste estudo	37
Figura 9	Principais ácidos graxos presentes em <i>P. furcata</i> conforme solvente extrator	40
Figura 10	Conteúdo lipídico das algas estudadas	42
Figura 11	Conversão de ácidos graxos da macroalga <i>P. furcata</i> a biodiesel ..	42
Figura 12	(a) Balanço entre ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados e; (b) principais ácidos graxos presentes no biodiesel sintetizado a partir da biomassa de <i>P. furcata</i> (BD ₂) em comparação com o estudo preliminar de solventes extratores empregando metanol	44
Figura 13	Conversão de ácidos graxos das cianobactérias <i>Phormidium sp.</i> , <i>Chroococcales sp.</i> e <i>Pseudanabaena sp.</i> a biodiesel	45
Figura 14	Cromatograma de CG-FID do biodiesel derivado da biomassa da cianobactéria <i>Pseudanabaena sp.</i>	46
Figura 15	(a) Balanço entre ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados e; (b) principais ácidos graxos presentes no biodiesel sintetizado a partir da biomassa de <i>Phormidium sp.</i> (BD ₃), <i>Pseudanabaena sp.</i> (BD ₅) e <i>Chroococcales sp.</i> (BD ₆)	48
Figura 16	Cromatograma da amostra AG ₁ (extração com hexano) obtido por CG-FID	65
Figura 17	Cromatograma da amostra AG ₂ [*] (extração com clorofórmio) obtido por CG-FID	66
Figura 18	Cromatograma da amostra AG ₃ [*] (extração com metanol) obtido por CG-FID	67
Figura 19	Cromatograma da amostra AG ₄ (extração com etanol) obtido por CG-FID	68
Figura 20	Cromatograma da amostra AG ₅ (extração com clorofórmio/metanol) obtidos por CG-MS	69
Figura 21	Cromatograma e espectros de massas das amostras AG ₁₋₄	

	obtidos por CG-MS	70-72
Figura 22	Cromatograma da amostra BD ₁ (<i>Palisada furcata</i>) obtido por CG-FID.....	73
Figura 23	Cromatograma da amostra BD ₂ (<i>Palisada furcata</i>) obtido por CG-FID.....	74
Figura 24	Cromatograma da amostra BD ₃ (<i>Phormidium sp.</i>) obtido por CG-FID.....	75
Figura 25	Cromatograma da amostra BD ₄ (<i>Phormidium sp.</i>) obtido por CG-FID.....	76
Figura 26	Cromatograma da amostra BD ₅ (<i>Pseudanabaena sp.</i>) obtido por CG-FID.....	77
Figura 27	Cromatograma da amostra BD ₆ (<i>Chroococcales sp.</i>) obtido por CG-FID.....	78

Lista de Tabelas

Tabela 1	Oferta interna de energia no Brasil	17
Tabela 2	Solventes e catalisadores utilizados na síntese de biodiesel de algas	27-28
Tabela 3	Perfil de ácidos graxos da macroalga <i>Palisada furcata</i> conforme solvente extrator	39
Tabela 4	Perfil de ácidos graxos do biodiesel derivado da biomassa da macroalga <i>Palisada furcata</i>	43
Tabela 5	Perfil de ácidos graxos do biodiesel derivado da biomassa das cianobactérias <i>Chroococcales sp.</i> , <i>Phormidium sp.</i> e <i>Pseudanabaena sp.</i>	47
Tabela 6	Classificação taxonômica das algas utilizadas	61
Tabela 7	Condições operacionais para análise do perfil lipídico utilizando cromatógrafo gasoso CG-2010 (Shimadzu)	62
Tabela 8	Condições operacionais para análise do perfil lipídico utilizando cromatógrafo gasoso com espectrômetro de massas acoplado GC-MS-QP 2010SE (Shimadzu)	62
Tabela 9	Condições operacionais para análise do biodiesel utilizando cromatógrafo gasoso CG-2010 (Shimadzu)	63

Lista de Abreviaturas e Siglas

AG ₁	Amostra dos lipídeos de <i>Palisada furcata</i> extraídos com hexano
AG ₂	Amostra dos lipídeos de <i>Palisada furcata</i> extraídos com clorofórmio
AG ₃	Amostra dos lipídeos de <i>Palisada furcata</i> extraídos com metanol
AG ₄	Amostra dos lipídeos de <i>Palisada furcata</i> extraídos com etanol
AG ₅	Amostra dos lipídeos de <i>Palisada furcata</i> extraídos com clorofórmio/hexano (metodologia de Bligh e Dyer)
AGMI	Ácido graxo monoinsaturado
AGPI	Ácido graxo poli-insaturado
AGS	Ácido graxo saturado
BD ₁	Amostra de biodiesel de <i>Palisada furcata</i>
BD ₂	Amostra de biodiesel de <i>Palisada furcata</i> (5 g)
BD ₃	Amostra de biodiesel de <i>Phormidium sp.</i>
BD ₄	Amostra de biodiesel de <i>Phormidium sp.</i> (5 g)
BD ₅	Amostra de biodiesel de <i>Chroococcales sp.</i>
BD ₆	Amostra de biodiesel de <i>Pseudanabaena sp.</i>
BF ₃	trifluoreto de Boro
CG-FID	Cromatógrafo gasoso com detector por ionização em chama
CG-MS	Cromatógrafo gasoso com espectrômetro de massas acoplado
MtCO ₂ -eq	Milhões de toneladas equivalentes de dióxido de carbono
Mtep	Milhões de toneladas equivalentes de petróleo
<i>P. furcata</i>	<i>Palisada furcata</i>

Sumário

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral.....	17
2.2.1 Objetivos específicos	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 Oferta e demanda energética: contexto brasileiro	18
3.2 Biodiesel	21
3.2.1 Produção de biodiesel.....	21
3.3 Algas.....	23
3.3.1 Produção de biodiesel a partir de biomassa de algas.....	24
4 METODOLOGIA.....	33
4.1 Algas utilizadas.....	33
4.2 Extração e derivatização de ácidos graxos.....	34
4.2.1 Procedimentos cromatográficos	35
4.3 Determinação do conteúdo lipídico total	36
4.4 Síntese de biodiesel	37
4.4.1 Procedimentos cromatográficos	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 Extração e derivatização de ácidos graxos.....	40
5.2 Determinação de do conteúdo lipídico total	42
5.3 Síntese de biodiesel	43
5.3.1 <i>Palisada furcata</i>	43
5.3.2 <i>Chroococcales sp.</i> , <i>Phormidium sp.</i> e <i>Pseudanabaena sp.</i>	46
6 CONCLUSÕES	52
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	53
Referências	54
Apêndices.....	61
Apêndice A – Classificação taxonômica das algas utilizadas.	62

Apêndice B – Condições operacionais para análise do perfil de ácidos graxos das amostras AG ₁₋₅ por CG-FID e CG-MS.	63
Apêndice C - Condições operacionais para análise de biodiesel das amostras BD ₁₋₆ por CG-FID	64
Apêndice D – Análises em CG-FID das amostras AG ₁₋₅	65
Apêndice E – Análises em CG-MS das amostras AG ₁₋₄	70
Apêndice F - Análises em CG-FID das amostras BD ₁₋₆	73

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o mundo vem enfrentando problemas econômicos e ambientais cruciais, tais como o esgotamento dos combustíveis fósseis e mudanças climáticas. Estas questões levaram à expansão das pesquisas e desenvolvimentos em energia alternativa com alta renovabilidade e sustentabilidade (JUNG *et al.*, 2013). Biodiesel é um excelente substituto para o combustível diesel convencional, pois é um dos biocombustíveis com as características mais compatíveis com o combustível fóssil (óleo diesel), com a vantagem de ser renovável, não tóxico e biodegradável (DAROCH, GENG e WANG, 2013; SUGANYA e RANGANATHAN, 2012). A maior parte do biodiesel atualmente produzido no mundo deriva do óleo de soja, porém, tradicionalmente, todos os óleos vegetais enquadrados na categoria de óleos fixos ou triglicerídeos podem ser transformados em biodiesel (FERRARI, OLIVEIRA e SCABIO, 2005).

As algas são um grupo extremamente diversificado de organismos, e esta diversidade se reflete na sua composição bioquímica. Uma vez que os fatores biológicos, físicos e químicos influenciam o crescimento das algas, a composição bioquímica pode ser alterada significativamente pelas suas condições de cultivo. Por esta razão, estes seres são fonte potencial de uma quase ilimitada gama de compostos (BOROWITZKA, 1993). Em especial, as algas tem sido consideradas como uma das matérias-primas mais promissoras para a produção de biodiesel, devido ao seu curto ciclo celular (alta taxa de crescimento), alto teor de óleo e forte capacidade de adaptação ao meio ambiente (alta salinidade, presença de íons de metais pesados e outros compostos tóxicos, alta concentração de CO₂, etc.), o que permite o cultivo em terras inexploradas, sem ocupar áreas aráveis (CHISTI, 2007; JOHNSON e WEN, 2009; PEREIRA *et al.*, 2012).

A produção de biodiesel é tecnologicamente bem dominada. Quaisquer matrizes ricas em lipídeos (inclusive gorduras animais) podem, em tese, ser

utilizadas para produzir o combustível (LOURENÇO, 2006). Entretanto, nem todo óleo vegetal pode (ou deve) ser utilizado como matéria-prima para a produção de biodiesel, isso porque alguns óleos vegetais apresentam propriedades não ideais que são transferidas para o biocombustível e que o torna inadequado (RAMOS *et al.*, 2003). Algas sintetizam diferentes tipos de lipídeos dependendo da espécie e, muito embora nem todos os óleos sejam satisfatórios para a produção de biodiesel, óleos utilizáveis ocorrem comumente (CHISTI, 2007; PEREIRA *et al.*, 2012). Algas correntemente são constituídas de lipídeos neutros, que compreendem acilglicerois e ácidos graxos livres (AGL - divididos em hidrocarbonetos, esteróis, cetonas, carotenos e clorofilas), e lipídeos polares, subcategorizados em fosfolipídeos e glicolipídeos (CHISTI, 2007; HALIM, DANQUAH e WEBLEY, 2012; MEDINA *et al.*, 1998). Acilglicerois são desejáveis para a produção de biodiesel em escala comercial, principalmente por serem transesterificados por catálise básica, mais barata (HALIM, DANQUAH e WEBLEY, 2012). Catalisadores ácidos, por sua vez, tem a vantagem de catalisar simultaneamente a transesterificação de acilglicerois e a esterificação de ácidos graxos livres, aumentando, assim, o rendimento teórico global da reação e permitindo a utilização de espécies que contêm alto conteúdo de ácidos graxos livres (VYAS, VERMA e SUBRAHMANYAM, 2010).

O biodiesel de algas é produzido principalmente por via convencional: extração dos lipídeos a partir da biomassa de algas, seguido pela conversão a ésteres de ácidos graxos e glicerol (MIAO e WU, 2006; XU *et al.*, 2006). No entanto, tal método é demorado, caro e difícil de ser aplicado, principalmente considerando a etapa extração do óleo, dificultada devido às paredes celulares rígidas das células algais (JOHNSON e WEN, 2009). Recentemente o método de transesterificação *in-situ*, onde há contato do álcool diretamente com a biomassa algal em vez de reagir com óleo pré-extraído, tem recebido muita atenção para a produção de biodiesel à base de algas (LI *et al.*, 2011), devido a simplificação do processo.

A busca por matérias-primas ideais, constituídas por altos teores de óleo, com taxas de crescimento elevadas e pequena ocupação de áreas aráveis levou a utilização de algas para produção de biodiesel. Aliado a isso, o desenvolvimento de metodologias visando maiores rendimentos de extração/conversão e diminuição do tempo reacional resultou no uso da sonoquímica para produção deste biocombustível. Dentro deste contexto, foi utilizada biomassa algal para síntese de biodiesel via transesterificação e esterificação *in-situ* assistida por ultrassom.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Síntese de biodiesel em microescala a partir da biomassa da macroalga *Palisada furcata* e das cianobactérias *Chroococcales sp.*, *Phormidium sp.* e *Pseudanabaena sp.*

2.2.1 Objetivos específicos

a) Avaliação do desempenho de diferentes solventes orgânicos na extração de lipídeos totais e determinação da composição de ácidos graxos da macroalga *Palisada furcata* utilizando os diferentes solventes extratores;

b) Determinação do perfil de ácidos graxos do biodiesel sintetizado via esterificação *in-situ* a partir da biomassa da macroalga *Palisada furcata* e das cianobactérias *Chroococcales sp.*, *Phormidium sp.* e *Pseudanabaena sp.*

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Oferta e demanda energética: contexto brasileiro

No Brasil, em 2012, a oferta interna de energia atingiu 283,6 milhões de toneladas equivalentes de petróleo (Mtep) (Tabela 1), representando um crescimento de 4,1% com relação ao ano anterior. Gás natural, petróleo e derivados responderam a 97% deste incremento, uma vez que houve estagnação da oferta interna de biomassa da cana (etanol) e de hidroeletricidade (BRASIL, 2013). Neste mesmo ano, o consumo energético no país atingiu 253,4 Mtep, representando um crescimento de 3,1% com relação a 2011. As fontes de energia consumidas são mostradas na Figura 1, onde se pode notar que as fontes não renováveis são responsáveis por mais de 40% do consumo de energia no país.

Tabela 1 – Oferta interna de energia no Brasil.

FONTE	2011	2012	2012	Variação
	Mtep		%	2011/2012
RENOVÁVEL	119,8	120,2	42,4	
Energia Hidráulica e Eletricidade	39,9	39,9	13,8	-1,9
Cana-de-açúcar e derivados	42,8	43,6	15,4	+1,9
Lenha e Carvão Vegetal	26,0	25,7	9,1	-1,0
Outras Renováveis	11,1	11,8	4,1	+5,8
NÃO RENOVÁVEL	152,5	163,4	57,6	
Petróleo	105,2	111,2	39,2	+5,7
Gás Natural	27,7	32,6	11,5	+17,6
Carvão Mineral	15,5	15,3	5,4	-1,0
Urânio e derivados	4,2	4,3	1,5	+2,4

FONTE: Adaptado de BRASIL (2013).

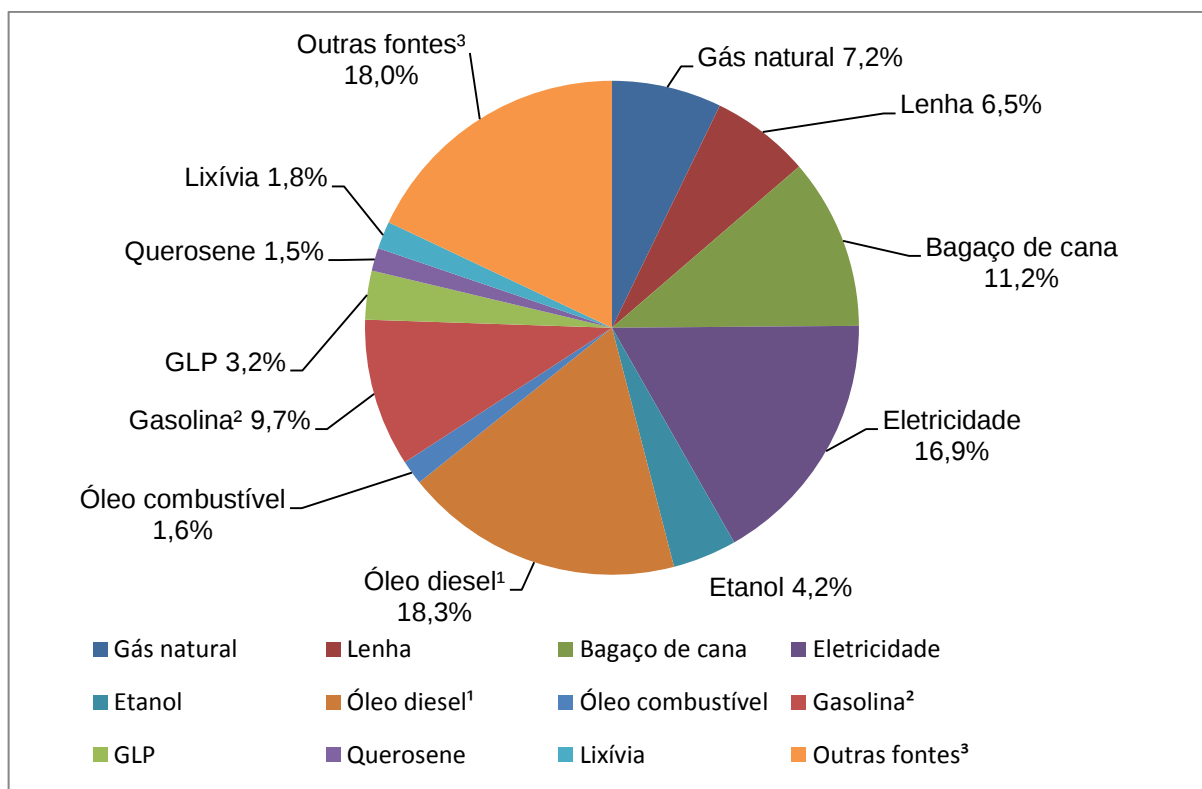


Figura 1 – Gráfico do consumo final de energia por fonte (%) ¹ Inclui biodiesel; ² Inclui apenas gasolina A (automotiva); ³ Inclui gás de refinaria, coque de carvão mineral e carvão vegetal, entre outros. Adaptado de BRASIL (2013).

A utilização destas fontes não renováveis se dá largamente no setor de transportes, demandando 31,2% da energia utilizada no país (atrás apenas do setor industrial) (Figura 2). Conforme o Balanço Energético Nacional (BRASIL, 2013), entre todos os setores consumidores de energia, o setor de transportes foi o que liderou o crescimento da demanda, alcançando crescimento de 7,2% com relação a 2012, fato diretamente relacionado ao aumento da frota de veículos leves no país (cerca de 3,8 milhões de veículos vendidos em 2012, um aumento de 4,6% com relação ao ano anterior). Dentro deste segmento, verifica-se a expressiva utilização de combustíveis fósseis, com destaque para o diesel (48,1%) (Figura 3). Este fato é especialmente preocupante quando se tem a quantificação do total de emissões associadas à matriz energética brasileira, que atingiu, no ano de 2012, 429,0 MtCO₂-eq, sendo a maior parte desse total gerado no setor de transportes (109,3 MtCO₂-eq, 48,8%) (BRASIL, 2013).

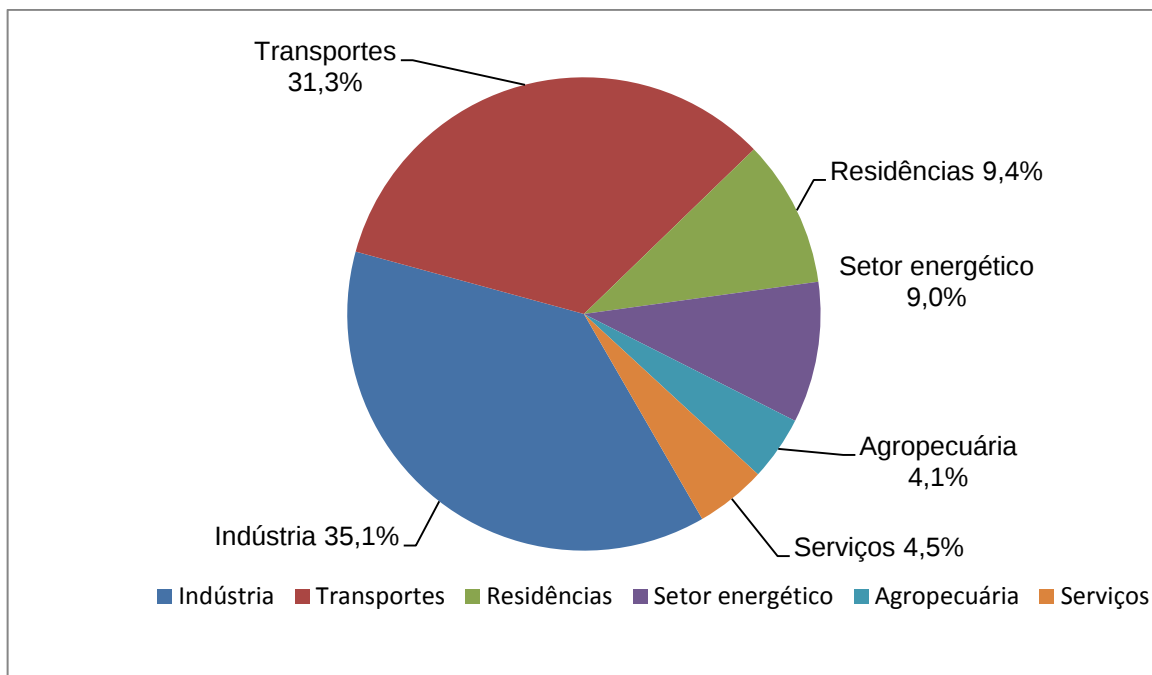


Figura 2 – Gráfico do uso da energia no Brasil por setor (%). Adaptado de BRASIL (2013).

