



UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA INDUSTRIAL - PEI

MESTRADO ACADÊMICO EM ENGENHARIA INDUSTRIAL

NÁDIA ALESSANDRA CARMO DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LIPÍDEOS EM MICROALGAS
VISANDO A PRODUÇÃO DE BIODIESEL



SALVADOR
2013

Nádia Alessandra Carmo dos Santos

Desenvolvimento de um método analítico para determinação do teor de lipídeos em microalgas visando à produção de biodiesel

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Industrial da Escola Politécnica da Universidade Federal da Bahia – UFBA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Industrial

Orientador: Prof. Dr. Emerson Andrade Sales

Salvador
2013

S237 Santos, Nádia Alessandra Carmo

Desenvolvimento de um método analítico para determinação do teor de lipídeos em microalgas visando a produção de biodiesel / Nádia Alessandra Carmo dos Santos. – Salvador, 2013.

106 f. : il. color.

Orientador: Prof. Emerson Andrade Sales

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Escola Politécnica, 2013.

1. Microalga. 2. Lipídeos. 3. Análise cromatográfica. I. Sales, Emerson Andrade. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDD : 543.54

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LIPÍDEOS EM MICROALGAS
VISANDO A PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

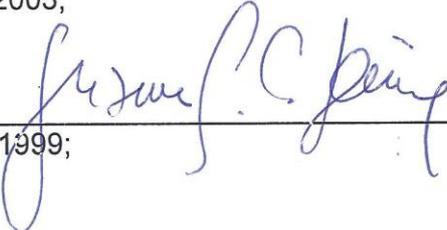
NÁDIA ALESSANDRA CARMO DOS SANTOS

Dissertação submetida ao corpo docente do programa de pós-graduação em Engenharia Industrial da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de mestre em Engenharia Industrial.

Examinada por:

Prof. Emerson Andrade Sales 
Pós-Doutorado em Ciências Exatas e da Terra, Université Toulouse III Paul Sabatier, França, 2008;

Prof. Louisa Wessels Perelo 
Doutor em Biologia, TUM, Alemanha, 2003;

Prof^a. Suzana Telles Cunha Lima 
Doutor em Biologia UNICAMP, Brasil, 1999;

Salvador, BA - BRASIL
Setembro/2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todos os favores que me concedeu, pela oportunidade de aprendizado, pelas boas ideias e pelas inspirações felizes sugeridas.

Agradeço a Jesus Cristo, Maria de Nazaré, meu Anjo da Guarda e todos os Espíritos de Luz que me acompanham pela força, resistência, calma, inteligência e esperança que me deram em todos os momentos da minha vida e em especial para concluir esta etapa.

Agradeço a meus pais Jackson e Juciara, sempre ao meu lado, sempre presentes, sempre pacientes, sempre crédulos nos resultados positivos, sem vocês, eu não teria conseguido chegar até aqui. Agradeço às minhas irmãs, Carla e Márcia por todos esses anos de amor e afeto, mesmo que não explícitos da forma mais óbvia, sei que vocês sempre estiveram do meu lado e se orgulham de mim, assim como eu me orgulho de vocês.

Agradeço aos nenéns, Lucas, Malu, Natália, Júlio Cesar e Yohan que já chegaram trazendo tantas alegrias e esperanças.

Agradeço aos meus amigos que sempre acreditaram em mim e viveram juntos todas as emoções que eu vivi, em especial a minha comadre Mariana, lado a lado, firme e forte comigo nesta e em outras batalhas, Geovani, Jorgean e meu cunhado Anilton, que não tinham nada a ver com meu trabalho e estudo e mesmo assim me ensinaram muitas coisas e me ajudaram em diversas etapas deste mestrado. Agradeço, em ordem alfabética, a Anaildes, Aryalle, Marcelli, Marília (Cotinha), Rafael (Gabarito), Sarah, Sérgio e Tomaz pelo apoio, momentos de descontração e risos e Gabriel que me proporcionou bons momentos.

Agradeço ao Prof. Dr. Frederico Guaré, meu primeiro orientador, ao pessoal do Labec, em especial Louise e Cíntia que me ajudaram em diversas etapas experimentais, à Profa. Dra. Zênis, e ao pessoal do LaPO, foi bom enquanto durou. Ao PEI, em especial Tatiane e Robinson por toda a ajuda.

*“Uma prova que Deus esteja conosco não é o fato de que não
venhamos a cair, mas que nos levantemos depois de cada queda”*

Santa Tereza d'Ávila

Santos, Nádia Alessandra Carmo. Desenvolvimento de um método analítico para determinação do teor de lipídeos em microalgas visando à produção de biodiesel. 106 f. il. 2013. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

Resumo

Atualmente tem-se buscado novas fontes de energia consideradas limpas devido aos problemas que existem no setor de combustíveis que depende quase inteiramente dos combustíveis derivados do petróleo que vêm se tornando cada vez mais raros e provocam diversos problemas ambientais e à saúde humana. Uma destas “novas” fontes energéticas é o biodiesel que são os monoalquil ésteres de ácidos graxos presentes em animais e vegetais. O biodiesel originado de plantas oleaginosas tem sido o tipo mais comum produzido no mundo. Contudo não atende realisticamente a demanda mundial. Portanto, estão sendo feitos estudos para utilizar fontes alternativas de óleo, como as microalgas, que têm elevada produção de biomassa e se acredita que podem ser capazes de produzir altas concentrações lipídicas. Neste trabalho buscou-se desenvolver um método analítico para determinar quantidade lipídeos em microalgas que fosse de simples manuseio, robusto e de baixo custo de análise. Para tal estudou-se quatro técnicas de análise. Na espectroscopia de infravermelho distante utilizou-se o pico da ligação C=O para detecção dos lipídeos nas microalgas das espécies *Haematococcus pluvialis* e *Nannochloropsis sp.*, porém os valores encontrados não puderam ser atribuídos com certeza aos lipídeos devido à presença de outras substâncias que interferem no resultado da análise. Na espectrofluorimetria utilizou-se o corante vermelho do Nilo que se associa aos lipídeos presentes nas células microalgais e obteve-se uma correlação entre a radiação de fluorescência e o teor de lipídeos neutros presentes nas microalgas da espécie *Nannochloropsis sp.*, tendo sido calculado o valor de 4,4% e 4,8% de lipídeo para cultivos com 4 e 6 dias de cultivo. Duas técnicas cromatográficas foram comparadas entre si e os valores de teor de lipídeos encontrados nos extratos das microalgas das espécies *Desmodesmus sp.*, *Dunaliella salina*, *Dunaliella tertiolecta* e *Nannochloropsis sp.* demonstraram ser próximos em ambas com diferença de aproximadamente 16% nos valores encontrados. Ao final desse estudo conclui-se que as técnicas espectrométricas apresentam melhores resultados qualitativos e as técnicas cromatográficas possuem um grande potencial para determinar a concentração de lipídeos nos extratos, apesar de sofrerem muita variação no resultado de acordo com o método de extração de lipídeos empregado.

Santos, Nádia Alessandra Carmo. Development of an analytical method for lipid content determination in microalgae aiming biodiesel production. 106 f. il. 2013. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

Abstract

Due to notorious problems on the fuel sector which depends almost entirely on fossil fuels, derived from petroleum that is becoming increasingly rare and causes many problems to the environmental and human health, new sources of energy considered clean has been sought. One of these "new" energy sources is biodiesel (monoalkyl esters of fatty acids present in animals and plants). The biodiesel originated from oilseeds is the most common type produced worldwide. But, realistically does not meet global demand. Therefore, studies are being made to use alternative oil sources, such as microalgae, which have high biomass production, and are known to be capable of high lipid production. This study aimed to develop an analytical method to determine lipid in microalgae that would be simple to use, robust and of low cost analysis. For this purpose we studied the techniques of far infrared spectroscopy, spectrofluorimetry, thin layer chromatography and gas chromatography. In the far infrared spectroscopy the peak of C = O bond at a wave number of 1750 cm^{-1} was used for lipids detection in microalgae *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis sp.* The values found could not be assigned with certainty to neutral lipids due to the presence of other substances that interfered with the analysis result, such as the pigment astaxanthin. For spectrofluorimetry analyses the lipophilic dye Nile red was employed, which associated with neutral lipids present in microalgal cells made it possible to obtain a correlation between the fluorescence radiation and the content of neutral lipids present in the microalgae of the species *Nannochloropsis sp.* The value of 4.4% and 4.8% of lipids in dry biomass was calculated for strains after 4 and 6 days of cultivation. Chromatographic techniques were compared to each other and the lipid content values found in the hexane extracts of microalgae species *Desmodesmus sp.*, *Dunaliella salina*, *Dunaliella tertiolecta* and *Nannochloropsis sp.* were similar in both techniques with standard deviation of approximately 16% in the values found. At the end of this study it was concluded that both spectrometric techniques are best performing as qualitative analyses and chromatographic techniques have great potential to determine the lipid quantity present in microalgae extract, although results depend highly on the lipid extraction method employed.

Índice

1.	Introdução	14
2.	Objetivos	17
2.1.	Objetivo geral	17
2.2.	Objetivos Específicos	17
3.	Revisão bibliográfica.....	18
3.1.	Fundamentação teórica	18
3.1.1.	Histórico de combustíveis	18
3.1.2.	Energias Renováveis	19
3.1.3.	Biodiesel	19
3.1.4.	Microalgas	23
3.1.4.1.	Introdução	23
3.1.4.2.	Aplicação comercial.....	24
3.1.4.3.	Lipídeos de Microalgas	27
3.1.4.4.	Biocombustíveis de Microalgas	29
3.1.4.5.	Espécies Estudadas.....	30
3.1.4.5.1.	<i>Desmodesmus sp.</i>	30
3.1.4.5.2.	<i>Dunaliella salina</i> e <i>Dunaliella tertiolecta</i>	31
3.1.4.5.3.	<i>Haematococcus pluvialis</i>	32
3.1.4.5.4.	<i>Nannochloropsis sp.</i>	33
3.1.5.	Métodos de Análise Espectroquímicos	33
3.1.5.1.	A teoria espectroquímica	33
3.1.5.1.1.	Espectroscopia de Fluorescência	35
3.1.5.1.1.1.	Substâncias Absorventes.....	36
3.1.5.1.1.2.	Substâncias Fluorescentes	37
3.1.5.1.1.3.	Vermelho do Nilo (Nile Red).....	37
3.1.5.1.2.	Espectroscopia de Infravermelho distante	38
3.1.6.	Métodos de Análise Cromatográficos	39
3.1.6.1.	Princípios Básicos de Cromatografia	39
3.1.6.2.	Cromatografia em Camada Delgada	40
3.1.6.3.	Cromatografia Gasosa	42
3.1.7.	Análise Multivariada.....	44
3.1.7.1.	Planejamento de Experimentos	44
3.1.7.2.	Matriz de Doehlert	45
3.2.	Estado da Arte sobre determinação de lipídeos em microalgas.....	47

4.	Materiais e Métodos	52
4.1.	Cultivo de Microalgas	52
4.2.	Análise por Espectroscopia de Infravermelho distante com Transformada de Fourier – FTIR	53
4.3.	Análise Multivariada Preliminar para Técnica Espectrofluorimétrica.....	54
4.4.	Análise por Espectroscopia de Fluorescência	55
4.5.	Análise por Cromatografia em Camada Delgada	58
4.6.	Análise por Cromatografia Gasosa	60
5.	Resultados e Discussão	62
5.1.	Análise por Espectroscopia de Infravermelho distante com Transformada de Fourier .	62
5.2.	Análise Multivariada Preliminar para Técnica Espectrofluorimétrica.....	66
5.3.	Análise por Espectroscopia de Fluorescência	68
5.4.	Análise por Cromatografia em Camada Delgada	72
5.5.	Análise por Cromatografia Gasosa	75
5.6.	Comparação de Resultados entre as Técnicas Utilizadas	77
6.	Conclusões.....	80
7.	Referências Bibliográficas	83
	Anexos	95

Lista de Abreviações

Atm = Atmosfera

BBM = Meio Basal de Bold

CCD = Cromatografia em Camada Delgada

CG = Cromatografia Gasosa

CGL = Cromatografia Gás-Líquido

CGS = Cromatografia Gás-Sólido

DA = Análise Discriminante

d_m = Distância Percorrida pela Fase Móvel

d_r = Distância Percorrida pelas Substâncias

EDTA= Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

FTIR = Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

NIR = Refletância de Infravermelho Próximo

R_f = Fator de Retenção

RMN= Ressonância Magnética Nuclear

RPM = Rotações Por Minuto

UV = Ultravioleta

Lista de Figuras

Figura 1. Mecanismo reacional da produção de biodiesel.	20
Figura 2. Formas de cultivo das microalgas (A) Em erlenmeyer (B) Em galões plásticos (C) Fotobiorreator tubular (D) Lagoas fotossintetizantes.	24
Figura 3. Astaxantina. Estrutura química (A), como comercializada (B) e Visualizada na microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> (C) Fonte:	26
Figura 4. β -caroteno. Estrutura química (A), como comercializada (B)	26
Figura 5. Ácidos graxos presentes nas microalgas.	28
Figura 6. <i>Desmodesmus sp.</i>	30
Figura 7. <i>Dunaliella salina</i>	31
Figura 8. <i>Dunaliella tertiolecta</i>	31
Figura 9. <i>Haematococcus pluvialis</i>	32
Figura 10. <i>Nannochloropsis sp.</i>	33
Figura 11. Diagrama parcial de níveis de energia para uma molécula hipotética	36
Figura 12. Estrutura molecular do corante Vermelho do Nilo	38
Figura 13. Representação do planejamento da matriz de Doehlert.	46
Figura 14. Espectro de infravermelho de uma solução padronizada de óleo de canola.	62
Figura 15. Curva de calibração para análise em FTIR.	63
Figura 16. (a) Estrutura molecular da clorofila a, (b) Estrutura molecular da clorofila b.	64
Figura 17. Superfície de resposta para Matriz de Doehlert para os fatores Tempo e Concentração.	67
Figura 18. Gráfico de Pareto da estimativa dos efeitos.	68