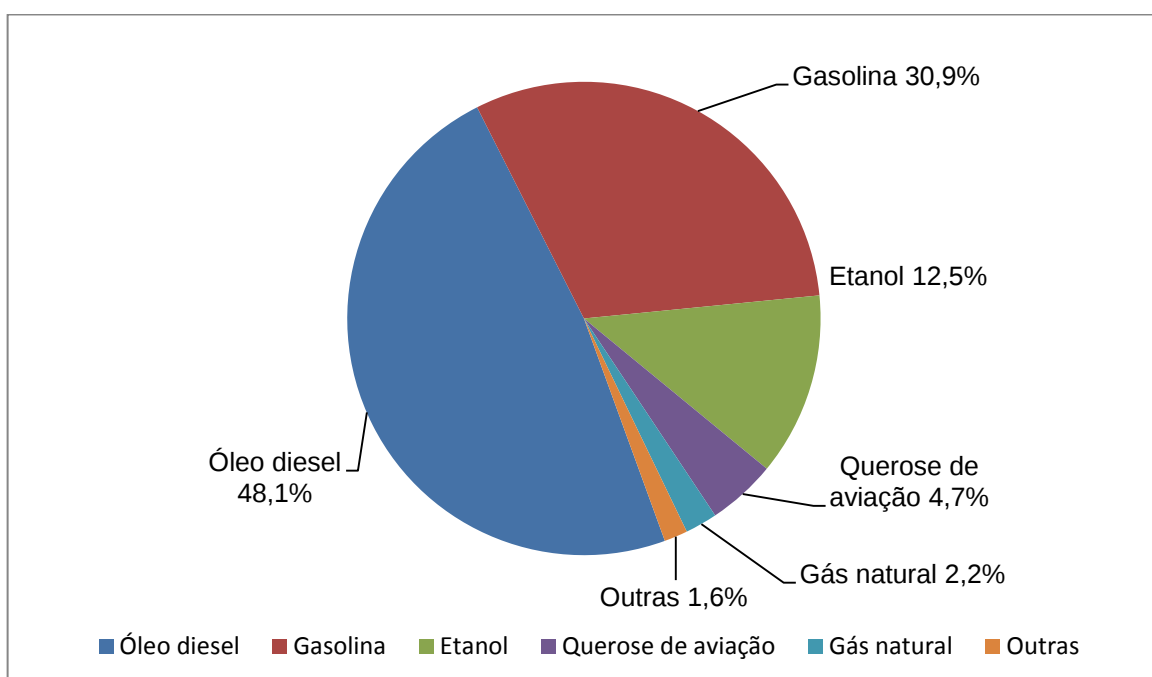


Figura 3 – Gráfico do consumo de energia nos transportes (%). Adaptado de BRASIL (2013).

3.2 Biodiesel

Os biocombustíveis são uma fonte de energia renovável produzida a partir da biomassa, que podem ser substituintes dos combustíveis derivados do petróleo (DERMIBAS, 2010). O biodiesel é composto de uma mistura de alquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, e representa um dos combustíveis renováveis mais importantes atualmente (KNOTHE *et al.*, 2006; PINTO *et al.* 2005).

A utilização de biodiesel como combustível alternativo para motores do ciclo diesel pode ser realizada devido a semelhança com o diesel de petróleo em algumas características como o número cetano, calor de combustão, ponto de fluidez, viscosidade cinemática e estabilidade à oxidação e lubricidade, apesar das diferentes constituições químicas (FAGUNDES, 2011; KNOTHE *et al.*, 2006). Além disso, ele representa vantagens sobre os combustíveis de petróleo no que diz respeito a questões ambientais, sendo virtualmente livre de enxofre e compostos aromáticos, possuir menores índices de emissão de partículas, hidrocarbonetos, monóxido de carbono e dióxido de carbono, além de ter caráter não tóxico e ser biodegradável (FERRARI, OLIVEIRA e SCABIO, 2005).

O Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), foi criado no Brasil em dezembro de 2004 (GARCEZ e VIANNA, 2009), objetivando incentivar a produção e uso do mesmo, com enfoque na obtenção de combustíveis alternativos aos combustíveis fósseis e no desenvolvimento econômico do país (BEATRIZ, ARAÚJO e LIMA, 2011). Para atender às políticas do governo brasileiro de incorporação de 5% de biodiesel no diesel convencional (B5), estima-se que cerca de 2,6 bilhões de litros de biodiesel sejam produzidos anualmente (ALBARELLI *et al.*, 2011).

3.2.1 Produção de biodiesel

A produção de biodiesel se dá através de vários processos e um deles é um processo químico chamado transesterificação (Figura 4), que consiste de uma série de reações químicas sucessivas em que triglicerídeos são convertidos em ésteres

de ácidos graxos (biodiesel) e glicerol. Este processo ocorre na presença de um álcool de cadeia curta, para garantir fácil separação, e é catalisado por uma base ou ácido forte (SINGH e SINGH, 2010).

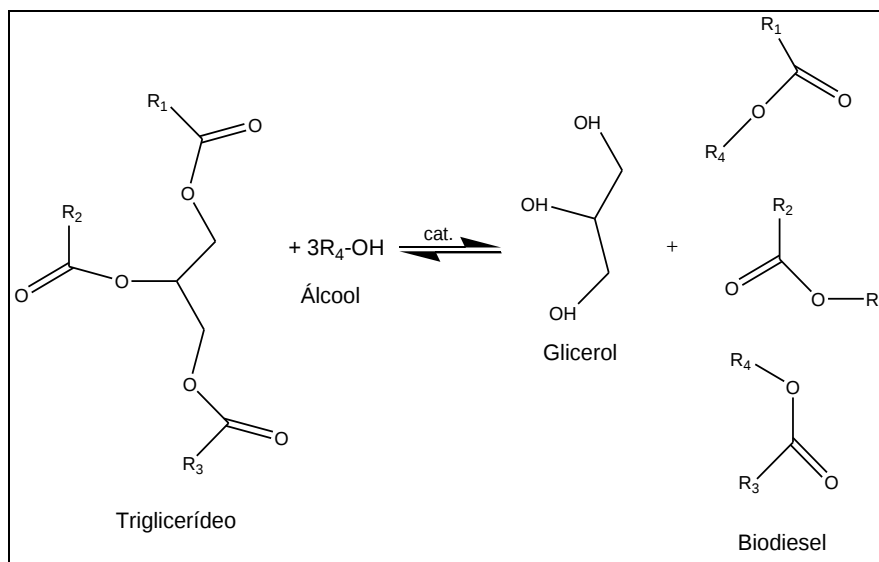


Figura 4 – Esquema da reação de transesterificação de triglicerídeos. R₁, R₂, R₃ e R₄ = cadeias hidrocarbônicas. (LÔBO, FERREIRA e CRUZ, 2009).

Industrialmente, o biodiesel ainda é em grande parte produzido por catálise alcalina em meio homogêneo (CORDEIRO *et al.*, 2011), utilizando principalmente NaOH e KOH (VICENTE, MARTINS e ARACIL, 2004). Catalisadores ácidos, tais como H₂SO₄, H₃PO₄, BF₃, HCl e ácidos orgânicos sulfônicos, também podem ser utilizados como catalisadores homogêneos para produção do biodiesel (LOTTERO *et al.*, 2005), sendo particularmente interessantes para a síntese de biodiesel a partir de matérias-primas associadas a altos teores de ácidos graxos livres e água (p. ex. óleo de fritura residual), uma vez que tem a capacidade de catalisar simultaneamente esterificação e transesterificação (VYAS, VERMA e SUBRAHMANYAM, 2010).

A escolha da matéria-prima ideal para a produção de biodiesel é de suma importância, uma vez que o correto balanço entre ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados resulta em características ideais para este biocombustível. Sabe-se que ésteres monoalquílicos de ácidos graxos com cadeias hidrocarbônicas saturadas de C16 (palmítico) e C18 (esteárico), tem uma tendência

maior a se solidificarem a baixa temperatura do que as cadeias de até 18 carbonos com uma ou mais insaturações podendo, portanto, tornar o biodiesel impróprio para o uso em climas frios. Todavia, essa característica não elimina a possibilidade de uso dos ésteres com cadeias saturadas serem utilizados na produção de biodiesel, mas limita seu uso em forma pura ou em misturas maiores que B20 apenas a climas tropicais (DABDOUB, BRONZEL e RAMPIN, 2009). Em contrapartida, a presença de teores elevados de ácido linolênico (C18:3) ou ácidos graxos com 4 ou mais insaturações no óleo resultará em uma tendência muito elevada a se oxidarem (KNOTHE *et al.*, 2006), o que pode levar a formação de compostos que tornariam o biodiesel impróprio. Sendo assim, um balanceamento entre ácidos graxos saturados e ácidos graxos insaturados poderia resultar em características ideais para este biocombustível.

A maior parte do biodiesel atualmente produzido no mundo deriva do óleo de soja, porém, tradicionalmente, todos os óleos vegetais enquadrados na categoria de óleos fixos ou triglicerídeos podem ser transformados em biodiesel (FERRARI, OLIVEIRA e SCABIO, 2005). No Brasil existem várias espécies vegetais em abundância que podem ser utilizadas para fabricação do biodiesel, tais como soja, correspondente a 69,6% do total de óleo utilizado na produção deste biocombustível no ano de 2012, além de mamona, dendê (palma), girassol, babaçu, amendoim, pinhão manso, milho, algodão dentre outras. Matérias primas de origem animal também podem ser utilizadas, sendo o sebo bovino correspondente a 14,7% do total de óleo utilizado na produção de biodiesel em 2012, atrás apenas do óleo de soja (BRASIL, 2013; SANTOS e PINTO, 2009).

3.3 Algas

O termo alga não tem valor taxonômico (LOURENÇO, 2006), englobando organismos com clorofila e outros pigmentos fotossintéticos, os quais são capazes de realizar a fotossíntese oxigênica, e sua caracterização (sistemática) implica a consideração de uma série de critérios. No passado eram consideradas plantas, porém não possuem folhas, raízes ou mesmo tecidos vasculares. Atualmente neste grupo estão também incluídos organismos com estruturas celulares procarióticas e

eucarióticas, que, apesar das diferenças estruturais e morfológicas entre os representantes de cada divisão, são fisiologicamente similares e apresentam um metabolismo análogo àquele das plantas (ABALDE *et al.*, 1995; BENEMANN, 1997; HOEK, MANN e JAHNS, 1995; RAVEN, EVERT e EICHHORN, 2001).

Basicamente, todas as utilizações comerciais das algas estão relacionadas, além da sua capacidade de crescer rapidamente, à sua composição química, que sofre variações em resposta às condições de cultivo (intensidade luminosa, a temperatura e a composição química do meio de cultura). Essa característica permite explorar de forma conveniente esta variabilidade, pois é viável cultivar algas de forma a aumentar a concentração de substâncias de interesse (LOURENÇO, 2006). Desta forma, as algas vem sendo aproveitadas em atividades econômicas (PULZ e GROSS, 2004).

Nos últimos anos, vem crescendo um grande interesse na utilização de algas para produção de biocombustíveis, especialmente biodiesel, uma vez que, aliado ao fato de ser uma grande fonte de energia renovável, a produtividade de óleos por algas tem sido descrita como sendo substancialmente superior ao observado com as culturas de oleaginosas convencionais, podendo algumas delas acumular grandes quantidades de triacilgliceróis, embora o teor em óleo varie com a espécie de alga utilizada e com as condições e meio de cultivo (MATA, MARTINS e CAETANO, 2010; SCOTT *et al.*, 2010). O seu elevado potencial de produção de óleo por unidade de área faz com que muitos pesquisadores classifiquem as algas como a única fonte de lipídeos/biodiesel capaz de substituir completamente o diesel fóssil (SHEEHAN *et al.*, 1998; TEIXEIRA e MORALES, sem data).

3.3.1 Produção de biodiesel a partir de biomassa de algas

Transesterificação de óleos para produção de biodiesel utilizando catalisador básico é o método atual de preferência usado por grandes usinas de biodiesel comerciais, devido à alta eficiência e baixo custo de catalisador (DAROCH, GENG e WANG, 2013). Contudo, para produção de biodiesel a partir de biomassa algal, a utilização de catalisadores alcalinos não é recomendada, uma vez que a principal desvantagem do método é a formação de sabão na reação entre os ácidos graxos

livres e o catalisador básico. O teor de ácidos graxos livres de algumas espécies de algas pode alcançar taxas de 35,1% (HAAS e WAGNER, 2011), muito superiores ao limite de 3% recomendado para catálise alcalina (VYAS, VERMA e SUBRAHMANYAM, 2010). Catalisadores ácidos, por sua vez, tem a vantagem de catalisar simultaneamente a transesterificação de acilgliceróis e a esterificação de ácidos graxos livres, aumentando, assim, o rendimento teórico global da reação e permitindo a utilização de espécies que contêm alto conteúdo de ácidos graxos livres (VYAS, VERMA e SUBRAHMANYAM, 2010).

Tradicionalmente, a produção de biodiesel compreende duas etapas: extração de óleo, geralmente com um solvente ou uma combinação de solventes (BELARBI, MOLINA e CHISTY, 2000; FAJARDO *et al.*, 2007), e subsequente transesterificação com álcool e catalisador. Esta sequencia usualmente utilizada na produção de biodiesel de algas é mostrada na Figura 5.

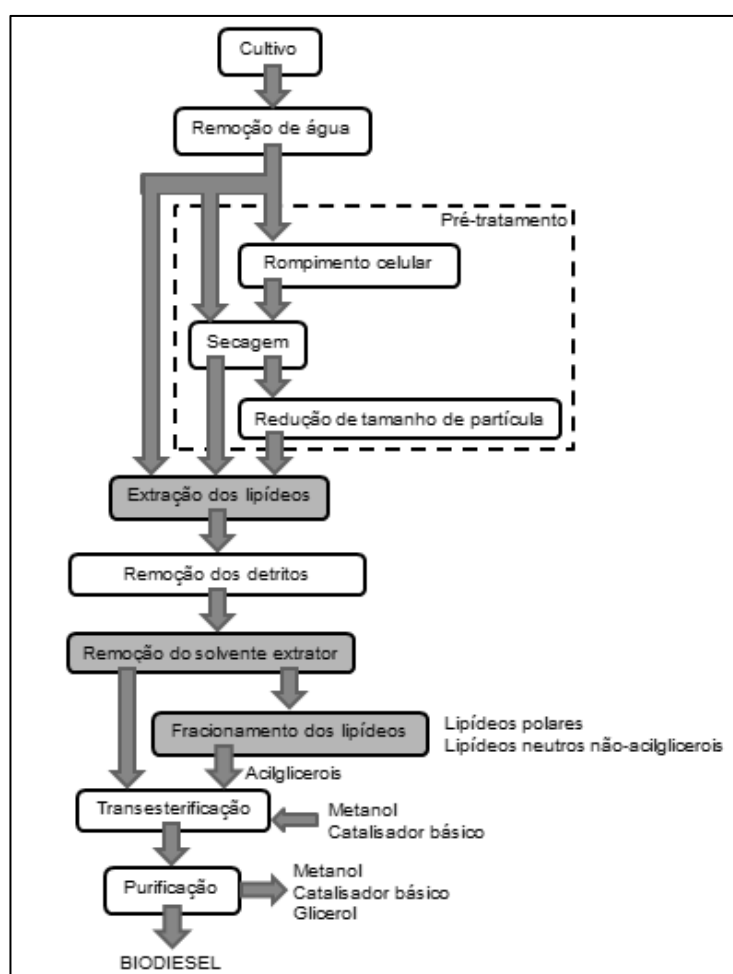


Figura 5 – Fluxograma do processo tradicional com duas etapas: extração e posterior transesterificação de ácidos graxos de algas. Adaptado de Halim, Danquah e Webley (2012). As etapas escurecidas não estão presentes na sequencia alternativa apresentada na Figura 6.

Uma abordagem alternativa chamada esterificação/transesterificação direta ou *in-situ* é um conceito de uma etapa em que o biodiesel é sintetizado diretamente da biomassa de algas, através da esterificação de ácidos graxos livres e da transesterificação dos acilglicerois (DAROCH, GENG e WANG, 2013; LI *et al.*, 2011; WAHLEN, WILLIS e SEEFELDT, 2011). Associada a diversas melhoras no rendimento da produção de biodiesel a partir de variadas matrizes em comparação com a abordagem tradicional, esta metodologia combina a extração e esterificação de lipídeos em um único passo, simplificando assim o processo necessário para a produção de biodiesel a partir da biomassa de algas (HALIM, DANQUAH e WEBLEY, 2012). Esta nova proposta, mostrada na Figura 6, envolve a adição simultânea de metanol e um catalisador ácido a biomassa de algas (geralmente na forma de pó seco). O metanol extrai os lipídeos da biomassa das algas e, catalisado por ácido, sequencialmente transesterifica ou esterifica os lipídeos extraídos para produzir ésteres metílicos de ácidos graxos (biodiesel).

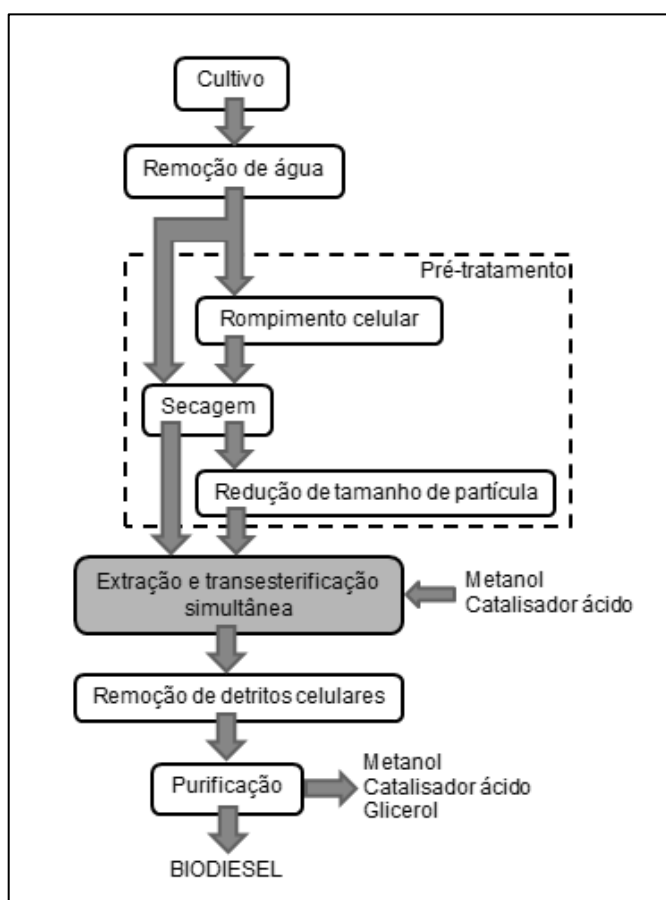


Figura 6 – Processo alternativo, com extração e transesterificação simultâneas de lipídeos de algas. Adaptado de Halim, Danquah e Webley (2012).

Nos últimos anos, diversos trabalhos vem sendo publicados mostrando o aprimoramento de metodologias para síntese de biodiesel derivado do óleo de algas (Tabela 2).

Afify, Shalaby e Shanab (2010), investigaram o potencial de oito algas para produção de biodiesel: quatro macroalgas rodófitas (*Gelidium latifolium*, *Asparagopsis taxiformis*, *Galaxaura oblongata* e *Jania rubens*), uma macroalga clorófita (*Ulva lactuca*), uma macroalga heterocontófitas (*Colpomenia sinuosa*), uma microalga clorófita (*Dictyochloropsis splendida*) e uma cianobactéria (*Spirulina platensis*). Os autores utilizaram dois sistemas de solventes extratores: hexano/éter de petróleo, que resultou em baixas recuperações de lipídeos; e Clorofórmio/Metanol, que se provou ser mais eficiente para extração de lipídeos, dependendo da espécie de alga. O óleo extraído das amostras foi, então, transesterificado com NaOH e metanol. Os rendimentos de biodiesel obtidos variaram entre 0,25% e 8,75%, dependendo da espécie empregada.

A metodologia de extração com o sistema de solventes clorofórmio/metanol, seguida de transesterificação com NaOH em metanol também foi utilizada por Olivieri *et al.* (2011) ao estudar a microalga clorófita *Stichococcus bacillaris*, que, segundo os autores, se mostrou uma potencial espécie para produção de biodiesel em larga escala.

Vijayaraghavan e Hemanathan (2009) utilizaram como matéria-prima uma cultura mista selvagem não identificada. O biodiesel foi sintetizado a partir do óleo pré-extraído com hexano, ao qual foi adicionado metanol e KOH para conduzir a transesterificação. Esta investigação comprovou o sucesso da implantação de uma produção de biodiesel a partir de algas sem pré-tratamento, uma vez que o biodiesel obtido experimentalmente foi comparável, em qualidade, com o biodiesel convencional.

Duas cianobactérias (*Aphanothece microscopica* e *Phormidium sp.*) três microalgas clorófitas (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* e *Dunaliella tertiolecta*) e uma microalga parda (*Phaeodactylum tricornutum*) foram estudadas por Francisco *et al.* (2010). Os lipídeos foram extraídos com o sistema de solventes clorofórmio/metanol e transesterificados NaOH em metanol (catálise básica), seguida de H₂SO₄/Metanol/ NH₄Cl (catálise ácida). As características físico-químicas do biodiesel obtido atenderam as especificações normativas brasileira, americana, europeia e australiana.

Tabela 2 – Solventes e catalisadores utilizados na síntese de biodiesel de algas. [&]*Rhodophyta*; ^{\$}*Chlorophyta*; [@]*Heterokontophyta*; ^{*}*Cyanobacteria*.

ALGAS UTILIZADAS	EXTRAÇÃO DO ÓLEO	SÍNTESE DE BIODIESEL	AUTORES
<i>Asparagopsis taxiformis</i> ^{&} <i>Colpomenia sinuosa</i> [@] <i>Dictyochloropsis splendida</i> ^{\$} <i>Galaxaura oblongata</i> ^{&} <i>Gelidium latifolium</i> ^{&} <i>Jania rubens</i> ^{&} <i>Spirulina platensis</i> [*] <i>Ulva lactuca</i> ^{\$}	Clorofórmio/Metanol Hexano/Éter de petróleo	NaOH/Metanol	AFIFY, SHALABY e SHANAB (2010)
<i>Stichococcus bacillaris</i> ^{\$} Cultura mista selvagem	Clorofórmio/Metanol Hexano	NaOH/Metanol KOH/Etanol	OLIVIERI <i>et al.</i> (2011) VIJAYARAGHAVAN e HEMANATHAN (2009)
<i>Aphanothece microscopica</i> [*] <i>Chlorella vulgaris</i> ^{\$} <i>Dunaliella tertiolecta</i> ^{\$} <i>Phaeodactylum tricornutum</i> [@] <i>Phormidium sp.</i> [*] <i>Scenedesmus obliquus</i> ^{\$}	Clorofórmio/Metanol	NaOH/Metanol, seguido de NH ₄ Cl/Metanol/H ₂ SO ₄	FRANCISCO <i>et al.</i> (2010)
<i>Hypnea musciformis</i> ^{&} <i>Sargassum cymosum</i> [@] <i>Ulva lactuca</i> ^{\$}	Clorofórmio/Metanol Ácido pirogálico/Etanol/HCl Metanol	BF ₃ /Metanol HCl/Metanol	MARTINS, YOKOYA e COLEPICOLO (2012)
<i>Enteromorpha compressa</i> ^{\$}	Éter dietílico/Diclorometano/Hexano	H ₂ SO ₄ /Metanol seguido de NaOH/Metanol	SUGANYA, GANDHI e RENGANATHAN (2013)
<i>Chlorella protothecoides</i> ^{\$}	Hexano	H ₂ SO ₄ /Metanol	MIAO e WU (2005)
<i>Schizochytrium limacinum</i> [@]	Clorofórmio/Metanol	H ₂ SO ₄ /Clorofórmio/Metanol	JOHNSON e WEN (2009)
<i>Schizochytrium limacinum</i> [@]	Sem extração prévia do óleo	H ₂ SO ₄ /Metanol/Clorofórmio H ₂ SO ₄ /Metanol/Hexano H ₂ SO ₄ /Metanol/Éter de petróleo H ₂ SO ₄ /Metanol	JOHNSON e WEN (2009)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> ^{\$}	Sem extração prévia do óleo	H ₂ SO ₄ /Metanol/Hexano	LI <i>et al.</i> (2010)

Continuação da Tabela 2 - Solventes e catalisadores utilizados na síntese de biodiesel de algas. & *Rhodophyta*; \$ *Chlorophyta*; @ *Heterokontophyta*; * *Cyanobacteria*.

<i>Chlorella pyrenoidosa</i> ^{\$}	Sem extração prévia do óleo	H ₂ SO ₄ /Metanol	D'OCA <i>et al.</i> (2011)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> ^{\$}	Clorofórmio/Metanol Etanol	H ₂ SO ₄ /Metanol	D'OCA <i>et al.</i> (2011)
Cultura mista (<i>Pelvetia canaliculata</i> [@] + <i>Fucus spiralis</i> [@])	Sem extração prévia do óleo	NaOH/Metanol/Hexano	MACEIRAS <i>et al.</i> (2011)
<i>Chlorella sp.</i> ^{\$}	Sem extração prévia do óleo	H ₂ SO ₄ /Metanol	EHIMEN, SUN e CARRINGTON (2010)
<i>Chlorella vulgaris</i> ^{\$}	Sem extração prévia do óleo	H ₂ SO ₄ /Metanol/Clorofórmio	HOBUSS <i>et al.</i> (2011)
<i>Nannochloropsis sp.</i> [@]	Sem extração prévia do óleo	SrO/Metanol/Clorofórmio	KOBERG <i>et al.</i> (2011)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> [@] <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ^{\$} <i>Chlorella vulgaris</i> ^{\$}	Clorofórmio	HCl/Metanol	LOHMAN <i>et al.</i> (2013)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> [@] <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ^{\$} <i>Chlorella vulgaris</i> ^{\$}	Sem extração prévia do óleo	NaOH/Tolueno/Metanol seguido de BF ₃ /Metanol	LOHMAN <i>et al.</i> (2013)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> [@] <i>Tetraselmis suecica</i> ^{\$} <i>Neochloris oleoabundans</i> ^{\$} <i>Chlorella sorokiniana</i> ^{\$} <i>Synechocystis sp.</i> [*] <i>Synechococcus elongates</i> [*]	Sem extração prévia do óleo	H ₂ SO ₄ /Metanol	WAHLEN, WILLIS e SEEFELDT (2010)
<i>Chaetoceros gracilis</i> [@]	Sem extração prévia do óleo	H ₂ SO ₄ /Metanol H ₂ SO ₄ /Etanol H ₂ SO ₄ /1-Butanol H ₂ SO ₄ /2-metil-1-propanol H ₂ SO ₄ /3-metil-1-butanol	WAHLEN, WILLIS e SEEFELDT (2010)

Suganya, Gandhi e Renganathan (2013) também utilizaram catálise mista para obtenção de biodiesel a partir de óleo de *Enteromorpha compressa* (clorófita), previamente extraído com o sistema de solventes éter dietílico/diclorometano/hexano. Posteriormente, foi adicionado H₂SO₄ em metanol, seguido de NaOH em metanol. Esta metodologia resultou em um rendimento de biodiesel de 90,6%.

Martins, Yokoya e Colepicolo (2012) também investigaram a catálise ácida para produção de biodiesel a partir de óleo das algas *Hypnea musciformis*, *Sargassum cymosum* (rodófitas) e *Ulva lactuca* (clorófita). Foram testados três metodologias de extração: utilizando metanol, o sistema de solventes clorofórmio/metanol e o sistema Ácido pirogálico em etanol/HCl; e duas de transesterificação: BF₃/metanol ou HCl/metanol. A partir deste estudo os autores concluíram que o melhor método para uma espécie não é, necessariamente, o mesmo para as outras espécies.

Johnson e Wen (2009) utilizaram biomassa de *Schizochytrium limacinum* (heterocontófito) e testaram diferentes formas de obtenção de biodiesel: extração com clorofórmio/metanol, seguida de transesterificação com ácido sulfúrico em clorofórmio e metanol; e transesterificação diretamente da biomassa, utilizando: ácido sulfúrico/clorofórmio/metanol, ácido sulfúrico/hexano/metanol, ácido sulfúrico/éter de petróleo/metanol e ácido sulfúrico/metanol. A metodologia com extração seguida de transesterificação obteve um rendimento de biodiesel de 59%, percentagem semelhante à obtida empregando-se o sistema ácido sulfúrico/éter de petróleo/metanol na transesterificação direta. Os sistemas ácido sulfúrico/clorofórmio/metanol e ácido sulfúrico/hexano/metanol obtiveram rendimentos de biodiesel de mais de 65%, enquanto empregando-se apenas ácido sulfúrico/metanol resultou em um rendimento de biodiesel menor de 10%, indicando que a presença de solvente adicional é essencial para a reação.

Chlorella pyrenoidosa foi utilizada por Li *et al.* (2010) para obtenção de biodiesel por transesterificação direta com catálise ácida utilizando ácido sulfúrico, metanol e hexano. Nas condições de síntese estudadas, o rendimento de biodiesel alcançou 95%. Ehimen, Sun e Carrington (2010) obtiveram rendimento de biodiesel de 92% a partir da transesterificação direta da biomassa de *Chlorella sp.*, utilizando ácido sulfúrico em metanol, em condições específicas de reação. Maceiras *et al.* (2011) utilizaram uma mistura de algas pardas marinhas (*Fucus spiralis* e *Pelvetia*

canaliculata) na transesterificação *in-situ* com catálise básica, utilizando o sistema hidróxido de sódio/metanol/hexano. O rendimento de biodiesel variou entre 1,6 e 11,5%, dependendo das condições de reação empregadas.

Uma técnica que tem atraído atenção devido a sua aplicação como uma alternativa sustentável na realização de reações químicas é a sonoquímica (HOBUSS *et al.*, 2012). O ultrassom é um fenômeno físico baseado na cavitação, um processo que envolve a criação, aumento e implosão de cavidades de vapor em um líquido promovendo efeitos energizantes em reações químicas (NEUENFELDT *et al.*, 2011; SUSLICK, 1989).

A utilização de ondas ultrassônicas, tanto na etapa de extração como na etapa de esterificação e/ou transesterificação dos óleos pré-extraídos, bem como na síntese de biodiesel diretamente da biomassa, tem sido relatada como determinante na obtenção de maiores rendimentos de extração e/ou maiores percentagens de conversão de óleos a ésteres de ácidos graxos (KOBBERG, *et al.*, 2011; TOMA, *et al.*, 2001).

D'Oca *et al.* (2011) utilizaram biomassa de *Chlorella pyrenoidosa* e realizaram diversos testes de extração de lipídeos, comparando a eficiência do emprego de agitação magnética e sonicação frente aos solventes clorofórmio/metanol, metanol, clorofórmio, etanol e hexano. Como resultado, consideraram ambas as técnicas eficientes na extração de várias classes de lipídeos presentes na biomassa algal. Adicionalmente, os mesmos autores sintetizaram biodiesel utilizando sistema com catálise ácida (ácido sulfúrico/metanol), tanto com prévia extração dos óleos (com clorofórmio/metanol, metanol ou etanol), como por transesterificação direta (com adição de clorofórmio, hexano, éter de petróleo ou nenhum solvente). A transesterificação direta com adição de solvente resultou em um alto rendimento de biodiesel se comparado com o procedimento sem solventes adicionais, indicando que o solvente é essencial para a reação. A extração seguida de transesterificação também resultou em altos rendimentos de biodiesel. De uma maneira geral, as percentagens de rendimento de biodiesel situaram-se entre 5-10%.

Hobuss *et al.* (2011) utilizaram biomassa de *Chlorella sp.* para síntese de biodiesel via transesterificação direta assistida por ultrassom, empregando o sistema ácido sulfúrico/metanol/clorofórmio à temperatura ambiente. Esta metodologia promoveu a síntese de biodiesel em um tempo significativamente mais curto.

Koberg *et al.* (2011) testaram o uso de micro-ondas e ultrassom para extração de óleos de *Nannochloropsis sp.*, empregando a mistura clorofórmio/metanol. A síntese de biodiesel a partir do óleo pré-extraído e da biomassa pura (transesterificação direta) foi feita também com o uso de micro-ondas, ultrassom ou agitação e aquecimento, com a mistura clorofórmio/metanol e utilizando o catalisador sólido óxido de estrôncio (SrO). As reações feitas em ultrassom resultaram em rendimento de biodiesel de 18,9% e 20,9% para as metodologias de duas e uma etapas, respectivamente. Estes resultados revelaram a eficiência da sonoquímica para a aceleração e aumento do rendimento da reação de transesterificação em comparação com a reação controle, de uma etapa (agitação e aquecimento), que resultou em um rendimento de biodiesel de 2,9%.

4 METODOLOGIA

4.1 Algas utilizadas

Neste estudo foi utilizada biomassa seca da macroalga rodófito *Palisada furcata* e das cianobactérias *Chroococcales sp.*, *Phormidium sp.* e *Pseudanabaena sp.* (ver classificação taxonômica no Apêndice A).

A elucidação do perfil de ácidos graxos da macroalga *Palisada furcata* foi importante ao passo que não existem estudos relativos a composição química desta espécie. Aliado ao fato de que esta é uma macroalga endêmica brasileira, de ocorrência comum em litorais quentes e com grande disponibilidade de biomassa, a identificação de compostos de interesse para aplicações biotecnológicas torna-se essencial para a investigação e aplicação desta espécie como matéria-prima em diferentes segmentos industriais. A amostra desta alga foi coletada no litoral da Paraíba, seca e pulverizada em moinho de facas tipo Willey (Biothec, modelo B-602).

Por sua vez, as cianobactérias sintetizam lipídeos sob condições ambientais adequadas, sendo uma excelente fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel (DENG, LI e FEI 2009). A biomassa de *Chroococcales sp.* e *Phormidium sp.* foi obtida a partir de cultivos existentes no Laboratório de Lipidômica e Bio-orgânica da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). As espécies, cultivadas em meio de cultivo Braun-Grunow padrão (BGN_P), foram filtradas com auxílio de bomba a vácuo (Prismatec, modelo 132B), secas em estufa com circulação de ar (Marconi, modelo MA035) a 25°C durante 72 horas e trituradas manualmente com auxílio de almofariz e pistilo.

A biomassa da cianobactéria *Pseudanabaena sp.*, cedida pelo Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto (Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo) congelada em ultrafreezer e liofilizada.

4.2 Extração e derivatização de ácidos graxos

Foi avaliada a eficiência de extração de lipídeos e ácidos graxos da macroalga *P. furcata* utilizando-se quatro diferentes solventes extratores. Todos os procedimentos foram realizados em ultrassom (Sonics, modelo VCX-500), com frequência total de 50/60 Hz e frequência ultrassônica de 20 kHz.

Pesou-se 1 g de biomassa seca adicionou-se separadamente 20 mL de: hexano (**amostra AG₁**), clorofórmio (**AG₂**), metanol (**AG₃**) ou etanol (**AG₄**). As amostras foram levadas a ultrassom, onde foram sonicadas por 30 min na amplitude 30%. Posteriormente, as amostras foram filtradas e secas em evaporador rotativo Büchi, com bomba de vácuo modelo V-700 e resfriador de destilação modelo B-741.

Para a análise dos ácidos graxos por cromatografia gasosa, é necessária a realização de uma reação de derivatização, que converte os ácidos graxos em seus ésteres correspondentes, de menor peso molecular, que podem ser analisados por CG-FID. A derivatização dos lipídeos previamente extraídos foi realizada conforme a metodologia de Metcalfe, Schmitz e Pelka (1966), adaptada para ultrassom, onde aos ácidos graxos extraídos foram acrescentados 27 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 mol.L⁻¹ em metanol e o meio sonificado em ultrassom por 2 min a amplitude de 30%, sendo após adicionados 33 mL de trifluoreto de Boro (BF₃) 20% em metanol e sonificado por mais 2 min, na mesma amplitude. As extrações dos ésteres foi feita em funil de separação com 15 mL de hexano e 35 mL de solução saturada de cloreto de sódio (NaCl), onde a fase aquosa foi descartada e a fase orgânica seca em sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e evaporada em rotaevaporador.

Como padrão comparativo, os ácidos graxos foram também extraídos conforme metodologia de Bligh e Dyer (1959) e derivatizados conforme a metodologia de Metcalfe, Schmitz e Pelka (1966) (**amostra AG₅**), metodologias consolidadas amplamente aceitas para extração e derivatização de ácidos graxos de biomassa algal. Para a extração, pesou-se 1 g de amostra seca, acrescentou-se 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol e 10 mL de sulfato de sódio 1,5%, e o meio reacional foi colocado em agitação por 30 minutos. Após, foi acrescentado mais 10 mL de clorofórmio e 10 mL de Na₂SO 1,5%, e o meio agitado brevemente. A amostra foi centrifugada a 300 rpm por 30 min em centrífuga Quimis, modelo Q222T. A fase clorofórmio (contendo os ácidos graxos) foi separada, seca com Na₂SO₄

anidro e evaporada em rotaevaporador. Os resíduos lipídicos previamente extraídos foram derivatizados acrescentando 4 mL de hidróxido de sódio (NaOH) $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ em metanol e o meio aquecido em banho-maria a 100°C por 5 minutos, sob agitação. Após, adicionou-se 5 mL de BF_3 20% em metanol, mantendo sob aquecimento e agitação por 2 minutos. Retirou-se o aquecimento e acrescentou-se 5 mL de solução saturada de cloreto de sódio (NaCl). A extração dos ésteres foi feita em funil de separação com 20 mL de hexano. A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica seca em sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e evaporada em rotaevaporador.

4.2.1 Procedimentos cromatográficos

A análise dos ésteres de ácidos graxos das amostras foi feita em triplicata por cromatografia gasosa, em equipamento marca Shimadzu, modelo GC-2010, equipado com injetor split/splitless, detector por ionização em chama (FID), autoinjeter AOC-20i e coluna RTX-WAX de dimensões 30m x 0,25mm x 0,25 μm (Restek Corporation) (ver as condições operacionais para as análises de perfil de ácidos graxos no Apêndice B), utilizando padrão interno nonadecanoato de metila (C19:0) e hexano como solvente. A análise qualitativa e quantitativa dos ésteres de ácidos graxos foi utilizando o método de comparação com o padrão FAME Mix 37 (Sigma-Aldrich), conforme os tempos de retenção mostrados na Figura 7, e área normalizada pelo programa GC Solution Postrum, sendo os resultados expressos em percentagem do composto em biomassa seca.

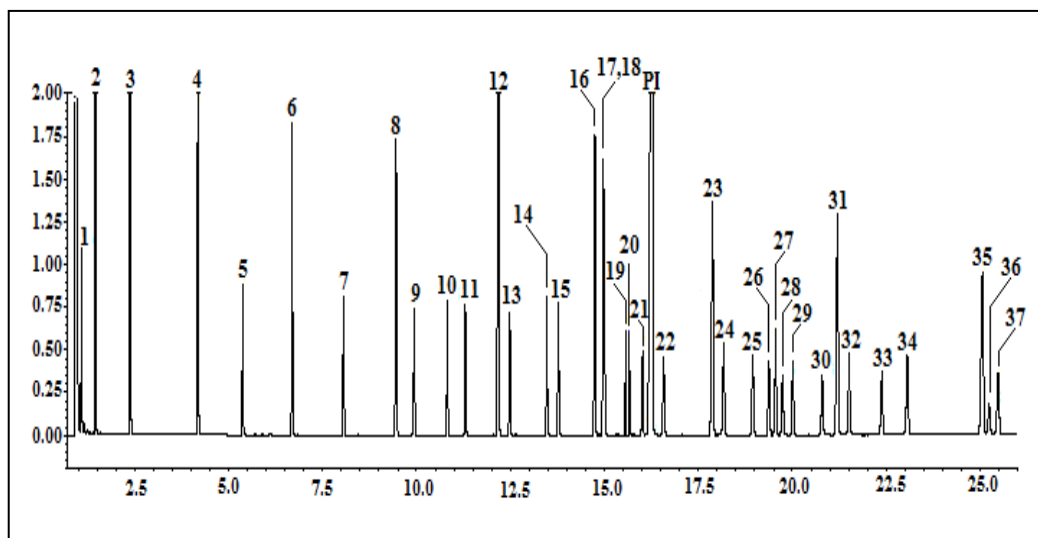


Figura 7 – Cromatograma do Padrão FAME MIX 37 (Sigma-Aldrich). A numeração indica: 1 (C4:0); 2 (C6:0); 3 (C8:0); 4 (C10:0); 5 (C11:0); 6 (C12:0); 7 (C13:0); 8 (C14:0); 9 (C14:1n5); 10 (C15:0); 11 (C15:1n-5); 12 (C16:0); 13 (C16:1n-7); 14 (C17:0); 15 (C17:1n-7); 16 (C18:0); 17 (C18:1n-9c); 18 (C18:1n-9t); 19 (C18:2n-6c); 20 (C18:2n-6t); 21 (C18:3n-6); PI (C19:0 - padrão interno); 22 (C18:3n-3); 23 (C20:0); 24 (C20:1n-9); 25 (C20:2n-6); 26 (C20:3n-6); 27 (C21:0); 28 (C20:4n-6); 29 (C20:3n-3); 30 (C20:5n-3); 31 (C22:0); 32 (C22:1n-9); 33 (C22:2n-6); 34 (C23:0); 35 (C24:0); 36 (C22:6n-3); 37 (C24:1n-9).

Para confirmação dos ésteres de ácidos graxos presentes na amostra, as mesmas foram analisadas em cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas, em equipamento marca Shimadzu, modelo GC-MS-QP 2010SE, equipado com auto injetor AOC-20i e coluna capilar RTX-5MS de dimensões 30m x 0,25mm x 0,25µm (Restek Corporation) (ver as condições operacionais para identificação dos compostos no Apêndice B). Os compostos presentes na amostra foram identificados através de comparação com a biblioteca NIST 8 do próprio equipamento.

4.3 Determinação do conteúdo lipídico total

As concentrações de lipídeos totais se baseiam na metodologia de Bligh e Dyer (1959), a partir da relação entre a quantidade de lipídeo extraído em 20 mL de clorofórmio, o volume de clorofórmio recuperado após a extração, e a massa total da amostra, conforme a equação:

$$\% \text{ de lipídeos totais} = \frac{P_{AE}}{\left(\frac{P_{AB} \times V_{CR}}{V_{CI}} \right)} \times 100$$

Onde:

P_{AE} é o peso de amostra extraída, em gramas

P_{AB} é o peso de amostra bruta, em gramas

V_{CR} é o volume de clorofórmio recuperado, em mililitros

V_{CI} é o volume de clorofórmio inicial utilizado (20 mL)

4.4 Síntese de biodiesel

Objetivando maiores rendimentos de reação, além de simplificação do processo e redução de custos, a síntese de biodiesel se deu por esterificação *in-situ*. A opção pela utilização do sistema clorofórmio/metanol se deu com base nos estudos de Johnson e Wen (2009) e D'Oca *et al.* (2011), que afirmam que, além do álcool (metanol), a presença de um solvente adicional é essencial para aumento do rendimento de reação. A catálise ácida, com ácido sulfúrico, foi selecionada com base nos resultados preliminares de extração, que indicaram uma maior quantidade de lipídeos polares e lipídeos apolares não-acilglicerois.

A metodologia selecionada, empregando ultrassom como promotor do rompimento celular (TOMA *et al.*, 2001) e da esterificação dos lipídeos, foi baseada em estudos preliminares realizados pelo nosso grupo de pesquisa em 2010, com estudo publicado em 2011 (HOBUSS, *et al.* 2011). A Figura 8 mostra um fluxograma exemplificando as etapas do processo adotado nesta pesquisa.

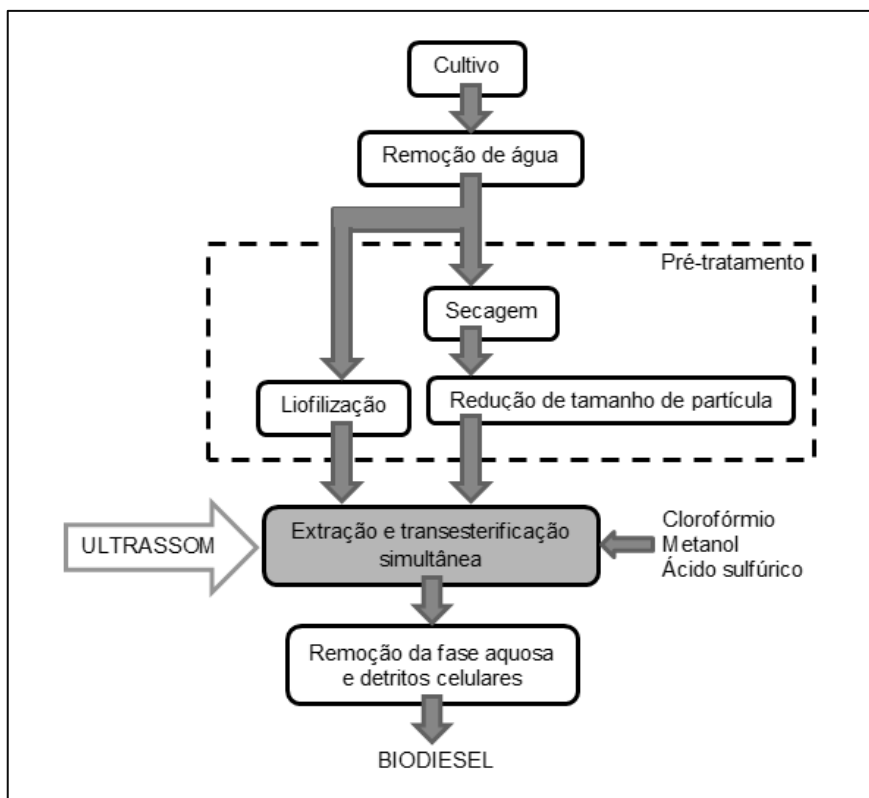


Figura 8 – Fluxograma das etapas do processo de esterificação *in-situ* utilizado neste estudo.