Figura 19. Fluorescência de <i>Nannochloropsis sp.</i> tingida com o corante Vermelho do Nilo - Espectro de Fluorescência produzido pelo equipamento Fluorímetro versão Quimis - protótipo 1	69
Figura 20. Fluorescência de <i>Nannochloropsis sp.</i> tingida com o corante Vermelho do Nilo – Diferença entre os espectros da radiação de fluorescências das células microalgais tingidas e da clorofila.	70
Figura 21. Fluorescência de <i>Nannochloropsis sp.</i> tingida com o corante Vermelho do Nilo - Espectros de Fluorescência de todas as amostras analisadas com abatimento do sinal da clorofila	70
Figura 22. Curva de correlação entre a radiação de fluorescência e a concentração de lipídeos no meio de cultura de <i>Nannochloropsis sp.</i>	71
Figura 23. Influência do tempo de revelação com iodo na análise de lipídeos comerciais (óleo de peixe – $\Omega 3$) por CCD	73
Figura 24. Curva de calibração para análise de teor de lipídeos por CCD.	74
Figura 25. Cromatoplasmas reveladas com iodo com gradiente crescente de teor de óleo	75

Lista de Tabelas

Tabela 1. Combinação do planejamento de experimentos para dois fatores com dois níveis.	45
Tabela 2. Combinação da Matriz de Doehlert para dois fatores.....	46
Tabela 3. Valores das amostras dos extratos de microalgas analisadas por espectroscopia de infravermelho longe com transformada de Fourier.....	65
Tabela 4. Planejamento fatorial do experimento.	66
Tabela 5. Correlação entre os valores de área dos espectros de fluorescência das células microalgais de <i>Nannochloropsis sp.</i> tingidas e as médias das massas de lipídeos obtidas.....	71
Tabela 6. Teor de lipídeos por CCD.....	74
Tabela 7. Teor de lipídeos por CG.	76
Tabela 8. Resultados de teor de lipídeos obtidos nas diferentes técnicas estudadas..	77

1. Introdução

O uso de combustíveis derivados do petróleo já se tornou notório como insustentável para o planeta, por ser uma fonte energética não renovável e pelos danos que provocam ao meio-ambiente e a saúde da população, como a emissão de gases do efeito estufa, material particulado e gases do tipo SO_x. Contudo os bicompostíveis são fontes de energia renováveis, que contribuem para a recuperação da biosfera. Existe uma grande variedade de bicompostíveis, por exemplo o álcool, metano, hidrogênio e biodiesel (Grisoli, R. et al, 2009).

Biodiesel derivado de cultivo tradicional de oleaginosas é uma fonte renovável potencial, porém realisticamente satisfaz apenas uma pequena fração da demanda existente por combustível para transporte, além de utilizar área agrícola que pode ser usada para cultivo de produtos alimentícios (Gomes, M. et al, 2009).

A utilização de microalgas na produção de biodiesel implica em diversas vantagens socioeconômicas, industriais e ambientais. As microalgas apresentam elevada produção de biomassa que pode ser cultivada em qualquer tipo de terreno, pois o tipo de solo não interfere na qualidade nem no crescimento das microalgas que são cultivadas em biorreatores, e deste modo o processo pode ser aplicado em regiões carentes, o que geraria um grande desenvolvimento social. A produção de óleo pelas microalgas é maior a que das plantas oleaginosas, para uma mesma superfície, e num mesmo período de tempo (Chisti, Y., 2007, Teixeira, C.M. L. L. e Morales, E.2006), e ainda possuem uma alta capacidade de fixação de CO₂ (Milne, T. A. et al., 1990; Minowa, T. et al., 1995; Brown, L. M. e Zeiler, K. G., 1993), um dos principais gases que causam efeito estufa.

A produção de biodiesel depende da seleção da matéria-prima, do catalisador e do método de purificação do produto final (Morin, P. et al., 2007; Hamad, B. et al., 2008). A qualidade final do biodiesel produzido depende intrinsecamente de todas estas etapas, e a seleção da matriz a ser trabalhada

exerce uma grande influência nas demais fases, bem como no rendimento esperado.

Os métodos de análise de óleos atualmente disponíveis, em sua maioria, não visam à aplicação no setor de petróleo, gás natural e outros combustíveis, e ainda utilizam técnicas de elevado custo, pouca disponibilidade e alta complexidade de manuseio e análise de resultados, como Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Refletância na região de Infravermelho Próximo (NIR) (Godoy, I. J., et al, 1986). Técnicas como cromatografia a gás, amplamente utilizada na quantificação de lipídeos, apesar de bastante sensível e específica, necessita da etapa de extração e derivatização da amostra, o que aumenta o tempo e o custo da análise.

Um método que fosse baseado no tingimento da célula microalgal seria mais vantajoso, eliminando a etapa de extração dos lipídeos. Na literatura existem diversos trabalhos que utilizam marcadores lipofílicos para a quantificação de lipídeos. Um deles é o Vermelho do Nilo (Nile red), corante que se associa aos lipídeos neutros (utilizados na produção de biodiesel) da célula e quando excitado no comprimento de onda $\lambda = 552$ nm (cor verde) emite uma radiação de fluorescência no comprimento de onda $\lambda = 636$ nm (cor vermelho) (Cooksey, K. E. et al, 1987; Huang, G-H., et al, 2009). Utilizando técnicas fluorimétricas é possível obter uma correlação entre a radiação de fluorescência do corante com a quantidade de lipídeos presentes nas células (Moazami, N., 2011 e Silva, T. L., et al, 2009).

Uma análise cromatográfica mais simples e que dispensasse a derivatização das amostras também traria vantagens na agilidade do processo de análise. A cromatografia em camada delgada apresenta as mesmas características básicas da cromatografia gasosa, porém é uma técnica mais fácil de trabalhar e analisar, não necessita de equipamentos complicados e caros e o extrato não precisa passar por nenhuma reação previa para ser analisado. Desta forma os custos e tempo de análise diminuem e o método pode ser realizado por uma amplitude maior de pessoas que não precisam ter um conhecimento técnico avançado.

Neste trabalho as técnicas de análise de espectroscopia de infravermelho distante, espectrofluorimetria, cromatografia em camada delgada e cromatografia gasosa foram estudadas para a determinação do teor de lipídeos neutros em microalgas, e os resultados obtidos foram comparados. Alguns aspectos que influenciam as análises também foram estudados em diferentes níveis, buscando melhorar as condições de análise.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Desenvolver e validar um método de análise, eficiente e robusto, para a determinação de lipídeos neutros em microalgas, a serem utilizados na produção laboratorial e industrial de biodiesel.

2.2. Objetivos Específicos

- Estudar possíveis técnicas de análise de lipídeos neutros em microalgas;
- Determinar a técnica mais adequada para realizar a análise de lipídeos neutros em microalgas;
- Analisar os fatores que influenciam o processo de análise de lipídeos neutros em microalgas;

3. Revisão bibliográfica

3.1. Fundamentação teórica

3.1.1. Histórico de combustíveis

O petróleo foi consolidado no século XX como principal fonte de energia primária para as indústrias, e para o setor de transporte, tornando-se um padrão energético em todo o planeta depois da Segunda Guerra Mundial. O petróleo foi capaz de mudar econômica, social e ambientalmente os países produtores em desenvolvimento. (Baños, R. et al, 2011)

Com o progresso econômico, o mundo foi se tornando cada vez mais dependente dos combustíveis fósseis, não renováveis, logo as reservas mundiais vão se esgotando e o petróleo se torna cada vez mais raro (Baños, R. et al, 2011). A utilização dos derivados de petróleo como combustíveis causa diversos males para o meio ambiente e para a saúde dos seres humanos.

Derivados do petróleo como a gasolina, o óleo diesel, o óleo combustível e a querosene são utilizados como combustíveis, e durante sua queima, estas substâncias podem liberar na atmosfera compostos sulfonados (SO_x), principais originadores de chuvas ácidas, metais pesados como o níquel (Ni) e o vanádio(V), causadores de diversas doenças como alergias, rinite, sinusite e até câncer, e alguns dos gases do efeito estufa como o dióxido de carbono (CO_2) um dos principais responsáveis pelo aquecimento global. (Gioda, A.; Gioda, F. R., 2006). O planeta não pode mais ter como principal fonte energética os combustíveis fósseis. Os impactos ambientais devem ser levados em consideração, por isso, em todo o mundo, países estão mudando suas políticas energéticas para promover uma redução dos gases que causam o efeito estufa (Saydut, A. et al, 2010).

3.1.2. Energias Renováveis

Acompanhando a conscientização global sobre a disponibilidade limitada de petróleo, sua instabilidade econômica e os graves efeitos ambientais, surgiu um interesse mundial pelo estudo e busca de fontes de energia mais limpas e ambientalmente corretas. (Monteiro, M. R., et al, 2009) Isto é, fontes de energias consideradas renováveis, que possuam baixas taxas de emissões de carbono em seu ciclo de vida tecnológico.

A principal desvantagem da energia renovável é o alto custo de instalação e manutenção, por este motivo muitas pesquisas e estudos estão sendo realizados para viabilizar esta classe de energia. Existem diversos tipos de energias alternativas de fontes renováveis, por exemplo, a energia solar, energia eólica, energia hidráulica, energia geotérmica e bioenergia (Quadros, D. G. et al, 2010; Junqueira, M. S. D., 2002). A bioenergia é a energia renovável originada de fontes biológicas. Uma delas é a biomassa, ou seja, é o material biológico de organismos vivos ou frescos, que podem ser plantas ou animais. Esta pode ser queimada para produzir vapor e gerar eletricidade ou como fonte de calor para indústrias e residências. A biomassa também pode ser convertida em outras formas de energia como o gás metano, o etanol e o biodiesel (Quadros, D. G. et al, 2010; Junqueira, M. S. D., 2002).

3.1.3. Biodiesel

O termo Biodiesel designa compostos de mono-álquil ésteres de ácidos graxos, que normalmente são obtidos pela transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais com alcoóis de cadeia curta (Balabin, R. M. e Safieva, R. Z., 2011) como o etanol e o metanol, e geralmente na presença de um catalisador, básico, ácido ou enzimático. A Figura 1 mostra o mecanismo reacional da conversão de triglicerídeos em biodiesel utilizando um catalisador básico. Esta reação ocorre em diversas etapas reversíveis sucessivas, formando diglicerídeos e monoglicerídeos como intermediários e como produto final o biodiesel e a glicerina.

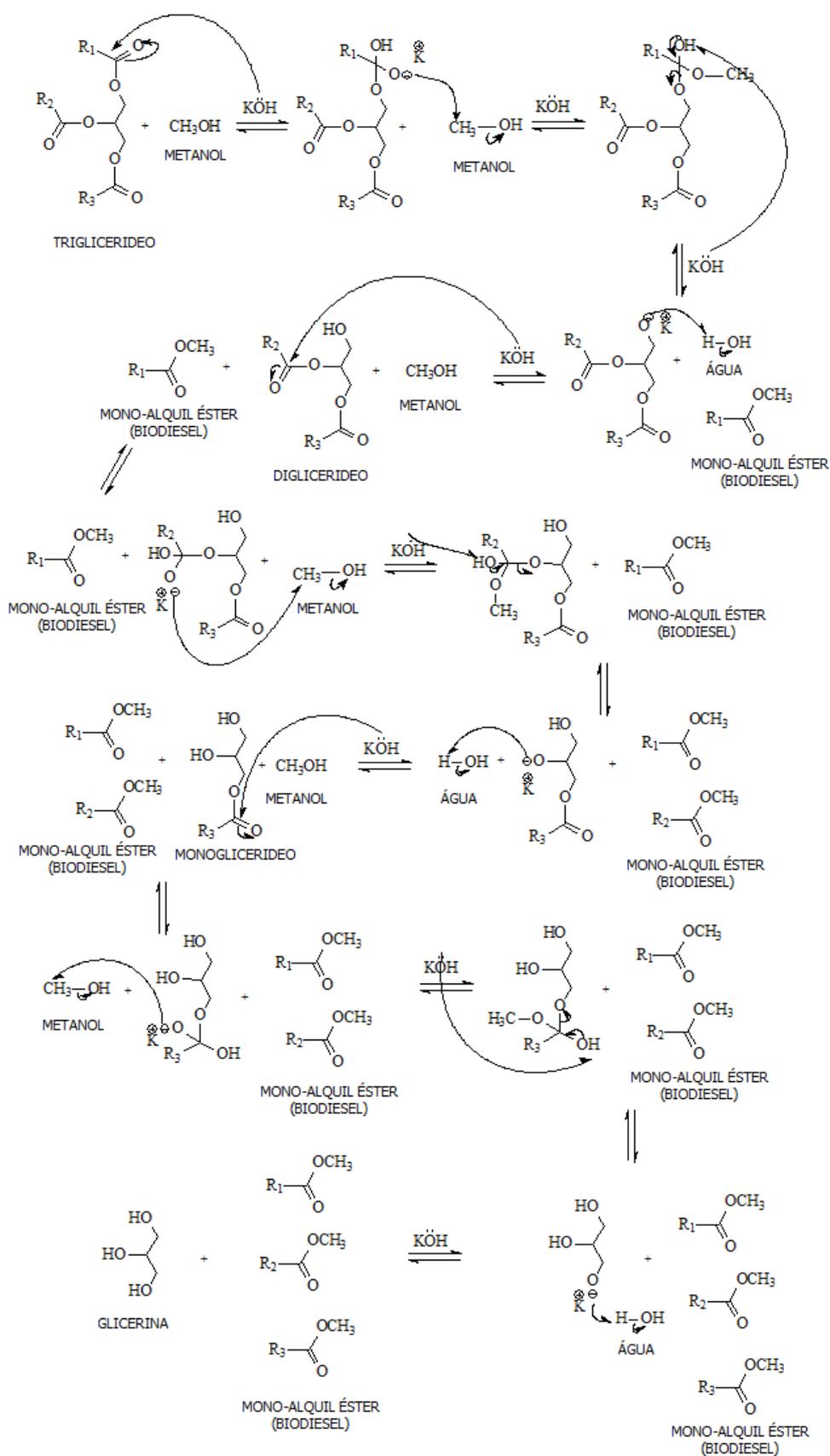


Figura 1. Mecanismo reacional da produção de biodiesel. Fonte: Próprio autor baseado em McMurry, J. 2006

O biodiesel possui este nome por ser derivado de produtos de origens biológicas e possuir características e desempenho semelhantes ao diesel derivado do petróleo, apesar da estrutura química do biodiesel ser diferente da do óleo diesel mineral. Ele apresenta a vantagem de ser um combustível mais limpo, pois sua queima é mais completa que a do óleo diesel comum, o que reduz a produção de monóxido de carbono e também evita a emissão de materiais particulados na atmosfera, não traz na sua composição substâncias carcinogênicas, o teor de enxofre é muito menor, e tem alta biodegradabilidade (Sharma, Y. C. e Singh, B. 2009).