Biomassa seca das algas (1 g) foi misturada a 7 mL de metanol, 4 mL de clorofórmio e 1 mL de ácido sulfúrico e a mistura reacional foi sonicada por 30 min a 30% de amplitude (ultrassom marca SONICS modelo VCX-500 com frequência total de 50/60 Hz e frequência ultrassônica de 20 kHz). Depois de completa a reação, a amostra foi resfriada a temperatura ambiente e foram adicionados 10 mL de Na_2SO_4 1,5%, misturando brevemente. As amostras foram centrifugadas por 30 min a 3000 rpm para acelerar a separação de fases aquosa e orgânica, sendo a fase orgânica (contendo biodiesel) coletada e transferida para um balão previamente pesado e evaporada em rotaevaporador. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram, então, determinados por cromatografia gasosa.

Uma variação das quantidades de matéria prima e volume de reagentes foi realizada utilizando biomassa de *P. furcata* e *Phormidium sp.*, utilizando 5 g de biomassa seca, 18 mL de metanol, 10 mL de clorofórmio e 2 mL de ácido sulfúrico, sendo as demais etapas metodológicas iguais as descritas anteriormente.

4.4.1 Procedimentos cromatográficos

As amostras de biodiesel foram analisadas por cromatografia gasosa (CG-FID), em equipamento marca Shimadzu, modelo GC-2010, equipado com injetor split/splitless, detector por ionização em chama (FID), autoinjeter AOC-20i e coluna RTX-WAX 30m x 0,25mm x 0,25µm (Restek Corporation), segundo a norma EN 14103 (ver condições para análise cromatográfica no Anexo C), utilizando padrão interno heptadecanoato de metila (C17:0) e heptano como solvente. O perfil de ácidos graxos foi determinado através de comparação dos tempos de retenção com o padrão FAME Mix 37 (Sigma-Aldrich) (conforme Figura 7, na seção 4.2.1), sendo os resultados expressos em percentagem do composto em biomassa seca. A percentagem de conversão de ácidos graxos a ésteres de ácidos graxos (biodiesel) foi calculada através da seguinte equação:

$$\% \text{ de conversão} = \frac{(\Sigma A) - A_{EI}}{A_{EI}} \times \frac{C_{EI} \times V_{EI}}{m} \times 100$$

Onde:

ΣA é o total da área de picos dos ésteres metílicos C14:0 a C24:1

A_{EI} é o pico de área correspondente ao metil heptadecanoato

C_{EI} é a concentração, em mg.L^{-1} , da solução de metil heptadecanoato utilizada

V_{EI} é o volume, em mL, da solução de metil heptadecanoato utilizada

M é a massa utilizada de amostra em mg.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração e derivatização de ácidos graxos

Os rendimentos de extração e composição de ácidos graxos da macroalga *Palisada furcata* conforme o solvente extrator são mostrados na Tabela 3 (ver cromatogramas CG-FID e CG-MS nos Apêndices C e D, respectivamente).

Tabela 3 - Perfil de ácidos graxos da macroalga *Palisada furcata* conforme solvente extrator (média $\pm$ desvio padrão relativo).

	Hexano AG₁	Clorofórmio AG₂	Metanol AG₃	Etanol AG₄	Clorofórmio/Metanol AG₅
LIPÍDEOS (mg)	31,00	323,00	162,00	125,00	143,00
Ácidos graxos saturados (AGS) (%)					
C12:0	0,60 $\pm$ 0,03	0,39 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,02	0,60 $\pm$ 0,05
C14:0	6,21 $\pm$ 0,04	6,24 $\pm$ 0,01	8,84 $\pm$ 0,02	7,11 $\pm$ 0,01	6,43 $\pm$ 0,07
C15:0	0,98 $\pm$ 0,06	1,03 $\pm$ 0,11	0,70 $\pm$ 0,00	0,74 $\pm$ 0,00	0,70 $\pm$ 0,00
C16:0	52,06 $\pm$ 0,09	57,96 $\pm$ 0,18	65,72 $\pm$ 0,09	60,97 $\pm$ 0,09	57,26 $\pm$ 0,17
C17:0	1,61 $\pm$ 0,04	1,01 $\pm$ 0,08	0,22 $\pm$ 0,16	ND	0,42 $\pm$ 0,03
C18:0	8,30 $\pm$ 0,28	2,61 $\pm$ 0,02	0,98 $\pm$ 0,00	3,15 $\pm$ 0,00	5,47 $\pm$ 0,01
C22:0	1,06 $\pm$ 0,21	ND	ND	ND	0,25 $\pm$ 0,02
C24:0	ND	ND	ND	ND	0,89 $\pm$ 0,06
Σ AGS	70,81 $\pm$ 0,12	69,23 $\pm$ 0,16	76,74 $\pm$ 0,05	72,33 $\pm$ 0,12	72,02 $\pm$ 0,18
Ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) (%)					
C16:1	3,65 $\pm$ 0,06	4,78 $\pm$ 0,14	3,39 $\pm$ 0,02	4,23 $\pm$ 0,00	4,65 $\pm$ 0,11
C17:1	0,62 $\pm$ 0,03	0,56 $\pm$ 0,03	0,44 $\pm$ 0,01	0,67 $\pm$ 0,02	0,50 $\pm$ 0,06
C18:1n9c	11,62 $\pm$ 0,03	12,55 $\pm$ 0,09	9,67 $\pm$ 0,02	11,18 $\pm$ 0,03	9,74 $\pm$ 0,04
C18:1n9t	3,23 $\pm$ 0,04	4,53 $\pm$ 0,06	2,62 $\pm$ 0,01	3,94 $\pm$ 0,10	4,08 $\pm$ 0,06
Σ AGMI	19,11 $\pm$ 0,04	22,42 $\pm$ 0,18	16,12 $\pm$ 0,05	20,02 $\pm$ 0,11	18,96 $\pm$ 0,21
Ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) (%)					
C18:2n6c	2,78 $\pm$ 0,13	2,26 $\pm$ 0,02	1,17 $\pm$ 0,00	1,85 $\pm$ 0,01	4,76 $\pm$ 0,02
C18:3n3	0,46 $\pm$ 0,05	0,41 $\pm$ 0,02	0,23 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,02	0,80 $\pm$ 0,04
C20:4n6	3,33 $\pm$ 0,03	3,45 $\pm$ 0,00	3,30 $\pm$ 0,01	2,88 $\pm$ 0,00	2,05 $\pm$ 0,03
C20:5n3	2,67 $\pm$ 0,06	2,23 $\pm$ 0,01	2,42 $\pm$ 0,03	2,63 $\pm$ 0,00	1,42 $\pm$ 0,05
C22:2	0,83 $\pm$ 0,01	ND	ND	ND	ND
Σ AGPI	10,08 $\pm$ 0,16	8,35 $\pm$ 0,01	7,11 $\pm$ 0,03	7,65 $\pm$ 0,02	9,02 $\pm$ 0,05
Σ AGI	29,19 $\pm$ 0,12	30,78 $\pm$ 0,17	23,24 $\pm$ 0,05	27,67 $\pm$ 0,12	27,98 $\pm$ 0,21

ND = não detectado.

A metodologia para extração da porção lipídica empregando solventes orgânicos e assistência por ultrassom mostrou diferentes resultados de acordo com o solvente empregado. O método utilizando clorofórmio mostrou maior extração de lipídeos totais, seguido de metanol, clorofórmio/metanol (Bligh e Dyer), etanol e hexano. A eficiência inferior do hexano com relação aos demais solventes na extração de lipídeos totais permite concluir que a maioria de lipídeos constituintes da biomassa de *P. furcata* são polares ou apolares não acilglicerois.

Com relação a variedade de ácidos graxos extraídos, hexano e clorofórmio/metanol tiveram melhor desempenho, extraíndo 16 dos 17 ácidos graxos identificados para a macroalga *Palisada furcata*. As demais metodologias extraíram 14 dos 17 ácidos graxos, todavia, os ácidos graxos não identificados nestes casos foram encontrados apenas em pequenas quantidades nas demais condições de extração. A eficiência do hexano é relacionada ao fato deste ser solvente mais seletivo em relação a ácidos graxos, o que também explica o baixo percentual de extração de lipídeos totais. Já a mistura clorofórmio/metanol possui uma ampla faixa de polaridade, capaz de abranger diversas moléculas de ácidos graxos, o que explica a diversidade e quantidade de ácidos graxos extraídos.

A utilização das técnicas de cromatografia gasosa (CG-FID) e cromatografia gasosa com espectrometria de massas acoplada (CG-MS) permitiu identificar os principais ácidos graxos presentes nas amostras, apresentados na Figura 9.

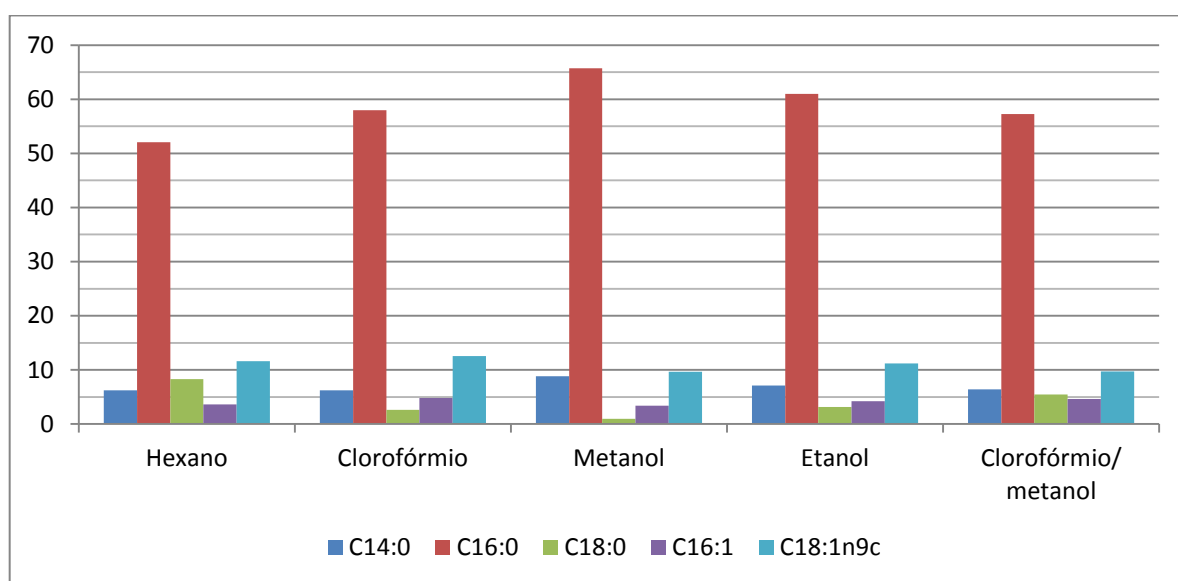


Figura 9 – Principais ácidos graxos presentes em *P. furcata* conforme solvente extrator (%).

Verificou-se a predominância de ácidos graxos saturados (AGS) para todos os solventes extratores utilizados, sendo o ácido hexadecanoico (palmítico, C16:0) o responsável por este predomínio, seguido de ácido tetradecanoico (mirístico, C14:0). Ainda, ácido octadecanoico (esteárico, C18:0) pode ser encontrado em quantidades significativas nas extrações promovidas por hexano e clorofórmio/metanol. Dentre os ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), há destaque para os ácidos octadecenoico (oleico, C18:1) e hexadecenoico (palmitoleico, C16:1).

Dentre os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) não aparece nenhum ácido graxo em grande quantidade, embora a presença dos ácidos eicosatetraenoico (araquidônico, C20:4 n-6) e eicosapentaenoico (EPA, C20:5 n-3) seja relevante (ver Tabela 3).

5.2 Determinação de do conteúdo lipídico total

O conteúdo lipídico total da macroalga *Palisada furcata* e das cianobactérias *Chroococcales sp.*, *Phormidium sp.* e *Pseudanabaena sp.*, quantificado gravimetricamente através da metodologia de Bligh e Dyer (1959) pode ser visto na Figura 10. Observa-se que a macroalga *P. furcata* apresentou o menor conteúdo lipídico total (1,5%), seguido de *Phormidium sp.* (5,12%), *Chroococcales sp.* (8,17%) e *Pseudanabaena sp.* (10,98%).

Segundo Bligh e Dyer (1959), a mistura de solventes extrativos clorofórmio/metanol apresenta uma ampla faixa de polaridade, onde podem ser extraídos lipídeos neutros e polares, tornando a extração lipídica das algas mais eficiente.

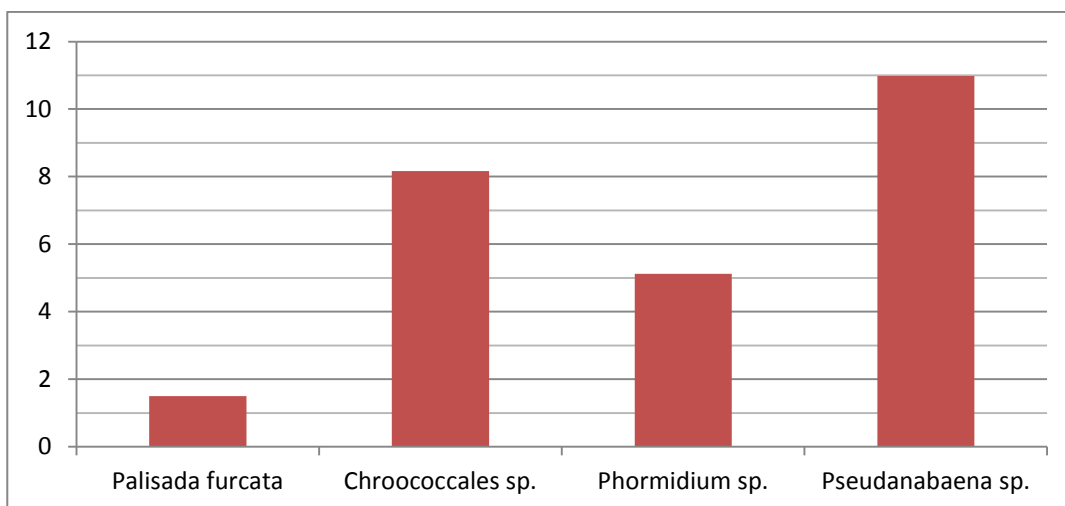


Figura 10 – Conteúdo lipídico total das algas estudadas (%).

5.3 Síntese de biodiesel

5.3.1 *Palisada furcata*

A conversão de ácidos graxos a biodiesel pode ser vista na Figura 11, onde se observa um aumento expressivo da percentagem de conversão em condições otimizadas de reação (maior quantidade de biomassa e reagentes, correspondentes a amostra **BD₂**).

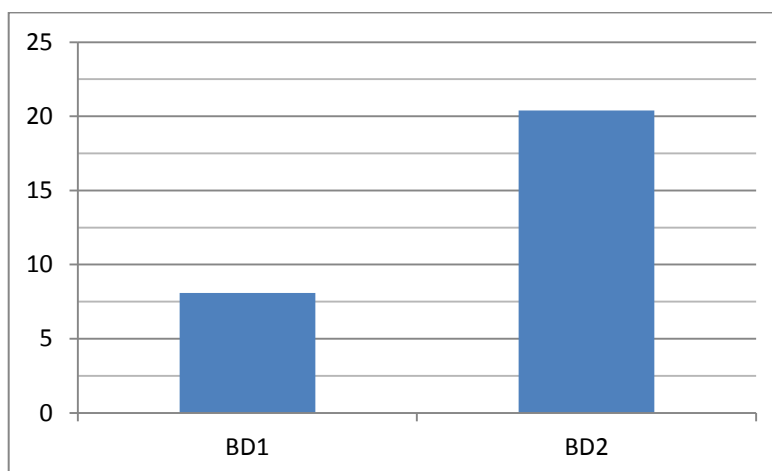


Figura 11 – Conversão de ácidos graxos da macroalga *P. furcata* a biodiesel (%).

Com relação a conversão de lipídeos a biodiesel, os resultados obtidos foram superiores aos descritos por Afify *et al.* (2011), que determinou percentagens de biodiesel variáveis entre 0,25% e 3,64% para as algas rodófitas utilizadas em seus estudos (*Asparagopsis taxiformis*, *Galaxaura oblongata*, *Gelidium latifolium* e *Jania rubens*). Cabe salientar que a metodologia utilizada pelos autores envolve a prévia extração do óleo com sistemas de solvente e sonicação, e subsequente transesterificação dos ácidos graxos com NaOH em metanol, utilizando a metodologia tradicional (agitação e aquecimento). Desta forma, a metodologia de transesterificação *in-situ* com catálise ácida assistida por ultrassom proposta neste estudo foi considerada eficiente para a síntese de biodiesel em microescala.

O perfil lipídico das amostras de biodiesel sintetizado estão descritos na Tabela 4 (ver cromatogramas de CG-FID no Apêndice F).

Tabela 4 - Perfil de ácidos graxos do biodiesel derivado da biomassa da macroalga *Palisada furcata*.

	1 g de amostra	5 g de amostra
	BD₁	BD₂
Ácidos graxos saturados (%)		
C12:0	0,40	0,39
C13:0	ND	0,23
C14:0	8,87	9,41
C15:0	0,79	0,86
C16:0	64,73	62,41
C18:0	1,53	2,05
C19:0	1,19	ND
C20:0	ND	0,36
C24:0	ND	0,40
Σ AGS	77,52	76,10
Ácidos graxos monoinsaturados (%)		
C16:1	7,53	7,41
C17:1	0,67	ND
C18:1n9c	9,20	9,66
C24:1n9	ND	0,21
Σ AGMI	17,39	17,29
Ácidos graxos poli-insaturados (%)		
C18:2n6c	1,65	1,17
C18:3n6	ND	0,29
C20:2	0,50	1,16
C20:4n6	1,70	2,40
C20:5n3	1,24	1,59
Σ AGPI	5,09	6,61
Σ AGI	22,48	23,90

ND = não detectado.

A composição em ácidos graxos do biodiesel não diferiu daquela encontrada no estudo preliminar de solventes extratores, assemelhando-se, sobretudo, à extração empregando metanol como solvente, o que pode ser observado na Figura 12. A Figura 12(a) demonstra o balanço entre as percentagens de ácidos graxos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) e poli-insaturados (AGPI) no biodiesel sintetizado a partir da biomassa de *P. furcata* (BD₂) em comparação com o estudo preliminar de solventes extratores empregando metanol. Adicionalmente, os principais ácidos graxos presentes no biodiesel sintetizado a partir da biomassa de *P. furcata* (BD₂) em comparação com o estudo preliminar de solventes extratores empregando metanol podem ser vistos na Figura 12(b).

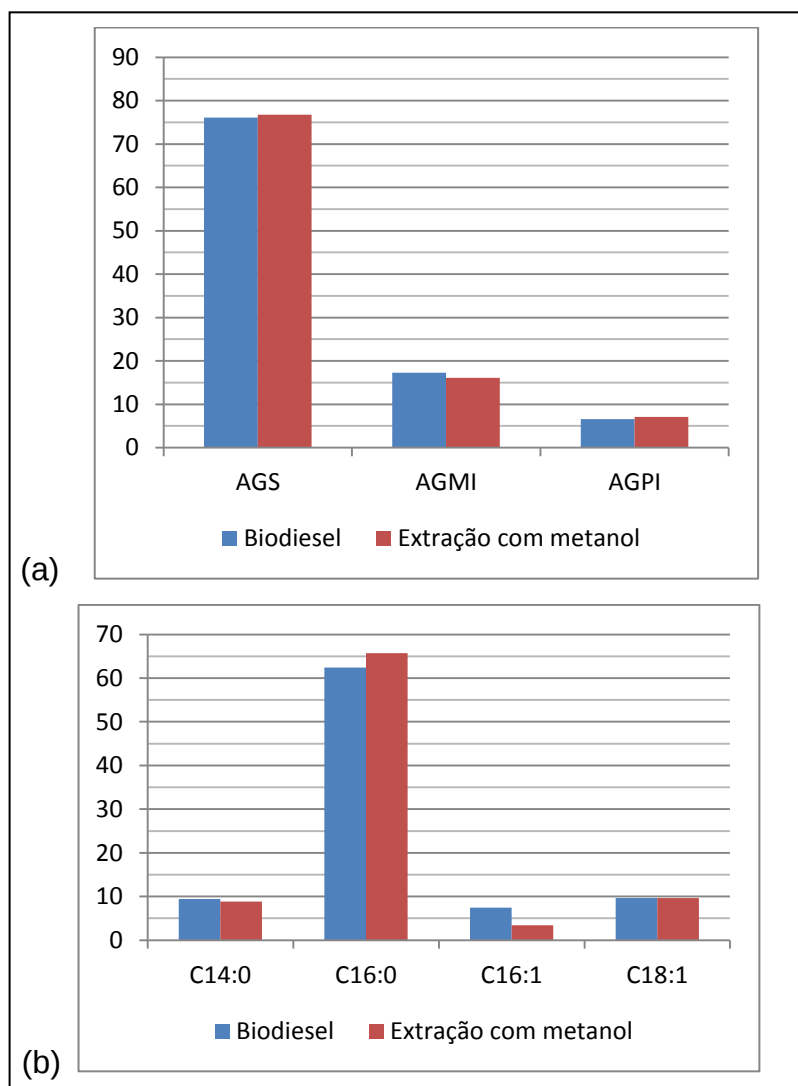


Figura 12 – (a) Balanço entre ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados e; (b) principais ácidos graxos presentes no biodiesel sintetizado a partir da biomassa de *P. furcata* (BD₂) em comparação com o estudo preliminar de solventes extratores empregando metanol.

Os ácidos hexadecanoico (palmítico, C16:0) e tetradecanoico (mirístico, C14:0) foram encontrados em maior quantidade dentre os ácidos graxos saturados. Quantidades semelhantes de ácidos hexadecenoico (palmitoleico, C16:1) e octadecenoico (oleico, C18:1) foram quantificadas dentre os ácidos graxos monoinsaturados.

Dentre os ácidos graxos poli-insaturados, foram determinadas baixas percentagens de variados ácidos graxos, cuja soma total, apesar de reduzida, foi significativa, sobretudo dos ácidos graxos com 4 e 5 insaturações (2,94% e 3,99% para BD₁ e BD₂, respectivamente – ver Tabela 4).

5.3.2 *Chroococcales* sp., *Phormidium* sp. e *Pseudanabaena* sp.

A conversão de ácidos graxos das cianobactérias *Chroococcales* sp., *Phormidium* sp. e *Pseudanabaena* sp. a biodiesel pode ser vista na Figura 13. Observou-se, para a cianobactéria *Phormidium* sp. (**amostras BD₃ e BD₄**), que o aumento da quantidade de biomassa e volume do sistema clorofórmio/metanol/H₂SO₄ (condição da **amostra BD₄**) não resultou em um incremento significativo do percentual de conversão de lipídeos a biodiesel. Desta forma, optou-se pela síntese de biodiesel das demais cianobactérias (*Pseudanabaena* sp. e *Chroococcales* sp.) utilizando quantidades reduzidas de biomassa e reagentes.

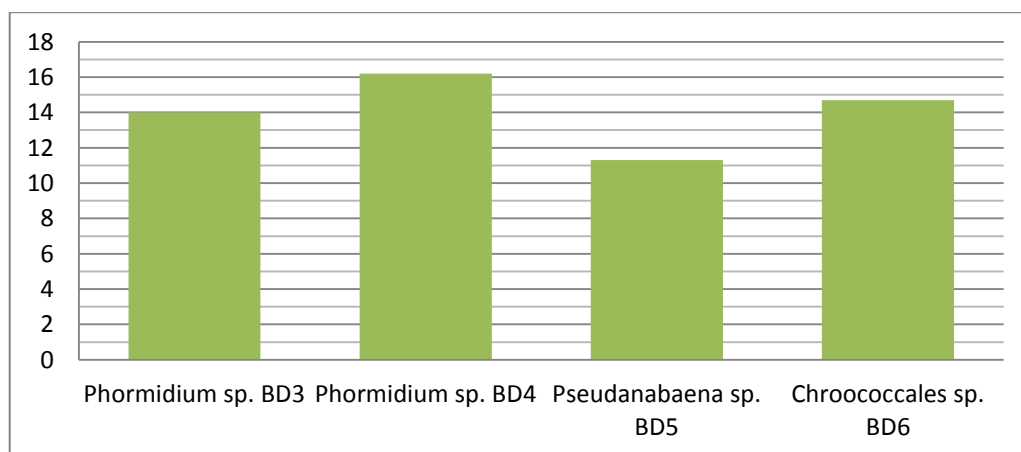


Figura 13 – Conversão de ácidos graxos das cianobactérias *Phormidium* sp., *Chroococcales* sp. e *Pseudanabaena* sp. a biodiesel (%).

Na Figura 14 pode ser visto o cromatograma (CG-FID) da análise quantitativa do biodiesel derivado da biomassa da cianobactéria *Pseudanabaena sp.* (BD₅), o qual apresenta 25 ácidos graxos, entre saturados, monoinsaturados e poli-insaturados. Grande parte destes ácidos graxos foi também identificada no biodiesel sintetizado a partir da biomassa das demais cianobactérias.

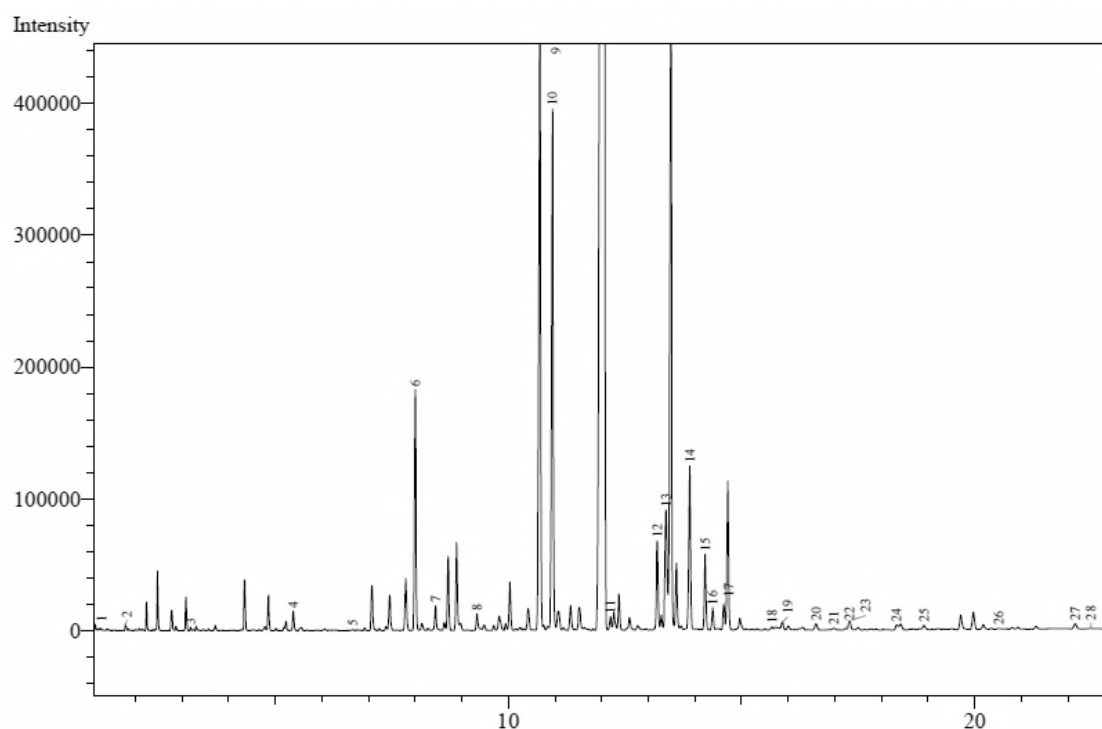


Figura 14 - Cromatograma de CG-FID do biodiesel derivado da biomassa da cianobactéria *Pseudanabaena sp.* A numeração indica: 1 (C6:0); 2 (C8:0); 3 (C10:0); 4 (C12:0); 5 (C13:0); 6 (C14:0); 7 (C14:1); 8 (C15:0); 9 (C16:0); 10 (C16:1); 11 (C17:1); 12 (C18:0); 13 (C18:1n-9c); 14 (C18:2n-6c); 15 (C18:3n-6); 16 (C19:0); 17 (C18:3n-3); 18 (C20:0); 19 (C20:1n-9); 20 (C20:2); 21 (C20:3n-6); 22 (C20:4n-6); 23 (C20:3n-3); 24 (C22:0); 25 (C24:0).

Os resultados obtidos na síntese de biodiesel a partir da biomassa de *Chroococcales sp.*, *Phormidium sp.* e *Pseudanabaena sp.* estão descritos na Tabela 5 (ver cromatogramas de CG-FID no Apêndice F).

Tabela 5 - Perfil de ácidos graxos do biodiesel derivado da biomassa das cianobactérias *Chroococcales sp.*, *Phormidium sp.* e *Pseudanabaena sp.*

	<i>Phormidium sp.</i>		<i>Pseudanabaena sp.</i>	<i>Chroococcales sp.</i>
	BD ₃	BD ₄	BD ₅	BD ₆
Ácidos graxos saturados (%)				
C6:0	ND	0,17	0,23	0,18
C8:0	ND	0,08	0,26	0,16
C10:0	ND	0,10	0,11	0,22
C12:0	0,69	0,52	7,11	0,86
C13:0	ND	ND	0,17	0,12
C14:0	3,81	3,69	10,03	9,89
C15:0	0,80	0,67	0,65	0,81
C16:0	33,85	32,64	25,18	31,74
C18:0	2,88	3,12	2,67	4,40
C19:0	0,92	ND	1,57	1,08
C20:0	ND	ND	0,29	0,33
C21:0	ND	ND	ND	0,24
C22:0	ND	0,98	0,50	0,58
C23:0	ND	ND	ND	0,32
C24:0	ND	0,65	0,28	0,61
Σ AGS	42,95	42,61	49,03	51,54
Ácidos graxos monoinsaturados (%)				
C14:1	0,44	0,60	14,29	1,28
C15:1	0,91	ND	ND	ND
C16:1	21,96	20,71	23,16	23,56
C17:1	0,85	1,29	0,55	0,83
C18:1n9c	15,81	16,18	7,90	7,09
C20:1n9	0,20	0,41	0,39	0,59
C24:1n9	ND	ND	ND	0,21
Σ AGMI	40,17	39,19	46,29	33,55
Ácidos graxos poli-insaturados (%)				
C18:2n6c	13,02	12,63	2,41	8,15
C18:3n3	2,18	2,40	0,23	1,32
C18:3n6	1,24	1,62	0,27	3,39
C20:2	0,44	0,62	0,47	0,59
C20:3n6	ND	0,42	0,35	0,30
C20:4n6	ND	0,50	0,38	0,71
C20:5n3	ND	ND	0,58	0,47
Σ AGPI	16,88	18,20	4,68	14,91
Σ AGI	57,05	57,39	50,97	48,46

ND = não detectado.

A Figura 15 mostra algumas características do biodiesel sintetizado a partir da biomassa de *Phormidium sp.* (BD₃), *Pseudanabaena sp.* (BD₅) e *Chroococcales sp.* (BD₆). A Figura 15(a) demonstra o balanço entre as percentagens de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados, e os principais ácidos graxos presentes nas amostras de biodiesel, em percentagem, podem ser vistos na Figura 15(b).

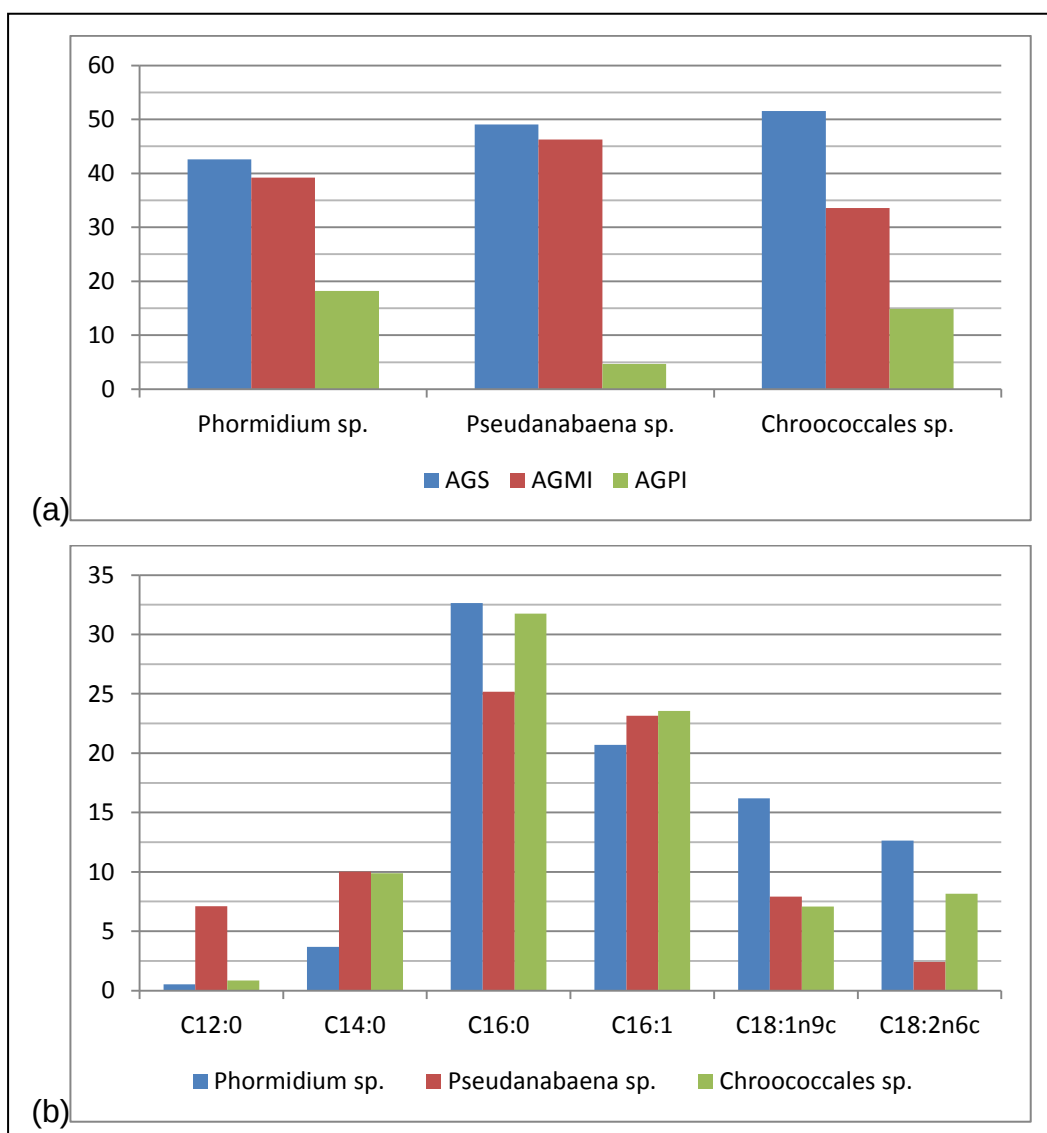


Figura 15 – (a) Balanço entre ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados e; (b) principais ácidos graxos presentes no biodiesel sintetizado a partir da biomassa de *Phormidium sp.* (BD₃), *Pseudanabaena sp.* (BD₅) e *Chroococcales sp.* (BD₆).

O biodiesel obtido a partir da biomassa de *Phormidium* sp. (**BD₃**) apresentou percentuais de ácidos graxos saturados (AGS) e ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) semelhantes, sendo o ácido hexadecanoico (palmítico, C16:0) o encontrado em maior quantidade dentre os saturados e os ácidos hexadecenoico (palmitoleico, C16:1) e octadecenoico (oleico, C18:1) predominantes entre os monoinsaturados. A percentagem total de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) quantificada alcançou 18%, principalmente devido a presença de ácido octadecadienoico (linoleico, C18:2). Este resultado foi divergente do encontrado por Francisco et al. (2010), que determinou um perfil de ácidos graxos com predominância de AGMI e baixas concentrações de AGPI. Duas espécies do gênero *Phormidium* foram investigadas por Sharathchandra e Rajashekhar (2011), havendo grandes divergências entre as espécies. *Phormidium purpurescens* apresentou conteúdo lipídico total de 26,45%, sendo 48,52% de AGS e 27,54% de AGI, enquanto *Phormidium ambiguum*, um conteúdo lipídico de 10,48%, possuindo 14,27% de AGS e não apresentou presença de AGI. Isto demonstra que mesmo algas do mesmo gênero podem ter composições divergentes dependendo das condições ambientais as quais estão submetidas.

Pseudanabaena sp. (**BD₅**) apresentou balanço entre AGS:AGMI semelhante de *Phormidium* sp. Ácidos hexadecanoico (palmítico, C16:0) e tetradecanoico (mirístico, C14:0) foram encontrados em maior quantidade dentre os saturados, e os ácidos hexadecenoico (palmitoleico, C16:1), tetradecenoico (C14:1) e octadecenoico (oleico, C18:1) foram os predominantes entre os monoinsaturados. O conteúdo de AGPI determinado foi pequeno e composto de baixos percentuais de diversos ácidos graxos, sendo o principal identificado o ácido octadecadienoico (linoleico, C18:2).

Chroococcales sp. (**BD₆**) apresentou predomínio de AGS, sendo os ácidos hexadecanoico (palmítico, C16:0) e tetradecanoico (mirístico, C14:0) encontrados em maior quantidade. Dentre os AGMI, os predominantes foram os ácidos hexadecenoico (palmitoleico, C16:1) e octadecenoico (oleico, C18:1). À semelhança de *Phormidium* sp., a quantidade de AGPI foi alta, sendo o ácido octadecadienoico (linoleico, C18:2) o AGPI predominante.

Cabe salientar que as cianobactérias *Phormidium* sp., *Pseudanabaena* sp. e *Chroococcales* sp. apresentam os três ácidos graxos considerados os principais em cianobactérias, conforme estudo de Sharathchandra e Rajashekhar (2011): ácido palmítico (C16:0) em teores variáveis entre 25% e 35%; ácido oleico (C18:1) em concentrações entre 7% e 35%; e ácido linoleico (C18:2) em percentagens variáveis

entre 2% e 13%. Adicionalmente, verificou-se expressiva presença de ácido palmitoleico (C16:1), em concentrações em torno de 20% em todas as cianobactérias estudadas.

A proporção AGS:AGMI:AGPI do biodiesel obtido nas amostras **BD₃**, **BD₄** e **BD₆** foi considerado proeminente para a produção de biodiesel. Todavia, a biomassa de *Pseudanabaena sp.* (**BD₅**) demonstra a composição mais adequada para a produção deste biocombustível, sobretudo com relação a sua utilização em regiões de climas frios, em função do seu elevado teor de ácidos graxos monoinsaturados, sendo, entretanto, necessários estudos relativos à estabilidade oxidativa do biodiesel obtido a partir de sua biomassa. Aliado a isto, o conteúdo lipídico total desta cianobactéria foi o maior dentre os quantificados, o que a torna viável como matéria-prima para a produção de biodiesel em larga escala.

6 CONCLUSÕES

O estudo de extração de ácidos graxos da macroalga *Palisada furcata* demonstrou que as metodologias utilizando clorofórmio e metanol resultaram em uma maior extração de lipídeos totais. Os perfis de ácidos graxos foram elucidados por CG-FID e CG-MS e demonstraram que não ocorreram variações significativas entre os perfis de ácidos graxos obtidos alterando-se o solvente extrator utilizado, havendo predominância de ácidos graxos saturados em todos os experimentos. Os principais ácidos graxos identificados foram o ácido palmítico dentre os saturados e ácido oleico dentre os insaturados. O biodiesel sintetizado a partir da biomassa da macroalga *P. furcata*, analisado por CG-FID, apresentou perfil de ácidos graxos semelhante ao obtido na extração empregando-se metanol.

O perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos constituintes do biodiesel obtido das cianobactérias *Chroococcales sp.*, *Phormidium sp.* e *Pseudanabaena sp.*, determinado por CG-FID, apresentou predominância de ácido palmítico dentre os saturados e dos ácidos palmitoleico e oleico dentre os monoinsaturados. Salienta-se o grande potencial de *Pseudanabaena sp.* em função de seu conteúdo lipídico total, o maior dentre os gêneros estudados, e seu balanço entre ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados, interessante para utilização em regiões de climas frios.

A metodologia empregada em microescala para extração e esterificação simultânea de ácidos graxos da biomassa das algas utilizadas foi considerada satisfatória, uma vez que as reações foram realizadas a temperatura ambiente, em um único passo direto da biomassa algal, reduzindo as etapas e proporcionando um baixo custo no processo.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- i. Comparação da metodologia empregada com a metodologia convencional;
- ii. Variação das condições operacionais da reação assistida por ultrassom;
- iii. Investigação do potencial de outras espécies de algas para a produção de biodiesel.

Referências

ABALDE, J., CID, A., FIDALGO, P., TORRES, E., HERRERO, C. **Microalgas: Cultivo y Aplicaciones**. España: Universidad de La Coruña, Monografía 26, 1995, 210 p.

AFIFY, E-M. M. R, SHALABY, E. A., SHANAB, S. M. M. Enhancement of biodiesel production from different species of algae. **Grasas y aceites**, v. 61, n. 4, p. 416-422. Oct-Dec 2010.

ALBARELLI, J. Q.; SANTOS, D. T.; HOLANDA, M. R. Energetic and economic evaluation of waste glycerol cogeneration in Brazil. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 4, p. 691-698, Oct-Dec 2011.

ALGAEBASE. Disponível em: <www.algaebase.org>. Acesso em: 12 fev. 2014.

BEATRIZ, A., ARAÚJO, Y. J. K., LIMA, D. P. Glicerol: um breve histórico e aplicações em sínteses estereosseletivas. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 13, 2011.

BELARBI, E. H., MOLINA, E., CHISTI, Y. A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 7, p. 516-529, 2000.

BENEMANN, J. R. CO₂ mitigation with microalgae systems. **Energy Conservation Management**, n. 38, p. 475-479, 1997.

BOROWITZKA, M. A. Products from microalgae. **Infofish International**, n. 5, p. 21-26, 1993.

BRASIL. Empresa de Pesquisa Energética. **Balanço Energético Nacional – Ano base 2012: Relatório síntese**. Rio de Janeiro: EPE, 2013. 55 p.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

CORDEIRO, C. S., SILVA, F. R. da, WYPYCH, F., RAMOS, L. P. Catalisadores heterogêneos para a produção de monoésteres graxos (biodiesel). **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 477-486, 2011.

D'OCA, M. G. M., VIÊGAS, C. V., LEMÕES, J. S., MIYASAKI, E. K., MORÓN-VILLARREYES, J. A., PRIMEL, E. G., ABREU, P. C. Production of FAME from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. **Biomass and bioenergy**, n. 35, p. 1533-1538, 2011.

DAROCH, M.; GENG, S.; WANG, G., Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks. **Applied Energy**, n. 102, p. 1371-1381, 2013.

DERMIRBAS, A. Use of algae as biofuel sources. **Energy Conversion and Management**, vol. 51, n. 12, p. 2738-2749, 2010.

DENG, X., LI, Y., FEI, X. Microalgae: a promising feedstock for biodiesel. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 13, p. 1008-1014, 2009.