Como o biodiesel tem o mesmo desempenho em motores de ignição por compressão, que os óleos dieleis minerais, não é necessária nenhuma espécie de conversão ou adaptação deste tipo de motores. Apesar das vantagens ambientais do biodiesel, ele ainda não pode ser utilizado na forma pura (100% de biodiesel) como combustível, uma vez que possui algumas propriedades danosas como aumento de emissão de NO_x e redução do desempenho do motor em baixas temperaturas. (Sharma, Y. C. e Singh, B. 2009). Por isso, atualmente, o biodiesel é utilizado em misturas com o óleo diesel mineral.

Outra desvantagem do biodiesel é a estabilidade oxidativa; esta propriedade provoca a degradação do biodiesel com o tempo, rancificando o combustível e alterando algumas de suas propriedades. A estabilidade oxidativa influencia a qualidade do combustível e este problema se manifesta na estocagem e transporte do biodiesel. A presença de alguns fatores como ar, luz, altas temperaturas e metais promovem a oxidação. A natureza dos radicais da cadeia dos triglicerídeos também afetam sua estabilidade: cadeias graxas com ligações duplas quando oxidadas geram compostos instáveis chamados de hidroperóxidos, que atacam elastômeros em contato com o combustível ou iniciando uma polimerização, formando produtos insolúveis, tornando o biodiesel instável e inutilizável. (Knothe, G. 2007 e Focke, W. W. et al, 2012). Muitos estudos estão sendo realizados para solucionar este problema.

No Brasil desde a Lei 11.097 de 13 de janeiro de 2005, que determina o uso de biodiesel misturado ao diesel, diversas empresas passaram a investir

na produção deste biocombustível pela sua facilidade de produção e óbvia rentabilidade financeira. Inicialmente utilizando plantas conhecidas com alto teor de óleo, baixo custo de cultivo e pleno "know-how" de extração do óleo; tais plantas como a soja, o milho, a canola, o girassol, a mamona, etc.; e sempre buscando matrizes mais rentáveis, que produzam uma maior quantidade de óleo com um menor custo. Contudo estas plantas também são utilizadas para o consumo humano, o que pode acarretar em uma competição no uso da terra para a produção de alimentos e produção de biomassa para combustíveis, provocando um aumento no custo dos grãos oleaginosos e conseqüentemente a elevação do custo do biodiesel que reduzirá sua competitividade com o diesel mineral (Satyanarayana, K. G., et al, 2011; Campbell, P. K., Beer, T., Batten, D., 2011).

Para o biodiesel ser rentável é desejável que seja produzido por matrizes que evitem competição com a alimentação, como óleos não comestíveis, gordura animal, óleos residuais e óleos de microalgas, fontes que não necessitem das terras agricultáveis (Sato, A. et al, 2010; Cheirsilp, B. et al, 2011). Apenas a produção de plantas oleaginosas não é suficiente para suprir a demanda de biodiesel necessária (Meng, X., et al, 2009), é imprescindível a utilização de outras fontes de matéria-prima para produção deste biocombustível.

De acordo com a literatura, as microalgas quando comparadas a outras matérias-primas produtoras de óleo apresentam uma elevadíssima produtividade, (Chisti, Y., 2007) sendo, portanto, uma matéria-prima capaz de suprir a totalidade do biodiesel necessário para atingir a meta de adição ao diesel, e sem conflitos relacionados ao uso da terra para finalidades alimentícias. As microalgas não necessitam da terra utilizada para a agricultura, nem de muito espaço para seu plantio, pois são cultivadas em tanques ou biorreatores necessitando apenas de luz e alguns nutrientes, e sua colheita é mais rápida, podendo ser realizada em poucos dias de cultivo (Mata, T.,2010).

3.1.4. Microalgas

3.1.4.1. Introdução

Microalgas são organismos fotossintetizantes de ambientes aquáticos, tanto de água doce quanto de água salina, que podem existir individualmente, na forma de células unitárias, em cadeias ou grupos; e as células só podem ser visualizados com auxílio de lupas ou microscópios. Elas apresentam um ciclo de vida rápido com ampla diversidade de espécies de microalgas e gêneros (Chisti, Y., 2008; Moazami, N. et al, 2011; Satyanarayana, K. G. et al, 2011).

O crescimento de organismos fotossintetizantes necessita de luz, dióxido de carbono (CO₂), água e sais inorgânicos, principalmente nitrogênio (N) e fósforo (P) (Chisti, Y., 2007). Assim, se for atendida a demanda nutricional mínima, as microalgas podem ser cultivadas de diversas formas, em pequena escala, dentro de laboratórios, utilizando elearnmeyers ou qualquer outro recipiente transparente para permitir a passagem da luz, como garrafas plásticas, ou em grande escala, necessitando de um espaço maior, em lagoas fotossintetizantes e em fotobiorreatores fechados.

Lagoas fotossintetizantes são, na verdade, sistemas abertos de tanques rasos de concreto ou de terra batida revestidos com plástico, com recirculação da água normalmente feita por uma roda de pás para não decantar a biomassa, o controle de contaminação e predadores é bastante limitado. A produção de biomassa é considerada baixa devida à disponibilidade restrita do CO₂ e da luz solar, que existe apenas na superfície das lagoas ou tanques (Harun, R., et al, 2010; Satyanarayana, K. G. et al, 2011; Campbell, P. K., Beer, T., Batten, D., 2011).

Os fotobiorreatores são sistemas fechados transparentes, feitos de plástico ou vidro, que podem ser expostos à luz solar ou luz artificial. O formato é variado, sendo mais comum os fotobiorreatores tubulares ou de placas planas. Nestes sistemas é possível fazer o controle da incidência de luz,

temperatura, injeção de CO₂ e pH do meio. As microalgas são mantidas em circulação com fluxo turbulento para evitar a sedimentação e para reduzir o depósito nas paredes. A produção de microalgas em fotobiorreatores é maior que em lagoas fotossintetizantes, contudo o custo de instalação e manutenção é mais elevado (Harun, R., et al, 2010; Satyanarayana, K. G. et al, 2011).

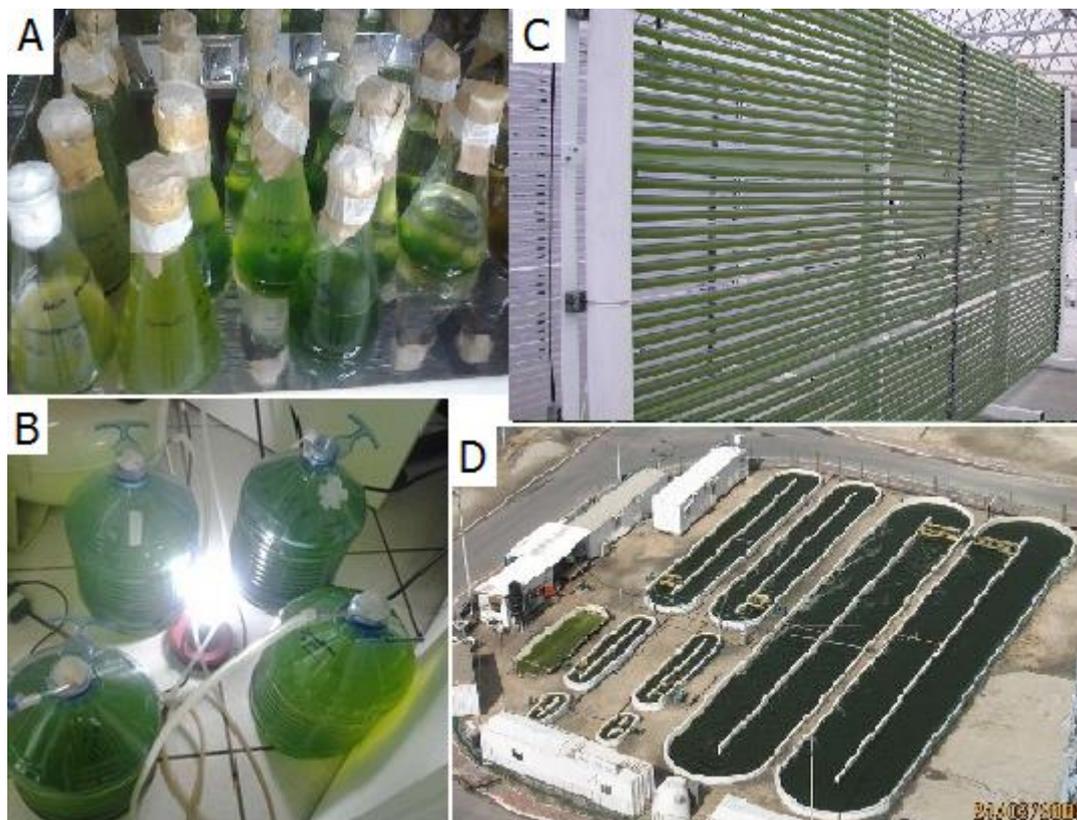


Figura 2. Formas de cultivo das microalgas (A) Em erlenmeyer (B) Em galões plásticos (C) Fotobiorreator tubular (D) Lagoas fotossintetizantes. Fonte: (A) e (B) Próprio autor; (C) e (D) Greenwell, H. C. et al, 2011.

3.1.4.2. Aplicação comercial

O potencial de utilização das microalgas em aplicações comerciais vem sendo reconhecido para a produção de vários compostos como vitaminas, pigmentos, carotenoides, proteínas, aminoácidos, lipídeos, polissacarídeos e biocombustíveis pelas indústrias alimentícias e farmocsméticas (Sidney, E.B., 2010; Satyanarayana, K. G. et al, 2011).

Substâncias produzidas pelas microalgas podem ser utilizadas em diversas áreas comerciais. Compostos bioativos como antibióticos, antioxidantes e toxinas são utilizados pelas indústrias farmacêuticas. Esta indústria também aproveita o alto teor de proteínas, vitaminas e polissacarídeos das microalgas para o consumo humano (Sidney, E.B., 2010; Satyanarayana, K. G. et al, 2011).

Pigmentos como a clorofila e os carotenoides assim como os próprios extratos das microalgas possuem interesse na produção de cosméticos e corantes de alimentos. Em uso no mercado existem o extrato de *Arthrospira sp.* e *Chlorella vulgaris* utilizados em cremes antienvhecimento e para estimular a síntese de colágeno na pele (Spolaore, P., et al, 2006; Duarte, D. R. S., et al, 2010; Satyanarayana, K. G. et al, 2011).

Carotenoides são compostos lipofílicos que se caracterizam por ter uma estrutura química com 40 átomos de carbono, que inclui uma cadeia principal de nove ligações duplas conjugadas, flanqueadas por estruturas anelares de seis carbonos nas extremidades (Pereira e Yen, 2007). A estrutura química típica dos carotenoides, que possui diversas ligações duplas, é responsável pela coloração (laranja, amarelo ou vermelho), presentes em alguns frutos, vegetais, fungos e flores, uma vez que as ligações duplas absorvem parte do espectro luminoso nelas incidentes (Christaki, E., 2012).

Possivelmente os carotenoides de maior importância comercial que as microalgas produzem são o β -caroteno e a astaxantina. A astaxantina é amplamente utilizada na alimentação de peixes, em particular o salmão, e na fabricação de cosméticos pela sua coloração vermelha intensa e elevada atividade antioxidante (maior que a das vitaminas C e E). O β -caroteno possui alto valor nutricional, pois é o precursor da vitamina A no organismo humano (Christaki, E., 2012, Hopkins 1995).