EHIMEN, E. A., SUN, Z. F., CARRINGTON, C. G. Variables affecting the *in-situ* transesterification of microalgae lipids. **Fuel**, n. 89, p. 677-687, 2010.

CEN. European Committee for Standardization. **EN 14103:2003 (E)**. Fat and oil derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents. Brussels, april 2003.

ENDALEW, A. K.; KIROS, Y.; ZANZI, R. Inorganic heterogeneous catalysts for biodiesel production from vegetable oils. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 9, p. 3787-3809, Oct 2011.

FAGUNDES, C. A. M. **Síntese e caracterização de biodiesel metílico e etílico a partir de blendas dos óleos de tungue e de soja**. 2011. 113 p. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande. 2011.

FAJARDO, A. R., CERDAN, L. E., MEDINA, A. R., FERNANDEZ, F. G. A., MORENO, P. A. G., GRIMA, E. M. Lipid extraction from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, n. 2, p. 120-126, 2007.

FERRARI, R. A., OLIVEIRA, V. S., SCABIO, A. Biodiesel de soja – taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 19-23, 2005.

FRANCISCO, E. C., NEVES, D. B., JACOB-LOPES, E., FRANCO, T. T. Microalgae as a feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, n. 85, p. 395-403, 2010.

GARCEZ, C. A. G., VIANNA, J. N. S. Brazilian Biodiesel Policy: Social and environmental considerations of sustainability. **Energy**, v. 34, n. 5, p. 645-654, May 2009.

HAAS, M.J., WAGNER, K. Simplifying biodiesel production: the direct or in situ transesterification of algal biomass. **European Journal of Lipid Science and Technology**, n. 113, p. 1219–1229, 2011.

HALIM, R., DANQUAH, M. K., WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 709-732, 2012.

HOBUSS, C. B., ROSALES, P. F., VENZKE, D., SOUZA, P. O., GOBBI, P. C., GOUVEA, L. P., SANTOS, M. A. Z., PINTO, E., JACOB-LOPES, E., PEREIRA, C. M. P. Cultivation of algae in photobioreator and obtention of biodiesel. **Revista Brasileira De Farmacognosia**, v. 21, n. 2, p. 361-364, 2011.

HOBUSS, C. B., VENZKE, D., PACHECO, B. S., SOUZA, A. O., SANTOS, M. A. Z., MOURA, S., QUINA, F. H., FIAMETTI, K. G., OLIVEIRA, J. V., PEREIRA, C. M. P. Ultrasound-assisted synthesis of aliphatic acid esters at room temperature. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 3, p. 387-389, 2012.

HOEK, C., MANN, D. G., JAHNS, H.M. **Algae: An introduction to phycology**. London: Cambridge University, 1995. 623p.

JOHNSON, M. B., WEN, Z. Production of biodiesel fuel from de microalgae *Schizochytrium limacinum* by direct transesterification of algal biomass. **Energy and Fuels**, n. 23, p. 5179-5183, 2009.

JUNG, K. A., LIM, S-R., KIM, Y., PARK, J. M. Potentials of macroalgae as feedstocks for biorefinery. **Bioresource Technology**, n. 135, p. 182-190. 2013.

KNOTHE, G., GERPEN, J. V., KRAHL, J., RAMOS, L. P. **Manual de biodiesel**. São Paulo: Edgar Blücher, 2006. 340 p.

KOBERG, M., COHEN, M., BEN-AMOTZ, A., GEDANKEN, A. Bio-diesel production directly from the microalgae biomass of *Nannochloropsis* by microwave and ultrasound radiation. **Bioresource Technology**, n. 102, p. 4265-4269, 2010.

LI, P., MIAO, X., LI, R., ZHONG, J. In situ biodiesel production from fast-growing and high oil content *Chlorella pyrenoidosa* in rice straw hydrolysate. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. v. 2011, 2010.

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

LOHMAN, E. J., GARDNER, R. D., HALVERSON, L., MACUR, R. E., BRENT, M. P., GERLACH, R. An efficient and scalable extraction and quantification method for algal derived biofuel. **Journal of microbiological methods**. n. 94, p. 235-244, 2013.

LOTERO, E., LIU, Y., LOPEZ, D. E., SUWANNAKARN, K., BRUCE, D. A., GOODWIN JR., J.G. Synthesis of biodiesel via acid catalysis. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 44, n. 14, p. 5353-5363, 2005.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações**. Ed. RIMA, 1ª ed., 2006. 606 p.

MACEIRAS, R., RODRÍGUEZ, M., CANCELA, A., URREJOLA, S., SANCHEZ, A. Macroalgae: raw material for biodiesel production. **Applied energy**, n. 88, p. 3318-3323, 2011.

MARTINS, A. P., YOKOYA, N. S., COLEPICOLO, P. Comparision of extraction and transesterification methods on the determination of the fatty acid contentes of three Brazilian seaweed species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 4, 2012.

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

MEDINA, A. R., GRIMA, E. M., GIMENEZ, A. G., IBANEZ, M. J. Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advances**, v. 16, n. 3, p. 517-8, 1998.

MIAO, X.L., WU, Q.Y. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 6, p. 841-846, 2006.

NEUENFELDT, P. D.; DUVAL, A. R.; DRAWANZ, B. B.; ROSALES, P. F.; GOMES, C. R. B.; PEREIRA, C. M. P.; CUNICO, W. Efficient sonochemical synthesis of thiazolidinones from piperonilamine. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 1, p. 65-67, 2011.

OLIVIERI, G., MARZOCHELLA, A., ANDREOZZI, R., PINTO, G., POLLIO, A. Biodiesel production from *Stichococcus* strains at laboratory scale. **Journal of Chemical Tecnology and Biotechnology**, n. 86, p. 776-783, 2011.

PEREIRA, C. M. P. HOBUSS, C. B., MACIEL, J. V., FERREIRA, L. R., DEL PINO, F. B, MESKO, M. F., JACOB-LOPES, E., COLEPICOLO, P. Biodiesel renovável derivado de microalgas: avanços e perspectivas tecnológicas. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2013-2018, 2012.

PINTO, A. C., GUARIEIRO, L. L. N., REZENDE, M. J. C., RIBEIRO, N. M., TORRES, E. A., LOPES, W. A., PEREIRA, P. A. P., DE ANDRADE, J. B. J. Biodiesel: An overview. **Brazilian Chemical Society**. v. 16, p. 1313-1330, 2005.

PULZ, O., GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 65, n.6, p.635-648, 2004.

RAMOS, L. P., KUCEK, K. T., DOMINGOS, A. K., WILHELM, H. M. Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 31, 2003.

RAVEN, P.H., EVERT, R.F., EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 6ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2001. 906 p.

SANTOS, A. P., PINTO, A. C. Biodiesel: Uma alternativa de combustível limpo. **Química Nova na Escola**, v.31, n. 1, p. 58-62, 2009.

SCOTT, S.A., DAVEY, M.P., DENNIS, J.S., HORST, I., HOWE, C.J., LEA-SMITH, D.J., SMITH, A.G. Biodiesel from algae: challenges and prospects. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 277–286, 2010.

SHARATHCHANDRA, K., RAJASHEKHAR, M. Total lipid and fatty acid composition in some freshwater cyanobacteria. **Journal of Algae Biomass Utilization**, v. 2, n. 2, p. 83-97, 2011.

SHEEHAN, J., DUNAHAY, T., BENEMANN, J., ROESSLER, P. A. **Look Back at the U. S. Department of Energy's Aquatic Species Program - Biodiesel from Algae**. 1998. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/24190.pdf>>. Acesso em: 19 fev. 2014.

SINGH, S. P., SINGH, D. Biodiesel production through the use of diferente sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n.1, p. 200-216, 2010.

SUGANYA, T., GANDHI, N. N., RENGANATHAN, S. Production of algal biodiesel from marine macroalgae *Enteromorpha compressa* by two step process: Optimization and kinetic study. **Bioresource Technology**, n. 128, p. 392-400, 2013.

SUGANYA, T., RENGANATHAN, S. Optimization and kinetic studies on algal oil extraction from marine macroalgae *Ulva lactuca*. **Bioresource Technology**, n. 107, p. 319-326, 2012.

SUSLICK, K. S. The chemical effects of ultrasound. **Scientific American**, v. 260, n. 2, p. 80-86, 1989.

TEIXEIRA, C. M., MORALES, M. E. **Microalga como matéria prima para produção de biodiesel**. Online. Disponível em <<http://www.dms.ufsc.br/mip5131/arquivos/Biodiseldealgas.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2014.

TOMA, M., VINATORU, M., PANIWNKY, L., MASON, T. J. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, n. 2, p. 137-142, 2011.

VICENTE, G., MARTINEZ, M., ARACIL, J. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. **Bioresource Technology**, v. 92, n. 3, p. 297-305, 2004.

VIJAYARAGHAVAN, K., HEMANATHAN, K. Biodiesel production from freshwater algae. **Energy and Fuels**, n. 23, p. 5448-5453, 2009.

VYAS, A. P., VERMA, J. L., SUBRAHMANYAM, N. A review on FAME production processes. **Fuel**, n. 89, p. 1-9, 2010.

WAHLEN, B. D., WILLIS, R. M., SEEFELDT, L. C. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2724-2730, 2011.

XU, H., MIAO, X., WU, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 126, n. 4, p. 499-507, 2006.

Apêndices

Apêndice A – Classificação taxonômica das algas utilizadas.

Tabela 6 – Classificação taxonômica das algas utilizadas.

	<i>Palisada furcata</i>	<i>Chroococcales</i> sp.
Império	<i>Eukaryota</i>	<i>Prokaryota</i>
Reino	<i>Rhodophyta</i>	<i>Eubacteria</i>
Filo	<i>Florideophyceae</i>	<i>Cyanobacteria</i>
Classe	<i>Ceramiales</i>	<i>Cyanophyceae</i>
Ordem	<i>Rhodomelaceae</i>	<i>Chroococcales</i>
Família	<i>Laurenciae</i>	<i>Cyanobacteriaceae</i>
Gênero	<i>Palisada</i>	-
Espécie	<i>Palisada furcata</i>	-
	<i>Phormidium</i> sp.	<i>Pseudoanabaena</i> sp.
Império	<i>Prokaryota</i>	<i>Prokaryota</i>
Reino	<i>Eubacteria</i>	<i>Eubacteria</i>
Filo	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>
Classe	<i>Cyanophyceae</i>	<i>Cyanophyceae</i>
Ordem	<i>Oscillatoriales</i>	<i>Pseudanabaenales</i>
Família	<i>Phormidiaceae</i>	<i>Pseudanabaenaceae</i>
Gênero	<i>Phormidium</i>	<i>Pseudanabaena</i>
Espécie	-	-

FONTE: ALGAEBASE (www.algaebase.org).

Apêndice B – Condições operacionais para análise do perfil de ácidos graxos das amostras AG₁₋₅ por CG-FID e CG-MS.

Tabela 7 - Condições operacionais para análise do perfil lipídico utilizando cromatógrafo gasoso CG-2010 (Shimadzu) (CG-FID).

Gás carreador	hidrogênio
Vazão de gás carreador	1,2 mL/min
Modo split	1:25
Volume injetado de amostra	1 µL
Temperatura inicial do forno	100 °C
Rampa de aquecimento do forno	7°C/min (até 200°C), 5°C/min (até 202,6°C, por um período de 2 min), 5°C/min (até 230°C, estável em 10 min)
Temperatura do injetor	250 °C
Temperatura do detector	250 °C
Tempo total de corrida	34,29 min

Tabela 8 - Condições operacionais para análise do perfil lipídico utilizando espectrômetro de massas acoplado a cromatógrafo gasoso GC-MS-QP 2010SE (Shimadzu) (CG-MS).

Gás carreador	hélio
Vazão de gás carreador	1,25 mL/min
Modo split	1:10
Volume injetado de amostra	1 µL
Temperatura inicial do forno	50 °C
Rampa de aquecimento do forno	10°C/min (até 280°C)
Temperatura do injetor	300 °C
Interface	280 °C
Tempo total de corrida	38 min
Faixa de massa	35 a 700m/z
Voltagem do filamento	70 eV

Apêndice C - Condições operacionais para análise de biodiesel das amostras BD₁₋₆ por CG-FID

Tabela 9 - Condições operacionais para análise do perfil lipídico utilizando cromatógrafo gasoso CG-2010 (Shimadzu) (CG-FID)*.

Gás carreador	hidrogênio
Vazão de gás carreador	1,2 mL/min
Split	1:25
Volume injetado de amostra	1 µL
Temperatura inicial do forno	100 °C
Rampa de aquecimento do forno	7°C/min (até 200°C), 5°C/min (até 202,6°C, por um período de 2 min), 5°C/min (até 222,6°C, por um período de 2 min), 5°C/min (até 230°C, estável em 10 min)
Temperatura do injetor	250 °C
Temperatura do detector	250 °C
Tempo total de corrida	34,29 min

* Com base nas especificações normativas CEN/EN 14103.

Apêndice D – Análises em CG-FID das amostras AG₁₋₅

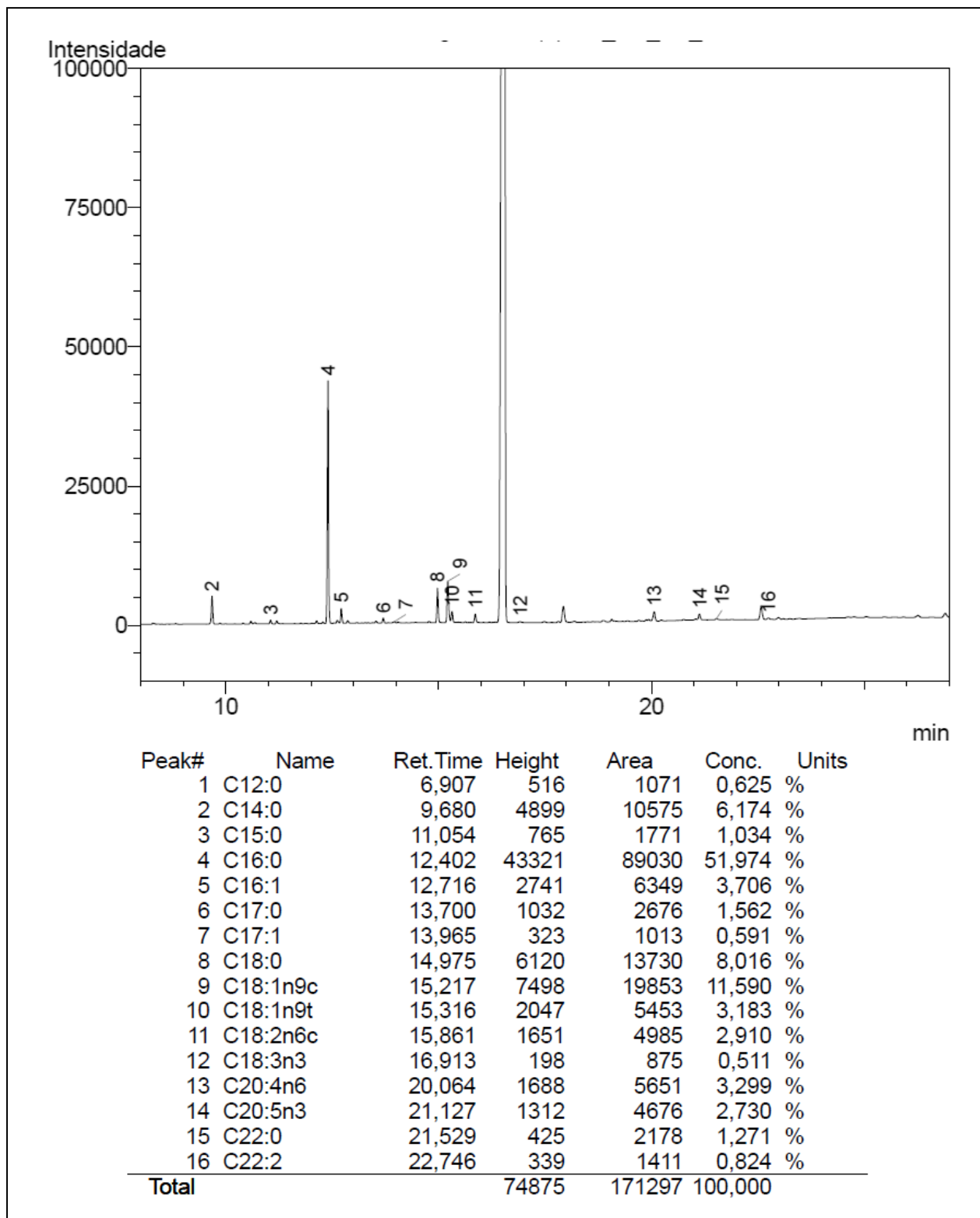


Figura 16 – Cromatograma da amostra AG₁^{*} (extração com hexano) obtido por CG-FID. ^{*}Primeira repetição da triplicata.

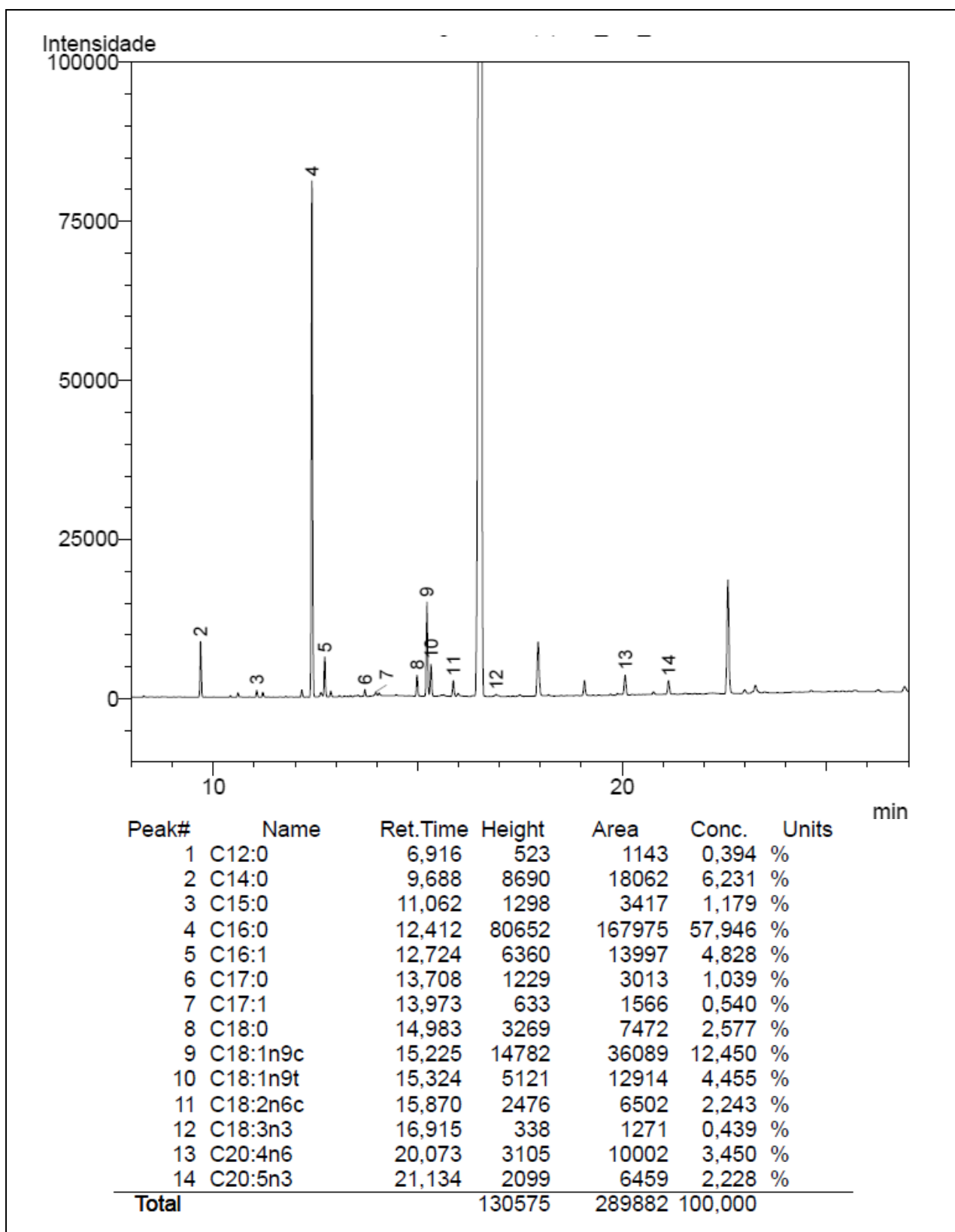


Figura 17 – Cromatograma da amostra AG₂^{*} (extração com clorofórmio) obtido por CG-FID. ^{*}Primeira repetição da triplicata.