As microalgas são fonte de vitaminas essenciais como as vitaminas A, B1, B2, B6, B12, C, E e outras que possuem grande valor nutricional. Substâncias como o ômega 3, e a clorofila vêm sendo amplamente utilizados na alimentação humana. Devido sua forte pigmentação verde, a clorofila é

usada como corante natural em alimentos processados, e nas microalgas a clorofila equivale cerca de 4% do peso seco. (Harun, R., 2010)



Figura 3. Astaxantina. Estrutura química (A), como comercializada (B) e Visualizada na microalga *Haematococcus pluvialis* (C) Fonte: Próprio autor (Microscópio Zeiss modelo AxioStar plus, lente CP-ACHROMAT 10X, câmera AxioCam ERc 5s)



Figura 4. β-caroteno. Estrutura química (A), como comercializada (B) Fonte: Próprio autor

Atualmente o ômega 3 utilizado como suplemento alimentar é extraído de peixes, o que é uma desvantagem, pois é considerado, por muitas pessoas, um produto de sabor desagradável. As microalgas são produtoras dos ácidos

graxos de ômega 3 e ômega 6 e podem suprir este mercado (Harun,R., 2010 e Spolaore, P., 2006).

3.1.4.3. Lipídeos de Microalgas

Tradicionalmente, foram definidos como lipídeos compostos bioquímicos que não são solúveis em água, e solúveis em solventes orgânicos. Esta definição tem sido a base para a quantificação da fração de "lipídeos totais" em microalgas, isto é, a quantidade total de compostos solúveis extraídos da biomassa com uma mistura de solventes, principalmente clorofórmio/metanol, baseado em um método originalmente descrito por Bligh & Dyer (1959). Fica evidente, pela diversidade de publicações sobre o teor de lipídeos de microalgas, a inconsistência gerada por esse conceito de lipídeos, e devido a este fato diferentes grupos de pesquisa têm apresentado valores de lipídeos consideravelmente diferentes, após utilizar diversas misturas de solventes orgânicos para extração (Greenwell, H. C. ET AL, 2011).

Se for considerada a conhecida noção química: "Semelhante dissolve semelhante" faz sentido que os "lipídeos" obtidos variem de acordo com a mistura de solventes utilizada na extração, às substâncias obtidas serão em realidade seletivamente extraídas de acordo com as variações experimentais e a polaridade dos solventes utilizados (Brum, A. A. S.; Arruda, L. F.; Regitano-d'Arce, M. A. B. 2009).

Deste modo, os lipídeos que são úteis na produção do biodiesel seriam obtidos de experimentos que utilizam solventes ou mistura de solventes com características e polaridades semelhantes aos dos ácidos graxos e triacilglicerídeos, entretanto testes que utilizem solventes ou mistura de solventes mais polares apresentariam um "rendimento" maior; contudo, isto seria em realidade um equívoco, pois o material extraído teria uma combinação rica de substâncias sem interesse ao processo de produção do biodiesel como composição principal e majoritária ao exemplo de pigmentos como a clorofila.

Este aspecto da investigação de lipídeos é importante e tem sido amplamente negligenciado. Principalmente porque os valores relatados como

quantidade de lipídeos totais têm servido como uma base na qual um grande número de modelos técnico-econômicos para produção de biocombustíveis de algas têm sido construídos. Pesquisadores que trabalham com microalgas, atuais e futuros, precisam considerar as variações das quantidades de lipídeos para atender a necessidade de uma metodologia mais robusta e abrangente na quantificação de lipídeos (Greenwell, H. C. et al, 2011).

É notório que algumas espécies de microalgas são ricas em lipídeos e possuem um ciclo de crescimento extremamente rápido, por isso seu potencial de produção de biocombustíveis e ácidos graxos poli-insaturados são muito estudados. A composição de lipídeos e seu teor variam de acordo com a espécie de microalga, as condições de cultivo e a constituição genética. (Vijayaraghavan, K. e Hemanathan, K. 2009; Meng, X. et al, 2009).

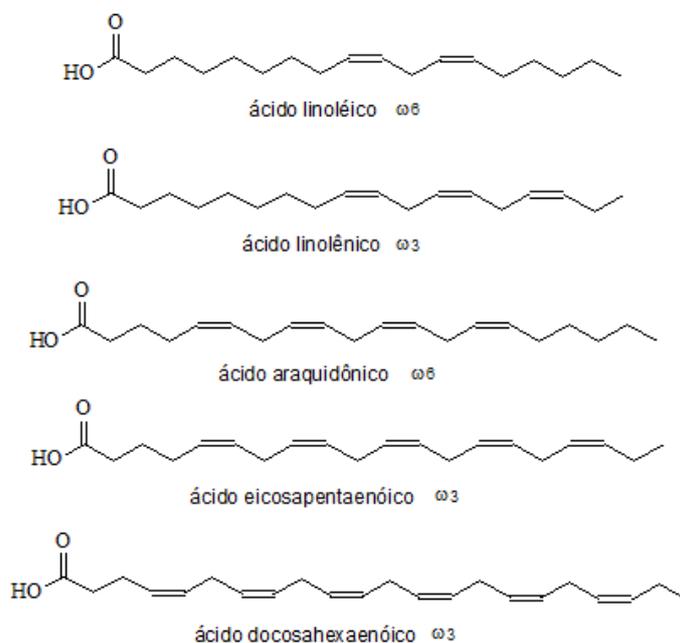


Figura 5. Ácidos graxos presentes nas microalgas.

Diversos estudos mostram que a biomassa de microalgas é rica em ácidos graxos como os ácidos linolênico, linoleico, araquidônico,

eicosapentaenoico e docosaexaenoico, também conhecidos como ômega 3 e ômega 6 (Figura 5). A maioria das microalgas tem como componente majoritário de seus óleos os triglicerídeos, superior a 80%, com o perfil de ácido graxo preponderante de cadeias contendo de 16 a 18 átomos de carbono (Zhukova, N. V. e Aizdaicher, N. A., 1995; Meng, X. et al, 2009; Cheirsilp, B. et al, 2011; Liu, J. et al, 2011, Couto, R. M., et al, 2010).

3.1.4.4. Biocombustíveis de Microalgas

Microalgas podem fornecer diversos tipos de biocombustíveis renováveis, como o biometano, o bioetanol, o biodiesel, o bio-hidrogênio, utilizando os processos de liquefação, pirólise, gaseificação, extração e transesterificação, fermentação e digestão anaeróbica (Demirbas, M. F., 2011; Moazami, N. et al, 2011).

O bioetanol é obtido de microalgas através da coleta da biomassa do meio de cultivo aquático, que após sua secagem, é hidrolisada, fermentada e por fim destilada (Demirbas, A. e Demirbas, M. F., 2010). O biodiesel é produzido pelo processo químico de transesterificação do óleo extraído da biomassa de microalgas. Pelo processo de gaseificação, que inclui as etapas de pirólise ou decomposição térmica, oxidação, gaseificação (reações heterogêneas e homogêneas), craqueamento do alcatrão e ao final a oxidação parcial dos produtos de pirólise, os gases combustíveis Hidrogênio (H_2), Dióxido de carbono (CO_2), Metano (CH_4) e amônia (NH_3) são produzidos.

A biomassa original ou a residual da extração do óleo para produção de biodiesel pode também ser submetida à digestão anaeróbica para produzir o biogás (majoritariamente metano). Já o biopetróleo é obtido pela liquefação da biomassa de microalgas em solução salina por meio de autoclaves com agitação mecânica, e a extração é realizada com diclorometano (CH_2Cl_2). (Minowa, T. et al., 1995; Chisti, Y., 2006; Demirbas, M.F., 2011).

3.1.4.5. Espécies Estudadas

As espécies estudadas neste trabalho foram: *Desmodesmus sp.*, *Dunaliella salina*, *Dunaliella tertiolecta*, *Haematococcus pluvialis*, *Nannochloropsis sp.* Todas estas espécies são microalgas verdes, ou seja, do filo Chlorophyta.

Nesta parte do trabalho, as descrições de lipídeos são feitas como na literatura, considerando os teores de lipídeos totais expostos por outros autores. Em seguida será abordada a determinação dos lipídeos aplicáveis na produção de biodiesel (lipídeos neutros).

3.1.4.5.1. *Desmodesmus sp.*

Microalgas do gênero *Desmodesmus* são microalgas verdes, geralmente, colônias planas retas ou levemente curvadas com grupos de 2, 4 ou 8 células unidas lateralmente, as células têm formatos ovais a elípticos, com extremidades arredondadas e presença de longos “espinhos”. São cultivadas em meios de água doce (El Semy, N. A., 2011).



Figura 6. *Desmodesmus sp.* Fonte: Próprio autor (Microscópio Zeiss modelo AxioStar plus, lente CP-ACHROMAT 10X, câmera AxioCam ERc 5s)

O perfil graxo das microalgas do gênero *Desmodesmus* foge do padrão do filo Chlorophyta com uma maior abundância do ácido palmítico (16:0) e a ausência do docosaenoico (22:0) (El Semy, N. A., 2011). Este perfil é favorável

à produção de biodiesel, uma vez que a predominância de ácidos graxos saturados promove maior estabilidade oxidativa.

3.1.4.5.2. *Dunaliella salina* e *Dunaliella tertiolecta*

Microalgas do gênero *Dunaliella* são células individuais com diâmetro de 6 a 12 μm , têm um formato oval ou elíptico, possuem dois flagelos similares no cume e são cultivadas em meio salino (Cifuentes, A., Gonzales, M. e Parra, O., 1995). A *Dunaliella salina* pode ser cultivada em condições de salinidade extrema, em meios de cultivo com até 10% de concentração de sal (Gilmour, D. J., 1982).



Figura 7. *Dunaliella salina*. Fonte: Próprio autor (Microscópio Zeiss modelo AxioStar plus, lente CP-ACHROMAT 10X, câmera AxioCam ERc 5s)



Figura 8. *Dunaliella tertiolecta*. Fonte: Próprio autor (Microscópio Zeiss modelo AxioStar plus, lente CP-ACHROMAT 10X, câmera AxioCam ERc 5s)

Em estudos envolvendo a microalga *Dunaliella tertiolecta* para produção de biopetróleo foi obtido um rendimento de 37% deste biocombustível (Amim, S., 2009; Huang, G. et al 2010). Em outros trabalhos o teor de óleo para produção de biodiesel descrito variou entre 15 e 70% dependendo do meio

utilizado para o cultivo (Chen, C-Y., et al, 2011). Já a *Dunaliella salina* apresenta uma menor quantidade de lipídeos que a *D. tertiolecta*, variando em uma faixa de 6 a 25% (Amaro, H. M., Guedes, A. C., Malcata, F. X., 2011). Ambas as espécies apresentam um perfil graxo rico no ácido linolênico (Zhukova, N. V. e Aizdaicher, N. A. 1995).

3.1.4.5.3. *Haematococcus pluvialis*

A *Haematococcus pluvialis* é uma microalga unicelular que possui forma elipsoidal, esférica ou formato de pera. No início do seu ciclo celular possui flagelos que são perdidos na fase posterior. A parede celular desta microalga é mais resistente que a maioria das Chlorophytas (Ghiggi, V., 2007). A *H. pluvialis* é cultivada em meios de água doce, como o próprio nome diz, em águas pluviais.

Esta espécie de microalga é mais comumente cultivada para produção de astaxantina, mas em certas condições a *Haematococcus pluvialis* possui um perfil graxo que pode produzir biodiesel de qualidade. Em privação de nitrogênio a *H. pluvialis* começa a acumular astaxantina que é acompanhada pelo acúmulo de ácidos graxos, principalmente o ácido oleico (Razon L.F. e Tan, R.R., 2011). A concentração média de lipídeos na *Haematococcus pluvialis* é de 25% (Amaro, H.M. et al, 2011).

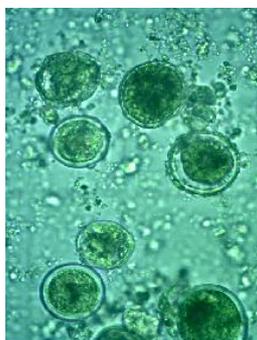


Figura 9. *Haematococcus pluvialis*. Fonte: Próprio autor (Microscópio Zeiss modelo AxioStar plus, lente CP-ACHROMAT 10X, câmera AxioCam ERc 5s)

3.1.4.5.4. *Nannochloropsis sp.*

Microalgas do gênero *Nannochloropsis* são cultivadas em meios salinos e possuem um tamanho relativamente pequeno de 2 a 4 μm (Razon, L.F. e Tan, R.R. 2011), são células unitárias de formatos esféricos ou semiesféricos (Soto, M. N. 2000).

Diversos valores de quantidade de lipídeos já foram encontrados para microalgas desse gênero, os teores variam de 12 a 60% (Amaro, H.M. et al, 2011). Cepas deste gênero possuem um grande potencial para a produção de biodiesel a partir de apenas uma espécie, *Nannochloropsis sp.* apresenta alta produtividade de biomassa e o perfil de ácidos graxos rico em ácido linolênico e outros ácidos graxos poli-insaturados (Moazami, N. et al 2011).

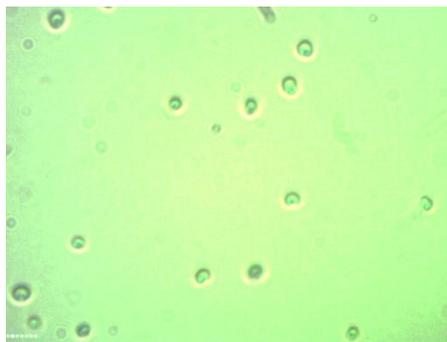


Figura 10. *Nannochloropsis sp.* Fonte: Próprio autor (Microscópio Zeiss modelo AxioStar plus, lente CP-ACHROMAT 10X, câmera AxioCam ERc 5s)

3.1.5. Métodos de Análise Espectroquímicos

3.1.5.1. A teoria espectroquímica

Existem diversas técnicas de análise baseadas na radiação eletromagnética. Os métodos espectroquímicos são amplamente utilizados na determinação de estruturas moleculares e em análises qualitativas e quantitativas de compostos químicos orgânicos e inorgânicos.

Métodos espectroscópicos de análise são baseados na medida da quantidade de radiação absorvida ou produzida pelas moléculas ou espécies atômicas de interesse. Os métodos espectroquímicos que utilizam a radiação eletromagnética visível, ultravioleta e infravermelha são chamados de métodos ópticos (Skoog, A. D., et al, 2006, Silverstein, R. M., et al, 1991).

Este tipo de análise é possível devido às interações que existem entre a luz e a matéria em nível molecular e atômico. Apesar de existir varias formas de interação da radiação eletromagnética com os compostos, como reflexão, refração, espalhamento elástico, interferência e difração, os tipos de interações mais relevantes para as técnicas espectroscópicas envolvem transições entre diferentes níveis energéticos das espécies químicas (Skoog, A. D., et al, 2006, Silverstein, R. M., et al, 1991, McMurry, J. 2006).

A amostra é geralmente estimulada aplicando várias formas de energia como calor, eletricidade, luz, partículas e reações químicas. Antes de receber o estímulo, as espécies de interesse estão, predominantemente, em seu estado fundamental (estado de menor energia), ao receber o estímulo, essas espécies recebem a energia que provoca a transição para o estado excitado (estado de maior energia). As informações são obtidas pela medida da radiação eletromagnética emitida pelas espécies quando retornam ao seu estado normal, ou pela quantificação da energia que foi absorvida para promover a excitação (Skoog, A. D., et al, 2006, Silverstein, R. M., et al, 1991, McMurry, J. 2006).

Cada espécie molecular ou atômica absorve em uma frequência própria de radiação eletromagnética característica. A energia é transferida para a espécie química e ocorre uma diminuição na intensidade da radiação eletromagnética incidente (Skoog, A. D., et al, 2006, Silverstein, R. M., et al, 1991, McMurry, J. 2006).

A lei da absorção (Lei de Beer) diz que é possível quantificar espécies químicas através da quantidade de energia eletromagnética que é absorvida. Segundo esta lei, a quantidade de energia que é absorvida é diretamente proporcional à quantidade de analito presente e ao caminho percorrido pela

radiação, pois existindo uma maior quantidade de moléculas ou espécies atômicas de interesse, mais radiação será absorvida e quanto maior for o percurso, a radiação passará por mais espécies absorventes. Desta forma, acarretando em uma atenuação do sinal de emissão que pode ser mensurado (Skoog, A. D., et al, 2006).

Os resultados dessas medidas são expressos por meio de espectros, que são os gráficos da radiação emitida em função da frequência ou do comprimento de onda. Os tipos de interações específicos observados nas técnicas ópticas dependem fortemente da energia da radiação empregada e do modo de detecção.

3.1.5.1.1. Espectroscopia de Fluorescência

Na espectroscopia de fotoluminescência a emissão de fótons é medida após a absorção. As formas mais importantes de fotoluminescência para os propósitos analíticos são fosforescência e fluorescência. Estas formas de espectroscopia são resultado da absorção da radiação eletromagnética e da dissipação de energia por emissão de luz. Na fosforescência, da mesma forma que ocorre na fluorescência, uma substância emite radiação visível porque absorve energia da luz fornecida por determinada fonte. Entretanto, nesse caso, mesmo depois que o fornecimento de energia parou, a substância fosforescente continua por algum tempo emitindo luz visível. Esse tempo pode variar desde frações de segundos até dias. (Skoog, A. D., et al, 2006).

A medida é realizada aplicando à amostra energia em um determinado comprimento de onda (comprimento de onda de excitação), para que ocorra a absorção, e depois é mensurada a radiação emitida em um comprimento de onda maior (comprimento de onda de fluorescência). Na espectroscopia de fluorescência ou espectrofluorescência, as moléculas absorvem radiação eletromagnética, e são excitadas para níveis energéticos mais elevados, então sofrem o relaxamento liberando a energia na forma de luz (Skoog, A. D., et al, 2006).

Na Figura 11 o processo de absorção de energia e emissão de fluorescência é demonstrado em forma de diagrama. A molécula que se encontra no estado fundamental (E_1) recebe a radiação incidente em diferentes comprimentos de onda (λ_1 a λ_{10}) e é promovida aos níveis excitados (E_1 e E_2), quanto maior a energia absorvida, mais alto é o nível energético e o nível vibracional que a molécula passa a ocupar momentaneamente. Após a excitação, o excesso de energia é liberado na forma de emissão fluorescente (λ) e as moléculas retornam dos estados excitados (E_1) para os diferentes níveis vibracionais do estado fundamental (E_0).

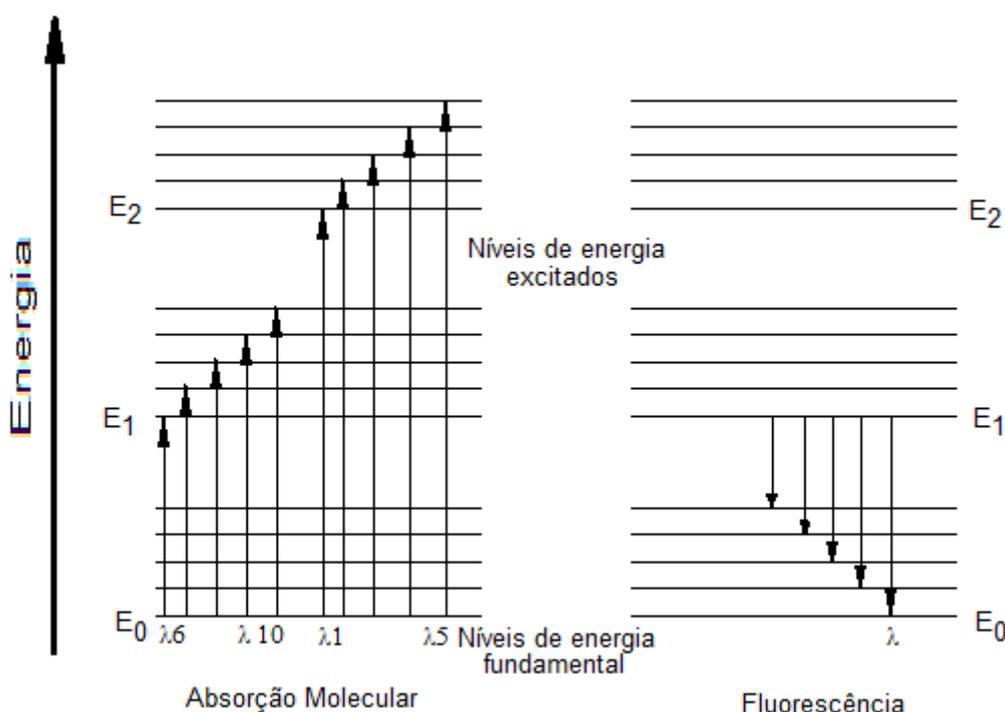


Figura 11. Diagrama parcial de níveis de energia para uma molécula hipotética

Para a aplicação desta técnica é necessário que a molécula de interesse seja uma espécie absorvente e fluorescente, o que depende da estrutura química dos compostos.

3.1.5.1.1.1. Substâncias Absorventes

Moléculas orgânicas absorvem energia na faixa de 180 a 780 nm (UV-Visível), esta energia interage com os elétrons que participam diretamente de ligações químicas, ou estão localizados livres em átomos eletronegativos como

oxigênio, nitrogênio, enxofre e halogênios. O comprimento de onda no qual as substâncias absorvem depende da força de ligação dos elétrons. Ligações mais fortes requerem maiores quantidades de energia (menores comprimentos de onda) (Skoog, A. D., et al, 2006; McMurry, J. 2006).

Em ligações simples, os elétrons estão fortemente ligados, por isso requerem maiores energias. Já em ligações duplas ou triplas, comprimentos de onda na faixa do UV-Visível são suficientes para promover a excitação pois a ligação eletrônica é mais fraca. Os grupos orgânicos que absorvem nas regiões do UV-Visível são chamados de cromóforos. Então compostos insaturados, ou poli-insaturados absorvem a radiação eletromagnética, logo são substâncias absorventes (Skoog, A. D., et al, 2006; McMurry, J. 2006).

3.1.5.1.1.2. Substâncias Fluorescentes

Para uma substância ser fluorescente, é necessário que primeiro ela seja capaz de absorver a radiação eletromagnética. Todas as moléculas absorventes têm potencial para ser fluorescente, mas devido a suas conformações estruturais, nem toda substância absorvente também é fluorescente (Skoog, A. D., et al, 2006).

Diversos fatores influenciam na fluorescência das moléculas como a estrutura molecular, a rigidez estrutural, o solvente e a temperatura. Compostos alicíclicos e alifáticos com estrutura de ligações duplas conjugadas fluorescem e compostos que contêm anéis aromáticos apresentam emissão de fluorescência maior. A fluorescência é particularmente favorecida pela rigidez molecular, neste tipo de estrutura a velocidade de relaxação é diminuída, colaborando assim com a emissão da fluorescência (Skoog, A. D., et al, 2006).

3.1.5.1.1.3. Vermelho do Nilo (Nile Red)

O Vermelho do Nilo, 9-dietilamino-5H-benzo(α)fenoxazina-5-ona, é um corante liposeletivo, isto é, ele se associa às moléculas lipídicas neutras. O vermelho do Nilo é muito utilizado em análises para determinação qualitativa e

quantitativa de lipídeos intracelulares em diferentes tipos de células (Liu, Z-Y., Wang, G-C., Zhou, B-C., 2008).

Este corante é aplicado principalmente nas técnicas de microscopia de fluorescência e citometria em fluxo. O Vermelho do Nilo pode ser excitado na faixa de comprimento de onda $\lambda = 450$ a 560 nm e sua radiação de fluorescência é medida na faixa de comprimento de onda $\lambda = 500$ a 750 nm.

A estrutura molecular do vermelho do Nilo (Figura 12) explica a sua utilização em técnicas de análise fluorimétrica. A abundância de insaturações conjugadas e anéis aromáticos favorecem a fluorescência da molécula.

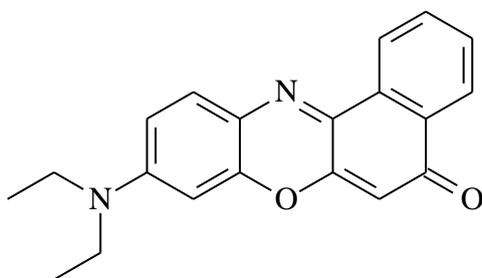


Figura 12. Estrutura molecular do corante Vermelho do Nilo. Fonte: Próprio autor

3.1.5.1.2. Espectroscopia de Infravermelho distante

A Espectrofotometria de Absorção no Infravermelho é uma técnica amplamente utilizada na determinação de estruturas moleculares e identificação de substâncias puras. Todas as substâncias absorvem a radiação infravermelha e por isso ela poderia ser amplamente utilizada, mas devido a menor sensibilidade e desvios frequentes da lei de Beer, ela é pouco utilizada em análises quantitativas (Skoog, A. D., et al, 2006, Silverstein, R. M., et al, 1991, McMurry, J. 2006).

A radiação infravermelha geralmente não possui energia suficiente para promover transições eletrônicas como as radiações ultravioleta e visível, porém pode provocar transições nos estados vibracionais e rotacionais no estado eletrônico fundamental da molécula. Moléculas simples podem ter diversos

modos de vibração, e depende do número de ligações que existem nelas (Lopes, W. A. e Fascio, M., 2004; Skoog, A. D., et al, 2006, Silverstein, R. M., et al, 1991, McMurry, J. 2006).

Os tipos de vibrações moleculares mais comuns são as vibrações de estiramento, que podem ser simétricas ou assimétricas, e de deformação angular, que podem ser balanço no plano (rocking), tesoura no plano (scissoring), oscilação fora do plano (wagging) e torção fora do plano (twisting) (Skoog, A. D., et al, 2006). Determinados grupos moleculares podem ser identificados por suas bandas de absorção, permitindo que macromoléculas (incluindo proteínas, lipídeos, hidratos de carbono e ácidos nucleicos), sejam quantificadas (Dean, A. P. et al 2010).

3.1.6. Métodos de Análise Cromatográficos

Técnicas cromatográficas são amplamente utilizadas na química e bioquímica, na área de pesquisa e indústria, para separar, identificar e determinar componentes em misturas. Existem várias técnicas cromatográficas que variam de complexidade, de tão simples que qualquer leigo pode usufruir a tão complexas que apenas especialistas podem manipular.

3.1.6.1. Princípios Básicos de Cromatografia

Cromatografia é um método físico-químico de separação de substâncias em misturas, no qual os componentes da mistura são distribuídos entre duas fases, uma estacionária e outra móvel. As duas fases têm contato direto e, enquanto a fase móvel desloca-se pela fase estacionária as substâncias de interesse são distribuídas entre elas. Os compostos são retidos pela fase estacionária seletivamente, deste modo realizando a separação com base nas diferentes velocidades de deslocamento das substâncias (Collins, C., et al, 2006).

A separação por cromatografia é feita por diferentes formas de interação das substâncias com as fases estacionária e móvel. O composto que possuir maior afinidade com a fase móvel terá menos contato com a estacionária,

sendo liberado mais rápido. Contudo se a substância possuir maior afinidade com a fase estacionária, ela ficará retida e demorando mais tempo no sistema (Collins, C., et al, 2006).

O resultado das análises cromatográficas é dado em cromatogramas que podem ser gráficos formados pelos sinais dos detectores, ou a própria superfície planar. Cada tipo de cromatografia possui métodos específicos para obter informações quantitativas.