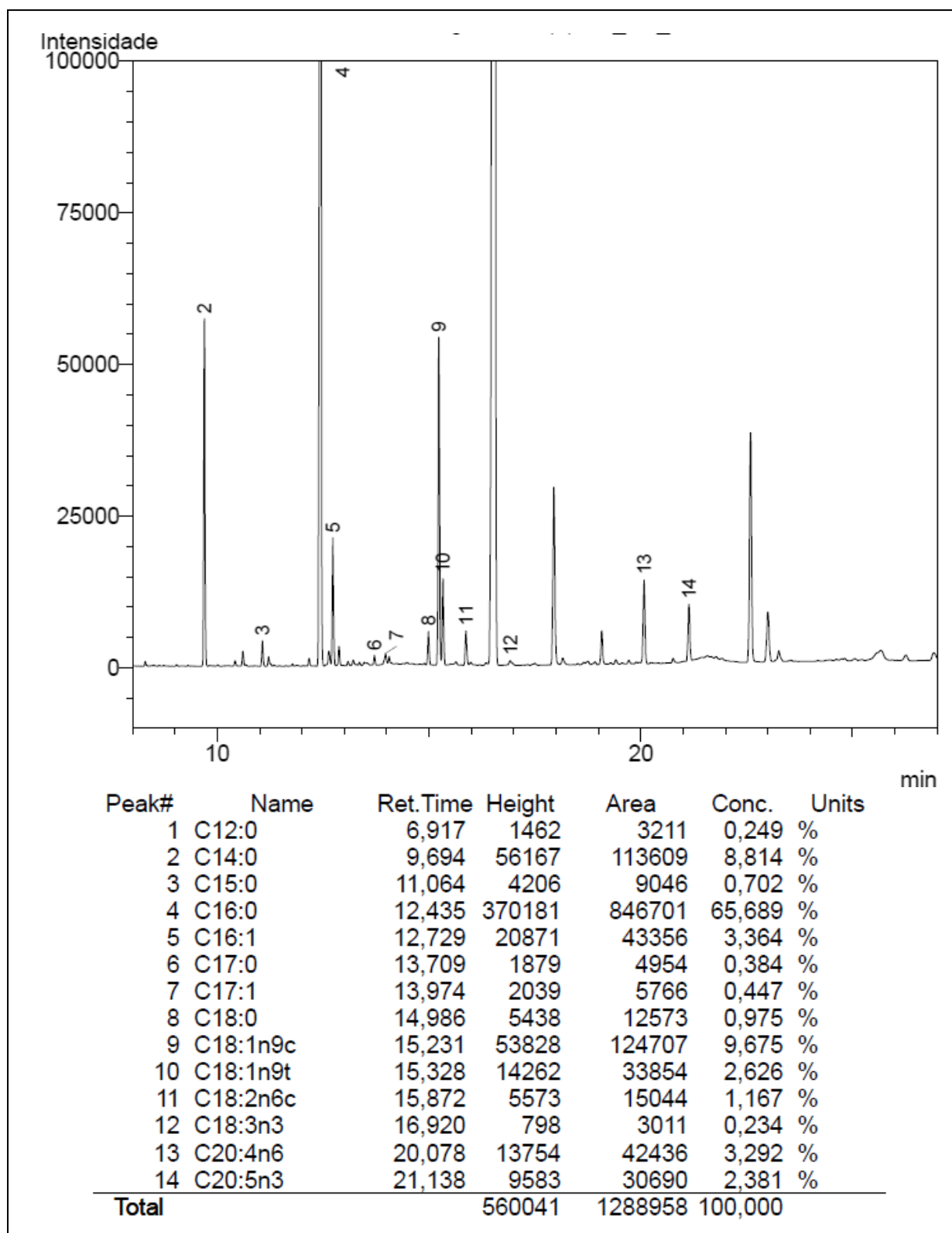


Figura 18 – Cromatograma da amostra AG₃* (extração com metanol) obtido CG-FID. *Primeira repetição da triplicata.

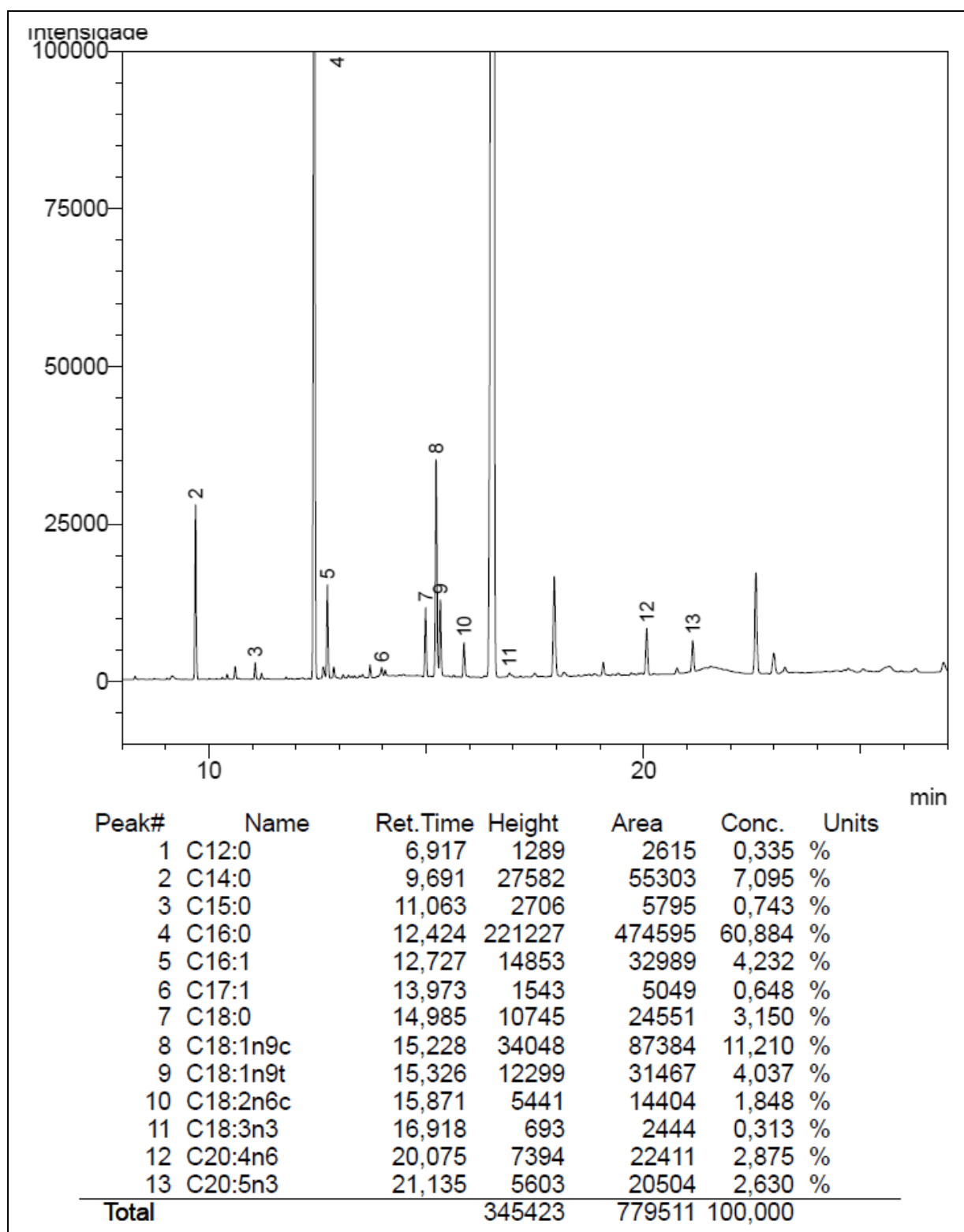


Figura 19 – Cromatograma da amostra AG₄* (extração com etanol) obtido por CG-FID. *Primeira repetição da triplicata.

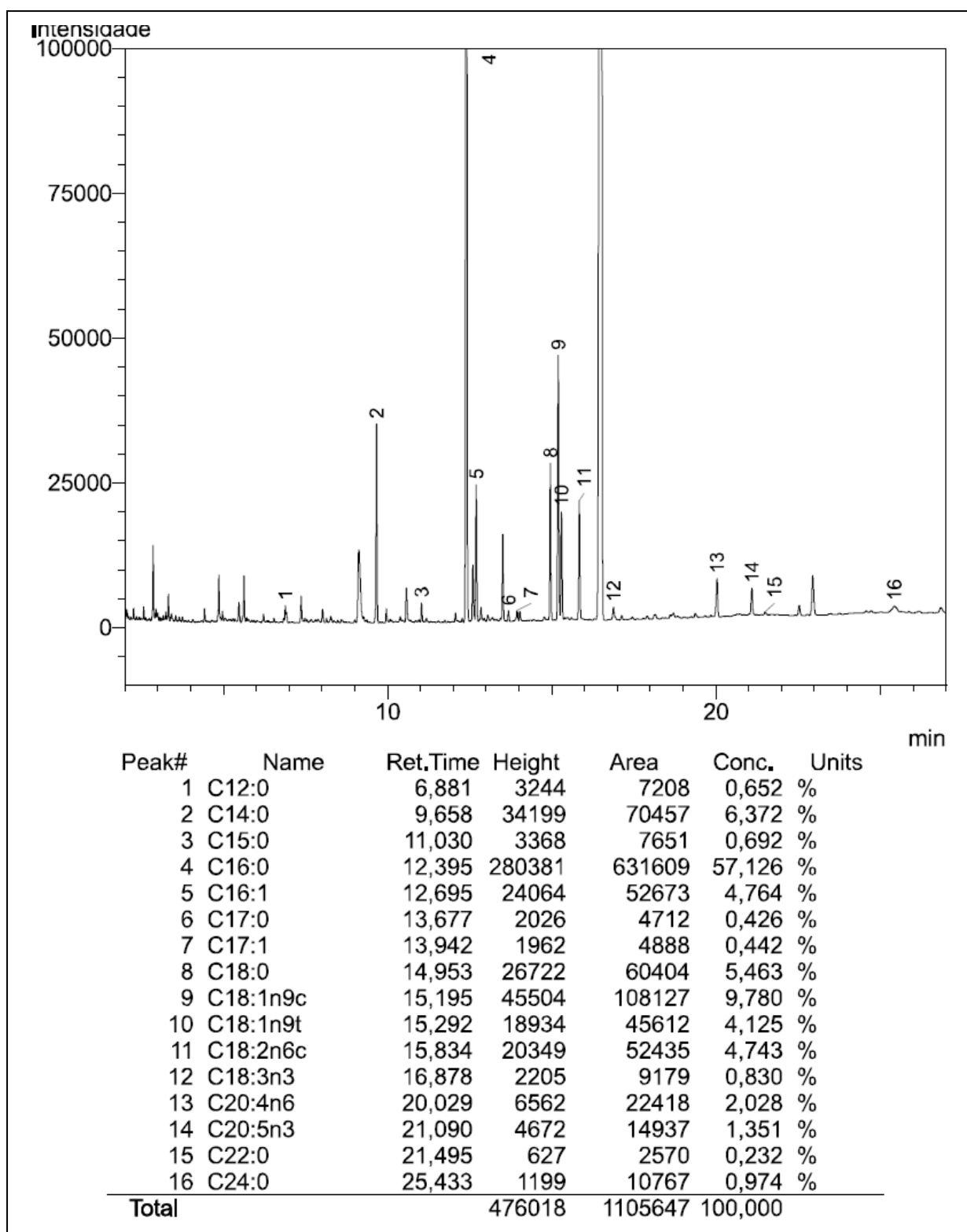


Figura 20 – Cromatograma da amostra AG₅* (extração com clorofórmio/metanol) obtido por CG-FID.
 *Primeira repetição da triplicata.

Apêndice E – Análises em CG-MS das amostras AG₁₋₄

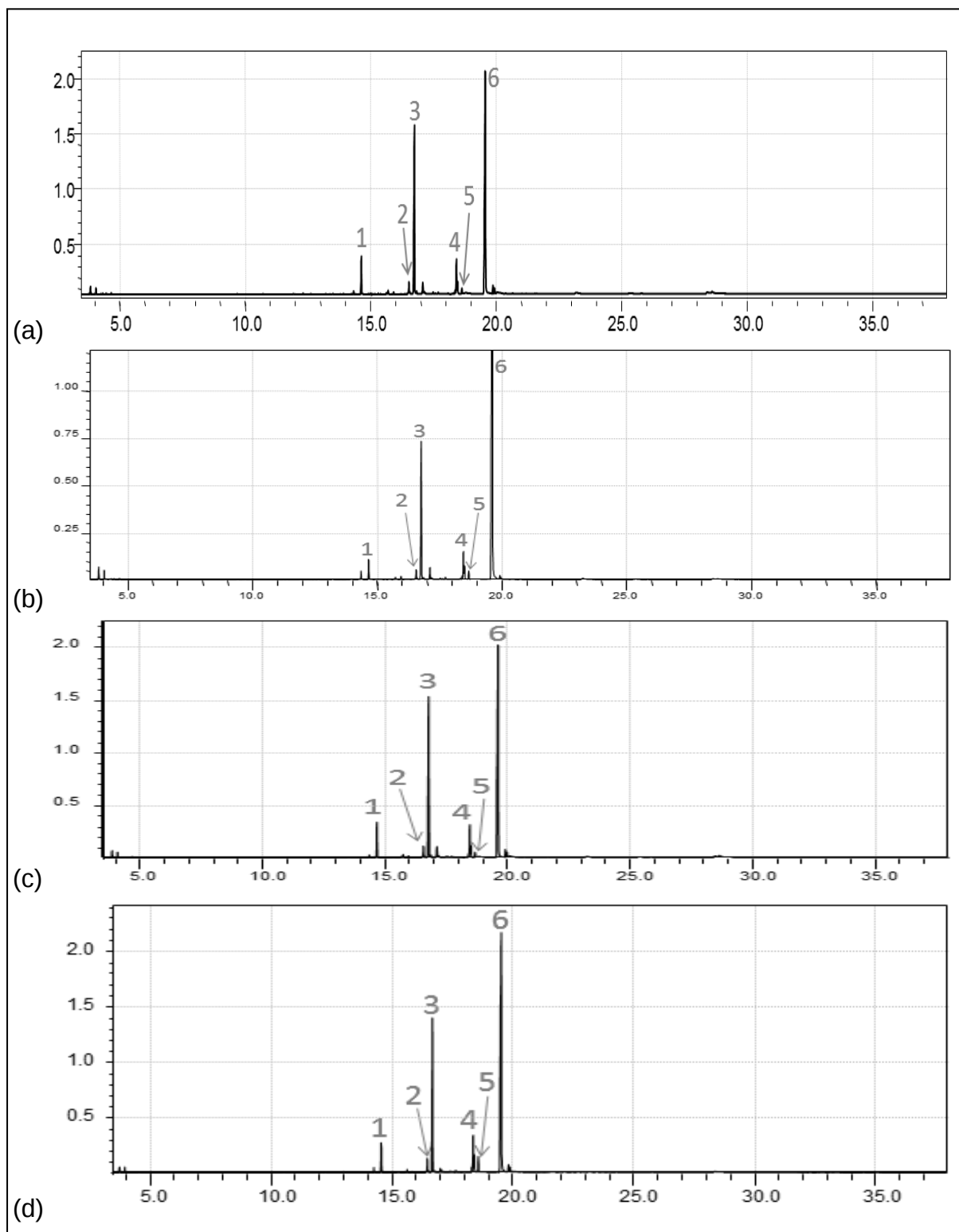
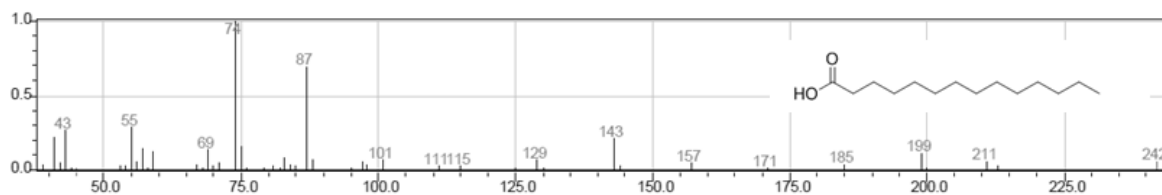
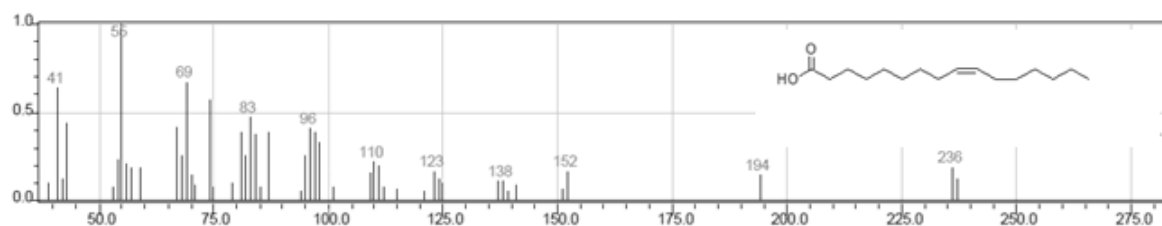


Figura 21 – Cromatograma e espectros de massas das amostras AG₁₋₄ obtidos por CG-MS. (a) AG₁; (b) AG₂; (c) AG₃; (d) AG₄; (1) Tetradecanoato de metila (C14:0); (2) Hexadecenoato de metila (C16:1); (3) Hexadecanoato de metila (C16:0); (4) Octadecenoato de metila (C18:1); (5) Octadecanoato de metila (C18:0) e; (6) Padrão interno – nonadecanoato de metila (C19:0).

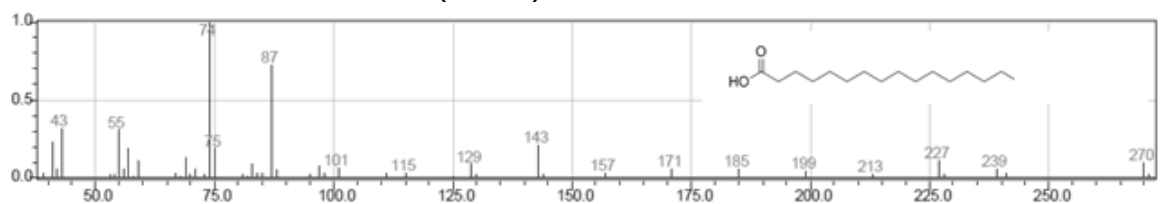
1 – Tetradecanoato de metila (C14:0)



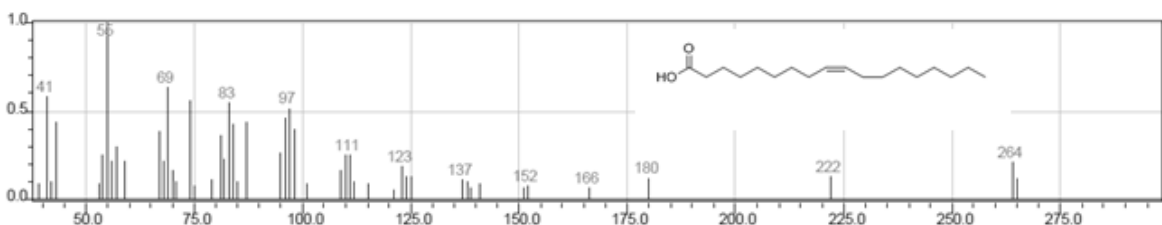
2 – Hexadecenoato de metila (C16:1)



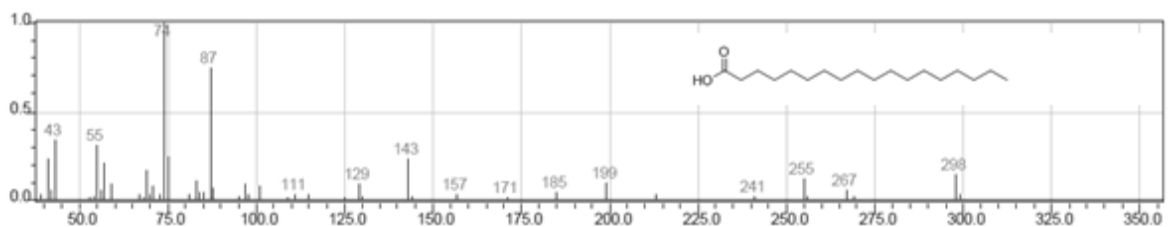
3 – Hexadecanoato de metila (C16:0)



4 – Octadecenoato de metila (C18:1)

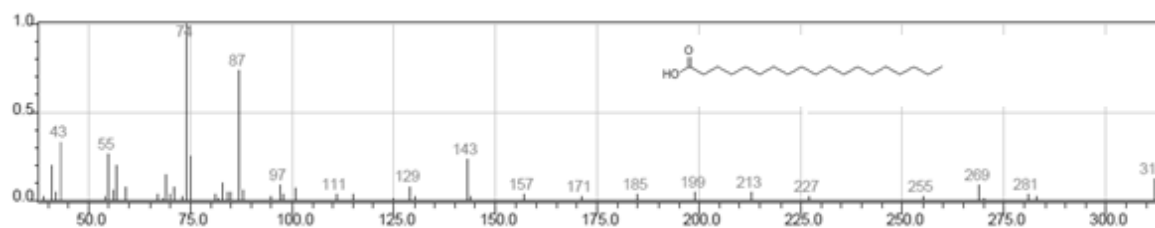


5 – Octadecanoato de metila (C18:0)



Continuação da Figura 21 – Cromatograma e espectros de massas das amostras AG₁₋₄ obtidos por CG-MS. (a) AG₁; (b) AG₂; (c) AG₃; (d) AG₄; (1) Tetradecanoato de metila (C14:0); (2) Hexadecenoato de metila (C16:1); (3) Hexadecanoato de metila (C16:0); (4) Octadecenoato de metila (C18:1); (5) Octadecanoato de metila (C18:0) e; (6) Padrão interno – nonadecanoato de metila (C19:0).

6 – PADRÃO INTERNO – Nonadecanoato de metila (C19:0)



Continuação da Figura 21 – Cromatograma e espectros de massas das amostras AG₁₋₄ obtidos por CG-MS. (a) AG₁; (b) AG₂; (c) AG₃; (d) AG₄; (1) Tetradecanoato de metila (C14:0); (2) Hexadecenoato de metila (C16:1); (3) Hexadecanoato de metila (C16:0); (4) Octadecenoato de metila (C18:1); (5) Octadecanoato de metila (C18:0) e; (6) Padrão interno – nonadecanoato de metila (C19:0).