3.1.6.2. Cromatografia em Camada Delgada

A Cromatografia em Camada Delgada (CCD) é uma técnica cromatográfica de fácil compreensão e execução, rápida, versátil e de baixo custo. Este método é classificado como cromatografia planar, pois a fase estacionária (adsorvente) é uma camada fina suportada em uma superfície plana de vidro, plástico ou metal. A fase móvel locomove-se sobre a fase estacionária por ação da capilaridade, em cubas de vidro saturadas com ajuda de papel de filtro (Collins, C., et al, 2006).

Na cromatografia em camada delgada a fase estacionária é uma camada fina e plana de partículas finamente divididas. O mecanismo de separação é a adsorção da amostra na interface da fase estacionária e da móvel. Existe uma grande variedade de adsorventes que são aplicados em CCD, os mais comuns são a sílica (SiO_2), a alumina (Al_2O_3), a celulose e poliamida (Collins, C., et al, 2006).

A sílica é utilizada na separação de compostos lipofílicos (aldeídos, cetonas, fenóis, ácidos graxos, ésteres, aminoácidos, alcaloides, terpenóides e esteroides) (Collins, C., et al, 2006). As placas de CCD podem ser preparadas por espalhamento para o uso em análise, ou pré-fabricadas. O procedimento de preparo das placas será descrito no capítulo 4 (Metodologia).

As fases móveis mais comuns em cromatografia em camada delgada são a mistura de solventes orgânicos, se fase estacionária for polar a fase móvel será mais apolar. A seleção da fase móvel é muito importante para

melhor separação dos componentes da mistura, as interações entre as substâncias de interesse, a fase móvel e a fase estacionária devem ser consideradas na escolha da fase móvel (Collins, C., et al, 2006).

As cromatoplasmas são desenvolvidas pela imersão parcial da placa no sistema eluente (fase móvel) que passa e arrasta os componentes da amostra. A distância percorrida pelas substâncias (d_r) e a distância do início ao final da eluição percorrida pela fase móvel (d_m) são utilizadas para calcular o fator de retenção (R_f). O fator de retenção é utilizado para análises qualitativas, para identificação de uma substância quando comparada com o R_f de um padrão eluído nas mesmas condições (Collins, C., et al, 2006).

$$R_f = \frac{d_r}{d_m}$$

A última etapa da análise em CCD é a revelação, após o desenvolvimento da placa, ela é seca e revelada. Existem diversas opções de reveladores que devem ser escolhidos de acordo com a natureza da amostra. Os reveladores devem se aplicados de forma uniforme, alguns dos mais comuns são a radiação ultravioleta, e reveladores que tingem as substâncias (Collins, C., et al, 2006).

Existem reveladores específicos para classes de compostos como o iodo que é um revelador amplamente utilizado em amostras orgânicas com insaturações. Geralmente iodo sólido é sublimado em uma cuba de vidro e as substâncias têm suas ligações insaturadas substituídas por átomos de iodo, revelando os componentes com uma cor castanha. Outro revelador indicado para compostos insaturados e alcoóis é a solução de permanganato, que forma manchas amareladas. Também se encontra reveladores que podem ser utilizados em diversos tipos de compostos como o ácido fosfomolibdico (PMA) que reage formando manchas verde-azuladas ou a vanilina sulfúrica que a coloração formada varia de acordo com a amostra.

A análise quantitativa da CCD pode ser realizada por densitometria, na qual a área e intensidade da mancha são determinadas. Mas outros métodos

podem ser utilizados como a fluorescência e a radioatividade, contudo equipamentos específicos são necessários (Collins, C., et al, 2006).

3.1.6.3. Cromatografia Gasosa

A Cromatografia Gasosa (CG) é uma técnica complexa, com elevado custo de instalação e manutenção, apresenta alta sensibilidade e excelente poder de resolução. A fase estacionária encontra-se dentro de um tubo bastante fino, com espessuras que variam de 0,1 milímetros a 4 milímetros, e podem medir de 2 metros a 50 metros ou mais de comprimento, este tubo é denominado coluna cromatográfica. As amostras devem ser voláteis e estáveis termicamente, caso contrário estas precisam ser derivatizadas, contudo a quantidade de amostra necessária é muito pouca, uma das vantagens da CG. Neste método a amostra é vaporizada, injetada na entrada da coluna cromatográfica e a fase móvel, que é um gás inerte, realiza a separação e no final tem-se o sistema de detecção (Collins, C., et al, 2006, Ciola, R., 1985, Skoog, A. D., et al, 2006).

Existem dois tipos de cromatografia gasosa, a cromatografia gás-líquido (CGL) na qual a fase estacionária é um líquido, e a cromatografia gás-sólido (CGS) na qual a fase estacionária é um sólido. Na CGS o mecanismo de separação é igual à CCD, por adsorção. Enquanto na CGL o processo é intrafacial, ou seja, ocorre absorção, ou partição, da amostra, procedimento baseado nas diferentes solubilidades dos componentes da amostra na fase estacionária. (Collins, C., et al, 2006, Ciola, R., 1985, Skoog, A. D., et al, 2006).

Durante a análise a temperatura da coluna pode ser constante (cromatografia gasosa isotérmica) ou pode variar com o tempo (cromatografia gasosa com temperatura programada). É muito comum utilizar em CG gradientes de temperatura, desta forma os componentes mais voláteis saem da coluna primeiro e as substâncias que apresentam maiores pontos de ebulição vão saindo com o aumento da temperatura (Collins, C., et al, 2006, Ciola, R., 1985, Skoog, A. D., et al, 2006).

Os detectores são muito importantes na cromatografia a gás, a seleção deve considerar os critérios de seletividade e sensibilidade, estabilidade e reprodutibilidade, resistência às condições de trabalho (vazão e temperatura), ruído e linearidade da resposta. Muitos tipos de detectores estão disponíveis no mercado, os mais utilizados são detectores por ionização em chama geralmente aplicáveis a hidrocarbonetos, detectores por condutividade térmica que é um detector universal, detectores de captura de elétrons utilizados em compostos halogenados, detectores com espectrômetro de massas ajustável a qualquer espécie de amostra, detectores termiônicos indicados a compostos de nitrogênio e fósforo, detectores de condutividade eletrolítica (Hall) adequados para substâncias contendo halogênios, enxofre ou nitrogênio, detectores de fotoionização apropriado às amostras ionizáveis por irradiação ultravioleta e detectores com infravermelho com transformada de Fourier cabível a compostos orgânicos (Collins, C., et al, 2006, Ciola, R., 1985, Skoog, A. D., et al, 2006).

O resultado da análise é exibido em um cromatograma, no qual os componentes da amostra analisada são representados por picos (sinais) que devem ser separados e simétricos, sem ombros ou caudas. A quantificação é realizada após a obtenção dos cromatogramas, os sinais são integrados e comparados com a quantidade das amostras, considerando a área ou a altura dos picos. Dois métodos são utilizados nas comparações, métodos com padrão externo e métodos com padrão interno (Collins, C., et al, 2006, Ciola, R., 1985, Skoog, A. D., et al, 2006).

No método com padrão externo, soluções de substâncias, semelhantes ou iguais à amostra de interesse, com concentrações conhecidas são analisadas previamente, e comparadas aos resultados obtidos, por um gráfico que relaciona a área do pico com a concentração. No método com padrão interno uma quantidade de padrão conhecido é adicionado à amostra, então razão da área do pico do padrão interno e da área do pico do analito é convertido em um parâmetro analítico na quantificação (Collins, C., et al, 2006, Ciola, R., 1985, Skoog, A. D., et al, 2006).

3.1.7. Análise Multivariada

A busca de melhores condições experimentais é feita por métodos de planejamento estatístico como o planejamento de experimentos, ou planejamento fatorial, que permite avaliar quais os fatores relevantes e em que grandeza eles influenciam o processo. Outro exemplo é a matriz de Doehlert, proposta em 1970 (Doehlert, D. H., 1970 apud Ferreira, S. L. C. 2004), que resulta numa superfície de resposta onde é possível identificar as melhores condições dos parâmetros e os pontos críticos. A análise multivariada é mais vantajosa que a univariada, pois requer uma quantidade de experimentos menor que a alternativa de variar um fator a cada experimento e não avalia o impacto das correlações entre os fatores (Ferreira, S. L. C., 2004; Pacheco, W. F., 2008).

3.1.7.1. Planejamento de Experimentos

O planejamento de experimentos fatorial envolve a busca de melhores condições na resposta e o menor custo na prática experimental com alta confiabilidade nos resultados e menor tempo de análises (Escaleira, L. A., 2005; Teófilo, R. F. E., 2006). Antes de iniciar a análise é necessário definir quem são as respostas e os fatores. Os fatores são as variáveis independentes do processo que podem ser quantitativas ou qualitativas e que são controláveis. E a resposta é a variável dependente que se deseja aperfeiçoar.

No planejamento fatorial determinam-se os níveis de cada fator, ou seja, a intensidade em que cada fator é estudado, e assim é composto o domínio experimental. Cada valor de nível pode ser identificado com valores simbólicos a depender da ferramenta estatística utilizada, os mais comuns são “+” e “-“ ou “0”, “1” e “2” para representar os diferentes níveis dos fatores.

A quantidade de experimentos realizada é definida de acordo com o número de fatores e níveis segundo a equação $n=k^f$, onde n é a quantidade de experimentos a serem realizados, f é o número de fatores estudados e k é o número de níveis. Os experimentos são organizados de modo que sempre ocorram diferentes combinações entre os níveis e os fatores, como pode ser

visto na Tabela 1, e são executados em ordem aleatória para diminuir o risco de erros sistemáticos de análise e tendenciamento das respostas

Tabela 1. Combinação do planejamento de experimentos para dois fatores com dois níveis.

Experimento	Fator A	Fator B	AB	Resposta
1	-	+	-	y1
2	-	-	+	y2
3	+	+	+	y3
4	+	-	-	y4

O efeito de cada fator e sua influência combinada pode ser calculado pela equação: $\text{Efeito} = (\sum \text{Resposta positiva} - \sum \text{Resposta negativa})/2$, no exemplo da Tabela 1 acima: $\text{Efeito do fator B} = ((y1+y3) - (y2+y4))/2$. Com a análise dos valores obtidos e dos gráficos gerados pelas ferramentas estatísticas é feita a determinação de quais fatores influenciam no processo e qual a intensidade desta influência.

Contudo o planejamento de experimentos fatorial resulta em um modelo multivariado linear, o que, em algumas situações não se adéqua ao processo real.

3.1.7.2. Matriz de Doehlert

A Matriz de Doehlert traz uma importante contribuição ao planejamento de experimentos quando, uma vez identificado o efeito das variáveis, dá um destaque aos fatores de maior impacto e sugere um modelo quadrático (Santos, W. N. L., 2006; Dias, F. S., 2007).

Em um planejamento de Doehlert com 2 fatores, o fator de maior efeito é estudado em cinco níveis, enquanto o fator de menor efeito é estudado em três níveis. Os valores simbólicos utilizados para identificar os diferentes níveis são calculados para que a combinação final dos fatores e níveis resulte em um hexágono equilátero, como pode ser visto na Figura 13, com um dos experimentos sendo o ponto central representado simbolicamente por 0 nas duas variáveis (Ferreira, S. L. C., 2004).

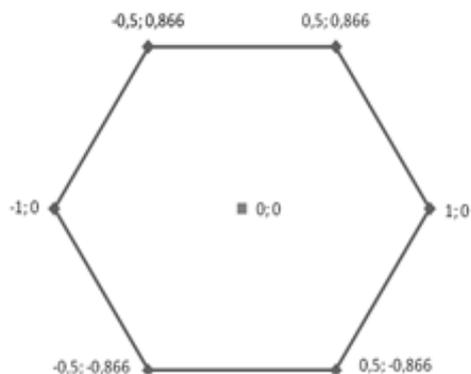


Figura 13. Representação do planejamento da matriz de Doehlert. Fonte: Próprio autor baseado em Ferreira, S. L. C., 2004

Portanto a quantidade de experimentos a ser realizada em um planejamento de Doehlert com dois fatores é apenas sete, para uma quantidade de fatores maior a quantidade de experimentos também aumenta. A Tabela 2 mostra como o planejamento da matriz de Dohler é feito. E assim como o planejamento experimental, os experimentos são realizados em ordem aleatória(Ferreira, S. L. C., 2004; Pacheco, W. F., 2008).

Tabela 2. Combinação da Matriz de Doehlert para dois fatores.

Experimento	Fator A	Fator B
1	0	0
2	+1	0
3	+0,5	+0,866
4	-1	0
5	-0,5	-0,866
6	+0,5	-0,866
7	-0,5	+0,866

.As ferramentas estatísticas geram a superfície de resposta que fornece os pontos críticos, e as melhores condições para a resposta. Pode indicar também a tendência do processo e a significância da influência dos fatores. Gerando por fim um modelo quadrático próximo à situação real(Ferreira, S. L. C., 2004; Pacheco, W. F., 2008).

3.2. Estado da Arte sobre determinação de lipídeos em microalgas

Diversas técnicas analíticas são utilizadas para quantificação e identificação de lipídeos. O que determina a técnica a ser utilizada é a matriz que se deseja analisar, a disponibilidade de equipamentos e recursos financeiros, e o tempo que pode ser dispensado até obter o resultado.

Godoy et al (1986) utilizaram ressonância magnética nuclear para determinar a concentração de óleo em sementes de amendoim, contudo a técnica de RMN, apesar de ser uma técnica bastante eficiente, não é disponível para os possíveis produtores de biodiesel, por ser um aparelho muito caro que necessita de treinamento adequado para a utilização e anos de estudo para análise dos resultados.

Os objetivos do estudo realizado por Yang et al. (2005) foram: usar espectroscopia de infravermelho próximo e distante com transformada de Fourier e espectroscopia Raman para discriminar 10 diferentes óleos e gorduras comestíveis, e comparar o desempenho destes métodos espectroscópicos. As características espectrais dos óleos comestíveis e as gorduras foram estudados, e as vibrações características das dupla ligações C=C foram identificadas e utilizadas para análise discriminante (DA). Os resultados obtidos por eles não atingiram o objetivo de quantificar os lipídeos, devido às limitações das técnicas as análises apenas tiveram caráter qualitativo.

Morais, M. G. e Costa, J. A. V. (2008) verificaram o conteúdo lipídico e o perfil dos ácidos graxos das microalgas *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella kessleri* e *Spirulina sp.*, cultivadas em diferentes concentrações de dióxido de carbono e bicarbonato de sódio. Os lipídios foram extraídos de acordo com o método de Folch & Lees (1957) e a determinação gravimétrica dos lipídios foi feita. A esterificação dos lipídios, para obtenção dos metil-ésteres dos ácidos graxos, foi conduzida de acordo com a metodologia proposta por Metcalfe & Schmitz (1966) e a determinação de ácidos graxos foi realizada em cromatografo a gás. Neste trabalho a quantificação foi realizada por gravimetria de maneira imprecisa, isto porque

não é possível garantir que todos os compostos extraídos são de fato lipídeos (podem haver proteínas, pigmentos e outras substâncias presentes nas microalgas) causando um erro na avaliação do verdadeiro teor de lipídeos nas microalgas. E a análise realizada por CG foi apenas qualitativa para identificar o perfil dos ácidos graxos existentes nas microalgas.

Liu, Z-Y., Wang, G-C. e Zhou, B-C. (2008) investigaram o efeito do uso de íons de Ferro como suplemento no meio de cultivo de microalgas da espécie *Chlorella vulgaris* para produção de lipídeos. A quantificação de lipídeos neutros foi realizada por espectrofluorimetria utilizando como corante o vermelho do Nilo. Nesse trabalho foi utilizado um espectrofotômetro fluorescente e os valores de fluorescência obtidos foram correlacionado com os valores gravimétricos dos lipídeos totais extraídos das células microalgais pelo método de Bligh & Dyer (1959). Trabalho semelhante ao descrito nesta dissertação com algumas diferenças essenciais correlatas à definição de lipídeos, Liu e colaboradores consideram lipídeos neutros como todo o material obtido pela extração descrita por Bligh & Dyer (1959), e no trabalho atual, é atribuída outra definição mais restrita.

Radmann, E. M. e Costa, J.A. V. (2008) realizaram uma pesquisa para verificar o conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos das microalgas *Spirulina sp.*, *Scenedesmus obliquus*, *Synechococcus nidulans* e *Chlorella vulgaris* cultivadas em meio contendo CO₂, SO₂ e NO. A quantificação dos lipídeos totais foi feita pelo método de Folch e Less (1957) e a identificação dos ácidos graxos por cromatografia gasosa. Este trabalho é semelhante ao realizado por Morais, M. G. e Costa, J. A. V. (2008), apresentando os mesmos problemas.

Damiani, M. C. et al (2010), utilizou o corante vermelho do Nilo apenas para detectar a presença de lipídeos em células da microalga *Haematococcus pluvialis* em um microscópio de fluorescência. A quantificação e identificação dos lipídeos presentes nas microalgas foram realizadas por métodos cromatográficos: após a extração dos lipídeos totais das células liofilizadas, a mistura obtida foi purificada por cromatografia em coluna, confirmada por cromatografia em camada delgada, transformada em ésteres graxos e por fim

analisada por cromatografia a gás. Os autores deste trabalho utilizaram o corante vermelho do Nilo apenas como um identificador qualitativo, ignorando totalmente a capacidade de quantificação deste corante quando associado aos lipídeos neutros presentes nas microalgas.

No estudo com microespectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier elaborado por Dean, A. P. et al (2010) essa técnica foi usada para determinar teor de lipídeos e carboidrato ao longo do tempo nas microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* e *Scenedesmus subspicatus* cultivadas em meios de água doce em lotes com concentrações limitadas de nitrogênio (N). A metodologia com FTIR foi comparada a metodologia que usa o corante Vermelho do Nilo com espectrofluorimetria em um microscópio de epi-fluorescência. Nove bandas de absorção de FTIR foram selecionadas para a análise na microalga *C. reinhardtii*. O teor de lipídeos relativo foi determinado pelo cálculo da razão da banda de lipídeo (numero de onda 1740 cm^{-1}) com a banda de amida. Neste trabalho os resultados não foram conclusivos, de acordo ao que foi buscado nesta dissertação, por terem sido apenas comparados relativamente e não obtendo valores absolutos.

Buscando resolver uma desvantagem das metodologias de análise que utilizam o corante Vermelho do Nilo que é a dificuldade de penetração desta substância nas paredes celulares de algumas microalgas, Chen, W.; Sommerfeld, M. e Hu, Q. (2011), desenvolveram um método de quantificação de lipídeos em microalgas com tingimento das células pelo corante Vermelho do Nilo assistido com micro-ondas. Nesse trabalho foi comparado o tingimento tradicional e o assistido por micro-ondas. A fluorescência da suspensão das células algais foi medida em um espectrofluorímetro. A quantificação gravimétrica foi realizada pela purificação cromatográfica dos lipídeos totais extraídos pelo método de Bligh e Dyer (1959) e os valores obtidos foram correlacionados com a fluorescência das células tingidas.

A finalidade do estudo de Pan, Y-Y. et al (2011) foi avaliar a taxa de crescimento e teor de lipídeos de quatro espécies de microalgas termo-resistentes do gênero *Desmodesmus*. Os lipídeos totais foram extraídos com uma mistura de solventes (clorofórmio e metanol) em um mini moinho de bolas

com esferas de vidro e posteriormente purificados por cromatografia em camada delgada, os triglicerídeos foram então transesterificados e analisados em um cromatografo a gás. A quantificação foi calculada usando o método de padronização interna. Volumes de óleos em células vivas foram marcados com o corante Vermelho do Nilo e a fluorescência fotografada usando um microscópio de fluorescência. Este trabalho foi bastante completo, os autores avaliaram as maiores fraquezas presentes na literatura, confirmando as ideias principais do trabalho realizado por análises de espectrofluorimetria aqui descrito.

Balabin, R. M. e Safieva, R. Z. (2011) analisam diferentes óleos vegetais por espectroscopia de infravermelho próximo para mapear e criar um banco de dados para identificação da matéria-prima do biodiesel. A utilização do NIR é justificada pela velocidade de resposta, preparação da amostra e custo da análise, vantagens sobre as técnicas mais usuais como espectroscopia de RAMAN e RMN. Um estudo qualitativo e não quantitativo.

Em 2012, Istelen-Hosoglu, M.; Gultepe, I. e Elibol, M. publicaram um artigo sobre a produção de lipídeos e biomassa da espécie de microalga *Chlorella saccharophila* em condições heterotróficas. A quantificação dos lipídeos foi realizada pela fluorescência do corante vermelho do Nilo. A análise foi realizada em duas etapas: na primeira, os lipídeos totais foram obtidos de células liofilizadas pelo método de extração de Bligh e Dyer(1959) modificado (clorofórmio, metanol, ácido nonadecanóico e butilato de hidroxitolueno – BHT). Na segunda etapa, amostras de lipídeos neutros foram padronizadas com padrão de trioleína, então as células liofilizadas foram tingidas com o vermelho do Nilo diluído em isopropanol, em uma solução tampão de fosfato 0,1 M. Os valores de lipídeos obtidos por gravimetria foram correlacionados com os da intensidade de fluorescência. No trabalho aqui descrito ocorre novamente o problema dos autores considerarem como lipídeos neutros todo o material que é extraído da biomassa das microalgas com qualquer mistura de solventes.

O objetivo do estudo realizado por Adams, C. et al. (2013) foi investigar as relações das interações do crescimento e do conteúdo de lipídeos, o curso do tempo da acumulação de lipídeos e a magnitude da deficiência de nitrogênio

necessário para estimular a formação de lipídeos em seis espécies de algas verdes oleaginosas, comparando os altos e baixos níveis de deficiência de Nitrogênio, procurando identificar características fisiológicas entre as algas que conduzem a mais alta produtividade de conteúdo lipídico e biomassa. Foi feita uma conversão simultânea de extração de lipídeos de microalgas e transformação para ésteres metílicos de ácidos graxos, pelo método de Wahlen et al. (2011). Este método converteu efetivamente em ésteres os ácidos graxos na forma de fosfolipídios e glicolipídeos contidos na membrana, bem como os ácidos graxos livres e lipídios triglicérides de armazenamento. O teor de lipídeos de 100 mg de amostras liofilizadas de algas foi determinada com um cromatografo de fase gasosa. Neste trabalho a extração e a transesterificação foram condensadas em uma única etapa, o que favorece a análise por cromatografia a gás e como após a reação é feita uma purificação, os valores obtidos da massa de lipídeos é mais coerente.

Na literatura, existem muitos trabalhos sobre análises de lipídeos, contudo algumas dessas técnicas não são acessíveis ou possuem alto custo de instalação e análise. Muitos dos trabalhos descritos utilizam uma definição equivocada de lipídeos, principalmente os que utilizam técnicas espectrométricas associadas à gravimetria. A cromatografia é amplamente utilizada na maior parte das vezes como uma técnica qualitativa e não quantitativa, usada para identificação dos componentes graxos das frações extraídas das cepas das microalgas. Contudo, alguns trabalhos mais recentes, condizem com o que é proposto no presente estudo, utilizando uma definição mais restrita e adequada de lipídeos e explorando melhor algumas técnicas de análise.

4. Materiais e Métodos

A partir desta etapa do trabalho será definido como lipídeos as substâncias orgânicas com baixa polaridade e que podem ser convertidas de alguma forma em biodiesel (triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos livres) e as frações resultantes das extrações serão chamadas de extratos. Deste modo o conceito de “lipídeos” será restrito e os valores encontrados serão adequados para estudos de viabilidade técnica-econômica visando à produção de biocombustíveis.

4.1. Cultivo de Microalgas

A cepa de microalga *Haematococcus pluvialis* foi cedida pelo Laboratório do Professor Sérgio Lourenço no Rio de Janeiro e mantida no banco de algas do Laboratório de Bioenergia e Catalise (LABEC), localizado na Escola Politécnica da Universidade Federal da Bahia. O meio de cultivo utilizado para o crescimento desta espécie foi o Rudic (Rudic V. e Dudnícenco T., 2000; Imamoglu, E.; Sukan, F. V.; Dalay, M. C., 2007) que consiste nos seguintes nutrientes (g.L^{-1}): NaNO_3 , 0,3; K_2HPO_4 , 0,08; KH_2PO_4 , 0,02; MgSO_4 , 0,01; CaCl_2 , 0,0585; EDTA, 0,0075; NaCl 0,02; 1 mL.L^{-1} de solução de metais (H_2BO_3 , 0,3 g.L^{-1} ; $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, 1,5 g.L^{-1} ; $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g.L^{-1} ; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,3 g.L^{-1} ; $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,06 g.L^{-1} ; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g.L^{-1} ; $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,2126 g.L^{-1} ; $\text{FeCl}_3\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 17 g.L^{-1}). O meio de cultivo com os nutrientes foi preparado utilizando água deionizada.

A espécie de microalga *Desmodesmus sp.* foi isolada a partir de uma amostra da água do Dique do Tororó em 2012, e foi mantida no banco de algas do Laboratório de Bioenergia e Catalise (LABEC). O meio de cultivo utilizado para o crescimento dessas espécies foi o Basal de Bold (BBM) (Dong, Q., Zhao, X. M., 2004), modificado do original, que consiste nos seguintes nutrientes (g.L^{-1}): KH_2PO_4 , 0,175; $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,025; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0075; NaNO_3 , 0,25; K_2HPO_4 , 0,075; NaCl , 0,025; H_3BO_3 , 0,00805; EDTA, 0,01; KOH , 0,0062; $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,00498; 1 mL.L^{-1} de H_2SO_4 e 1 mL.L^{-1} de solução de

metais traço (H_3BO_3 , $2,86\text{g.L}^{-1}$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $1,81\text{g.L}^{-1}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,222\text{g.L}^{-1}$; $\text{NaMoO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $0,390\text{g.L}^{-1}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $0,079\text{g.L}^{-1}$; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $0,0494\text{g.L}^{-1}$). O meio BBM foi preparado utilizando água destilada e o pH corrigido para 6,8 antes de ser autoclavado.

A cepa de *Dunaliella salina* foi fornecida pelo Laboratório do Prof. Sergio Lourenço, e foi mantida no banco de algas do Laboratório de Bioenergia e Catalise (LABEC). O meio de cultivo utilizado para o crescimento foi o Conwy (Walne, 1966) que consiste nos seguintes nutrientes (mg.L^{-1}): Na_2EDTA , 45; NaNO_3 , 100; H_3BO_3 , 33.6; Na_2HPO_4 , 20; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.36; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.3, 1mL L^{-1} de solução de metais traço (ZnCl_2 , $2,1\text{ g.L}^{-1}$; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2 g.L^{-1} ; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0,9\text{ g.L}^{-1}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2 g.L^{-1}) e solução de vitamina 1mL.L^{-1} (Tiamina, 100mg.L^{-1} ; Cianocobalamina, 2mg.L^{-1} ; Biotina, 1mg.L^{-1}). O meio de cultivo com os nutrientes de Conwy foi preparado utilizando água marinha.