Apêndice F - Análises em CG-FID das amostras BD₁₋₆

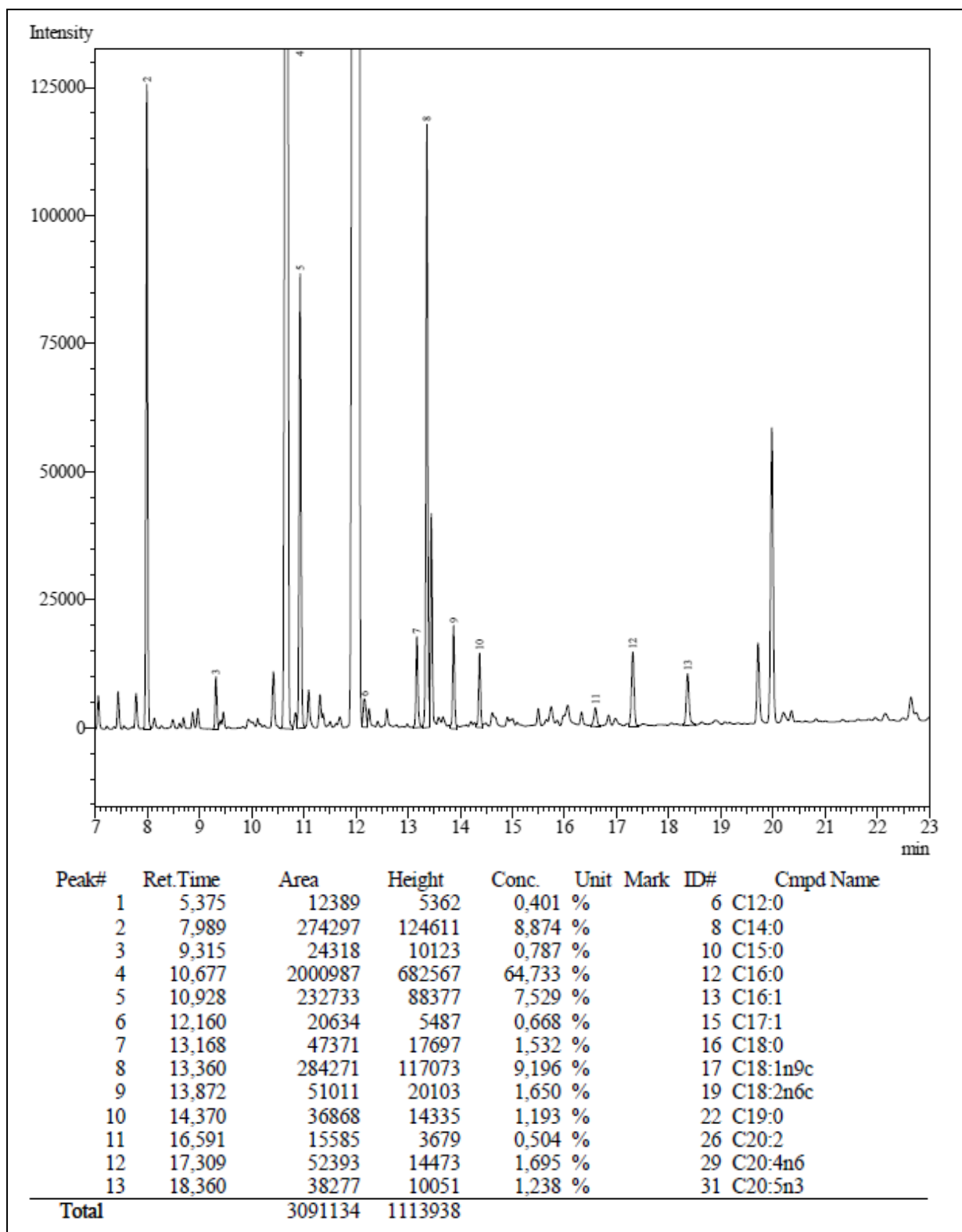


Figura 22 – Cromatograma da amostra BD₁ (*Palisada furcata*) obtido por CG-FID.

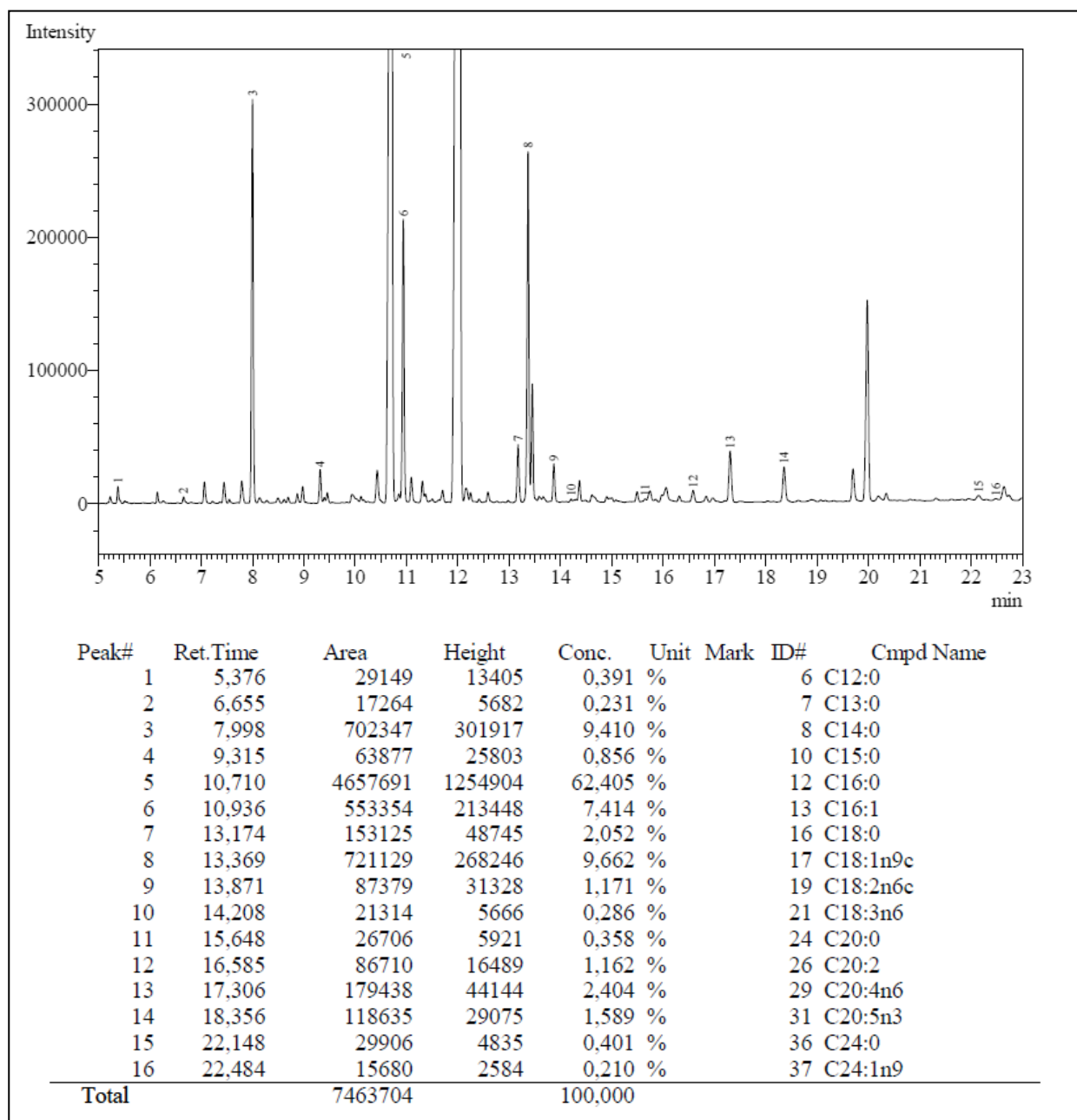


Figura 23 – Cromatograma da amostra BD₂ (*Palisada furcata*) obtido por CG-FID.

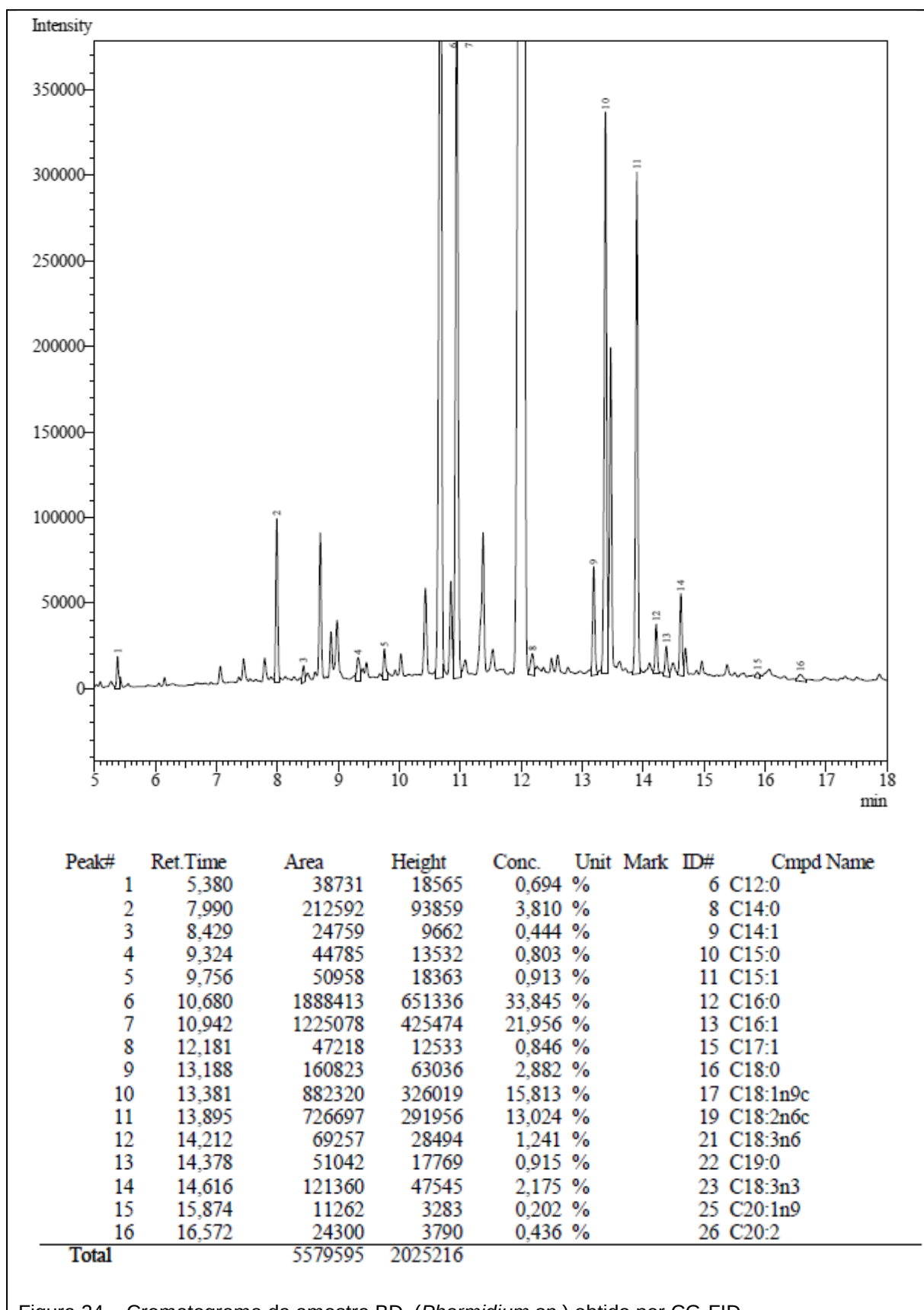


Figura 24 – Cromatograma da amostra BD₃ (*Phormidium* sp.) obtido por CG-FID.

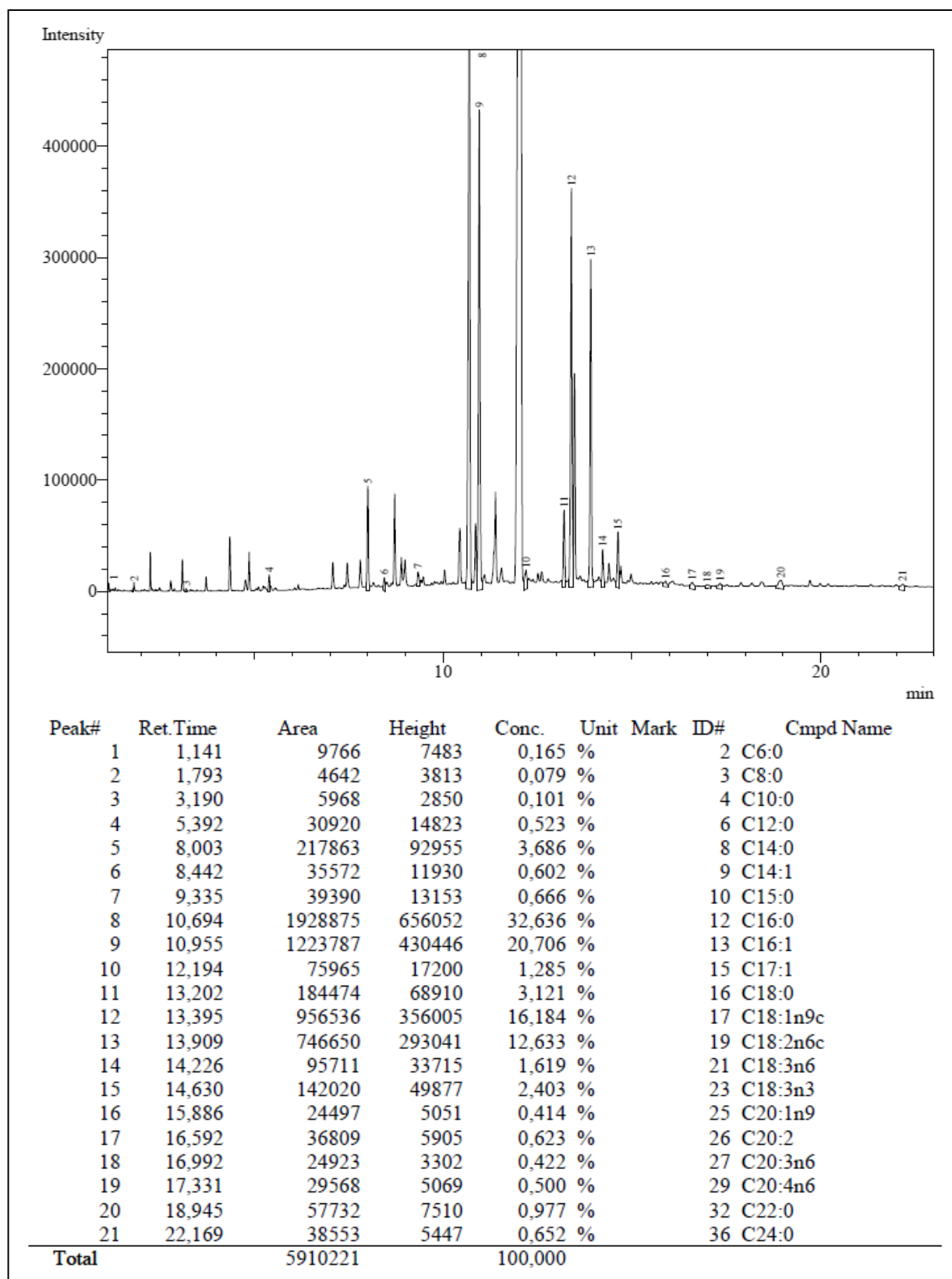


Figura 25 – Cromatograma da amostra BD₄ (*Phormidium* sp.) obtido por CG-FID.

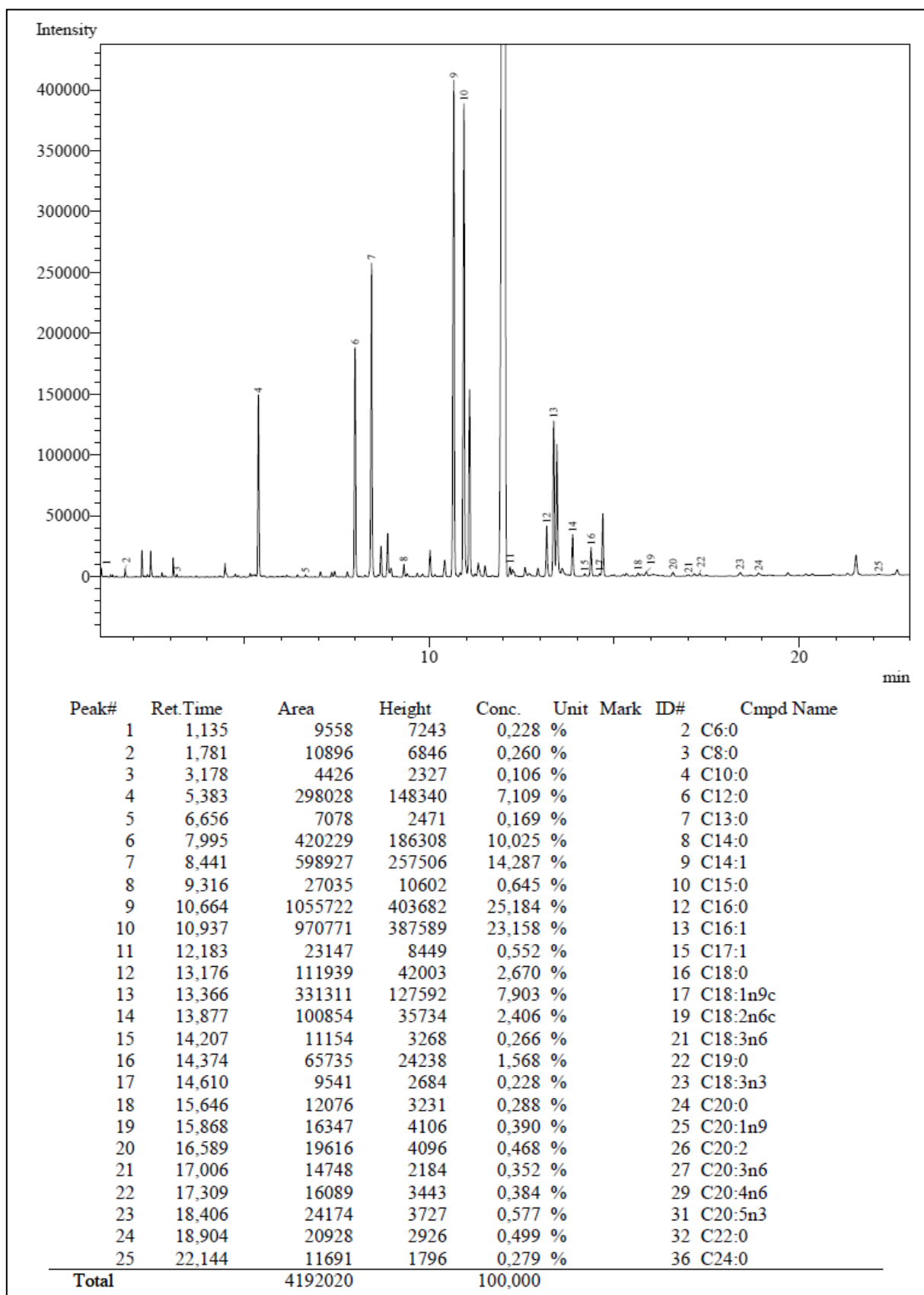


Figura 26 – Cromatograma da amostra BD₅ (*Pseudanabaena* sp.) obtido por CG-FID.

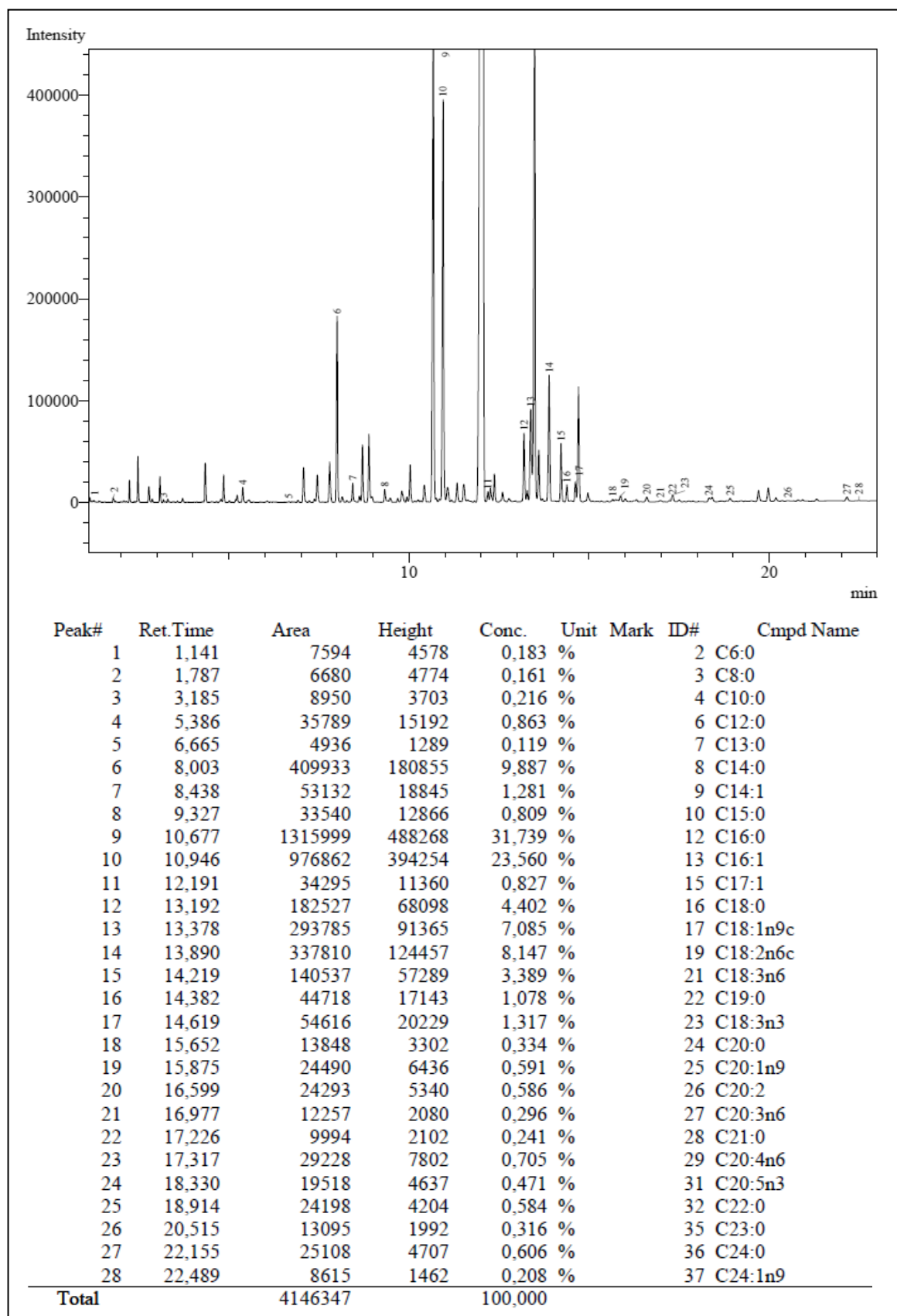


Figura 27 – Cromatograma da amostra BD₆ (*Chroococcales sp.*) obtido por CG-FID.