As cepas das espécies *Dunaliella tertiolecta* e *Nannochloropsis sp.* foram cedidas pela Empresa Bahia Pesca em São Francisco do Conde em dezembro de 2010 e ambas são mantidas no banco de algas do Laboratório de Bioenergia e Catalise (LABEC). O meio de cultivo utilizado para o crescimento foi o Conwy modificado (Walne, 1979) que consiste nos seguintes nutrientes (mg.L^{-1}): Na_2EDTA , 45; NaNO_3 , 100; H_3BO_3 , 33.6; Na_2HPO_4 , 20; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.36; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.3, 1mL L^{-1} de solução de metais traço (ZnCl_2 , $2,1\text{ g.L}^{-1}$; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2 g.L^{-1} ; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0,9\text{ g.L}^{-1}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2 g.L^{-1}) e solução de vitamina 1mL.L^{-1} (Tiamina, 100mg.L^{-1} ; Cianocobalamina, 2mg.L^{-1} ; Biotina, 1mg.L^{-1}). O meio de cultivo com os nutrientes de Conwy foi preparado utilizando água marinha diluída (80% água marinha, 20% água destilada).

4.2. Análise por Espectroscopia de Infravermelho distante com Transformada de Fourier – FTIR

Para a análise por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram preparadas sete soluções padronizadas com diferentes concentrações de óleo de canola (Liza) diluído em heptano (Vetec). O óleo foi pesado em balões volumétricos de vidro de capacidade 10 mL em uma balança

analítica eletrônica digital (Quimis – Q500L210C) e avolumado com o solvente. Os valores de concentração utilizados foram: 0,5 mg.mL⁻¹; 1,0mg.mL⁻¹; 2,5mg.mL⁻¹; 5,0mg.mL⁻¹; 7,5mg.mL⁻¹; 10,0mg.mL⁻¹; e 15,0mg.mL⁻¹.

Três extratos de microalgas foram obtidos a partir de 230 mL de suspensão microalgal de *Nannochloropsis sp.* e *H. pluvialis* que foram centrifugados por 10 minutos a 4000 rotações por minuto (RPM), o líquido sobrenadante foi descartado. A biomassa úmida foi autoclavada, para rompimento da parede celular, por 30 minutos a 120 °C e 1 atm. Em seguida foi seca na estufa com temperatura programada de 105 °C por 24 h. Os extratos foram obtidos utilizando 50 mg de biomassa seca pelo método de Bligh & Dyer (1959) modificado. À biomassa seca foi adicionado 250 µL de clorofórmio, 250 µL de metanol e 250 µL de solução 5% de NaCl, a mistura foi agitada vigorosamente por seis minutos, em seguida centrifugada por 10 minutos a 4000 RPM, ocorrendo à separação de três fases, uma fase superior diluída em metanol e água, uma fase intermediária com a biomassa e uma fase inferior diluída em clorofórmio. A fase em clorofórmio foi considerada lipídica. Cada amostra de biomassa foi extraída três vezes. Um extrato de *H. pluvialis* e um da *Nannochloropsis sp.* foram analisados por espectroscopia de FTIR.

As soluções padronizadas e os extratos diluídos em heptano (Vetec), processo descrito no Anexo I desta dissertação, foram, um a um, depositados no suporte para infravermelho da célula de CaF₂. O suporte foi acoplado no espectrômetro de infravermelho modelo MB Series (104) da ABB Bomen com resolução de 4 cm⁻¹ os espectros de FTIR coletados na faixa de número de onda de 4000 cm⁻¹ a 800 cm⁻¹. Cada solução de concentração foi analisada em duplicata. Os espectros de FTIR foram transferidos para o software Origin® e uma curva de calibração foi criada, os dados dos extratos foram obtidos e comparados aos valores da solução.

4.3. Análise Multivariada Preliminar para Técnica Espectrofluorimétrica

Todas as análises foram realizadas em um equipamento de espectrofluorimetria desenvolvido no Laboratório de Propriedades Ópticas

(LaPO) do Instituto de Física da Universidade Federal da Bahia, utilizando como lâmpada de excitação um LED de comprimento de onda $\lambda = 532\text{nm}$ com intensidade alta e cubeta de vidro (% transmissão: 84,3). A cubeta foi previamente limpa com acetona e solução alcoólica de hidróxido de potássio 3%, para total remoção de gorduras, e depois lavada com água deionizada para remoção da solução.

As amostras de lipídeos comerciais foram pesadas em balança analítica (Quimis – Q500L210C) com auxílio de micropipeta (Eppendorf), posteriormente foram avolumadas com acetona (Vetec) e foi adicionado o corante para análise, Vermelho do Nilo (Sigma Aldrich). Todos os solventes e reagentes utilizados foram de padrão analítico.

O processo de análise multivariada foi realizado em duas etapas: o planejamento de experimentos com dois níveis no qual foi observado a interferência de cada variável e a matriz de Doehlert com dois fatores. Para o planejamento fatorial definiu-se como fatores o tempo de reação do corante na amostra e a concentração do corante utilizado, com os seguintes níveis, respectivamente, 1h e 3h, e $0,72 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $2,16 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A combinação dos experimentos realizados, na etapa de planejamento fatorial, e a interpretação dos resultados foram obtidos com o auxílio do software MINITAB. A etapa da construção da matriz de Doehlert foi realizada com o software Statistica, e neste caso, os fatores tempo de reação e concentração foram mantidos, porém os níveis mudaram para 1,5 h, 2,0 h, 2,5 h, 3,0 h, 3,5 h e $0,72 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $1,44 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $2,16 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Após esta série de experimentos, foi verificado que o tempo de reação poderia ser reduzido ao adicionar a etapa de aquecimento por micro-ondas durante a reação do corante com os lipídeos. O valor de concentração do vermelho do Nilo considerado pela análise multivariada preliminar foi mantido na análise final.

4.4. Análise por Espectroscopia de Fluorescência

Para a criação da curva de calibração foi necessário duas etapas, a primeira constituiu na análise da radiação de fluorescência das microalgas e a segunda na purificação cromatográfica de extratos para obtenção de dados gravimétricos dos lipídeos neutros. Os resultados obtidos em cada etapa foram comparados como descrito em seguida.

A espécie de microalga utilizada nesta análise foi a *Nannochloropsis sp.* Em cada grupo de dez amostras de diferentes concentrações de microalgas em meio cultura foram tomadas alíquotas de 5mL da suspensão microalgal e adicionado 0,75 mL de DMSO (Sigma Aldrich) e depois 50 μ L de uma solução de concentração de 250 mg.mL⁻¹ de vermelho do Nilo em acetona (Fmaia). A mistura foi agitada vigorosamente em um agitador tipo vortex (IKA vortex Genius 3) por um minuto e aquecida em forno de micro-ondas na potência 70% por dois minutos. As amostras foram analisadas imediatamente por espectrofluorimetria.

As análises foram realizadas no equipamento Fluorímetro versão Quimis - protótipo 1 (versão comercial - Espectrofluorímetro UV-Vis - Q798FIL), desenvolvido no Laboratório de Propriedades Ópticas (LaPO) do Instituto de Física da Universidade Federal da Bahia, aplicando como luz de excitação LED (diodo de emissão de luz, do inglês: light-emitting diode) de cor verde ($\lambda = 519$ nm). A radiação de fluorescência das células tingidas foi obtida utilizando como tempo de integração 150 milissegundos e medida no comprimento de onda de $\lambda = 670$ nm.

O valor da área da radiação de fluorescência foi medido através da integração da curva fornecida pelo equipamento Fluorímetro versão Quimis - protótipo 1, no software ORIGIN®. Como a radiação de fluorescência das células tingidas ($\lambda = 670$ nm) fica em um comprimento de onda próximo ao da radiação de fluorescência da clorofila ($\lambda = 680$ nm), foi necessário realizar um abatimento do sinal da radiação de fluorescência da clorofila para que o valor considerado fosse apenas o valor do sinal da radiação de fluorescência respectivo aos lipídeos associados ao corante vermelho do Nilo.

O sinal da radiação de fluorescência da clorofila foi obtido pela medição da fluorescência deste pigmento isolado na própria amostra sem a adição do corante Vermelho do Nilo. Após o abatimento do sinal da clorofila as curvas foram normalizadas e então se utilizou a ferramenta matemática de integração para calcular a área dos sinais da radiação de fluorescência atribuídos aos lipídeos neutros. O mesmo tratamento de dados foi realizado em todos os pontos da curva de calibração e nas amostras de *Nannochloropsis sp.* estudadas.

Em cada grupo de dez amostras de diferentes concentrações de microalgas em meio cultura foram centrifugadas a 4400 rotações por minuto durante oito minutos e o sobrenadante foi descartado. A cada amostra adicionou-se 250 μ L de hexano (Fmaia) e agitou-se vigorosamente em um agitador tipo vortex (IKA vortex Genius 3) por trinta minutos, coletou-se o líquido e transferiu-se para um frasco do tipo eppendorf previamente pesado. Este processo foi repetido dez vezes para cada amostra. O extrato obtido foi seco a temperatura ambiente e sem fluxo de gás, por 60 horas. A massa do resíduo foi considerada como a massa do extrato. (Vijayaraghavan, K. e Hemanathan, K. 2009).

Os lipídeos foram separados por cromatografia em camada delgada preparativa utilizando como fase estacionária silicagel 60 PF₂₅₄₊₃₆₆ (Merck) suportada em placas de vidro de dimensões de 20x20 cm, espessura de 1cm de sílica. As placas foram preparadas utilizando 30 g de silicagel com 15 mL de água ultra pura, agitando-se com bastão de vidro até atingir uma consistência homogênea do gel. O gel foi depositado sobre as placas de vidro com um espalhador de fase estacionária em placas para cromatografia em camada delgada, disponibilizado pelo Grupo de Estudo de Substâncias Naturais (GESNAT) do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia. As placas foram ativadas em estufa a temperatura de 70 °C por um mínimo de 24 horas.

As amostras foram diluídas com hexano e aplicadas longitudinalmente na base das placas cuidadosamente, para não cortar a sílica, com um capilar de vidro com ângulo de aproximadamente 120°. O sistema foi eluído em uma

cuba de vidro, pré-saturada com auxílio de papel de filtro, com a mistura de solventes hexano/acetona/ácido acético 90:10:1 como fase móvel.

Após a separação dos lipídeos, a sílica foi cortada e separada do suporte de vidro com uma espátula. Os lipídeos foram recuperados da sílica através de uma série de extrações ultrassônicas. Inicialmente as amostras foram sonicadas por 10 minutos com hexano em banho ultrassônico (Quimis – Q335D – 40 KHz) em máxima potência, coletou-se o líquido e transferiu-se para frascos previamente pesados, depois se repetiu este procedimento alterando o solvente para acetona e em seguida metanol em cada amostra. As amostras obtidas foram secas a temperatura ambiente e sem fluxo de gás, por 60 horas. A massa do resíduo seco foi considerada como a massa de lipídeos.

Como as amostras utilizadas para obtenção da radiação de fluorescência de células tingidas foram iguais às amostras utilizadas para a determinação gravimétrica de lipídeos, para cada valor da área da radiação de fluorescência foi atribuído um valor de massa de lipídeos, gerando esta forma uma correlação matemática entre os valores obtidos.

4.5. Análise por Cromatografia em Camada Delgada

Para esta análise utilizou-se os extratos de quatro espécies de microalgas *Desmodesmus sp.*, *Dunaliella salina*, *Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloropsis sp.* À biomassa úmida foi adicionado 5mL de hexano (Vetec), e a mistura foi agitada por 30 minutos no votex, em seguida centrifugada por 8 minutos a 4400 RPM. Ocorreu formação de fases, e a fase superior dissolvida em hexano foi coletada e transferida para frascos de amostra previamente limpos e pesados. Cada cepa foi extraída três vezes com hexano.

Como não existe um padrão de óleo de microalga disponível no mercado e as amostras puras que foram obtidas experimentalmente não foram em quantidade suficiente para usar como padrão, foram realizados testes com diferentes tipos de óleos (triglicerídeos) comerciais pra avaliar qual se aproxima

mais das características do óleo de microalgas e ser utilizado como padrão de comparação para a cromatografia em camada delgada. Foram testados os óleos de canola, coco, girassol, milho, oliva, peixe ($\Omega 3$), rícino e soja, tendo sido selecionado óleo de peixe ($\Omega 3$) por ter se aproximado mais das características dos triglicerídeos das microalgas em composição e R_f .

Foram preparadas vinte e três soluções padronizadas com diferentes teores de óleo de peixe – ômega três (Vittan O) diluído em heptano (Vetec). O óleo foi transferido com micropipetas para eppendorfs de plástico com capacidade 1,5 mL e o volume completado com o solvente. Os valores de concentração utilizados foram: 0,3%, 1%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% e 100%.

As análises foram realizadas por cromatografia em camada delgada preparativa utilizando como fase estacionária silicagel 60 PF₂₅₄₊₃₆₆(Merck) suportada em placas de vidro de dimensões de 10x5 cm, espessura de 0,5 cm de sílica. As placas foram preparadas utilizando 60 g de silicagel com 15 mL de água ultra pura, agitando com bastão de vidro até atingir uma consistência homogênea do gel. O gel foi depositado sobre as placas de vidro com um espalhador de fase estacionária em placas para cromatografia em camada delgada, disponibilizado pelo Grupo de Estudo de Substâncias Naturais (GESNAT) do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia. As placas foram ativadas em estufa a temperatura de 70 °C por um mínimo de 24 horas.

Um teste prévio dos reveladores foi realizado para escolha do mais adequado para essas amostras, com vanilina ácida, permanganato de potássio, PMA e iodo. O escolhido foi o iodo.

Primeiro foi realizada a análise com as soluções padronizadas e depois dos extratos de microalgas, 1 μ L das soluções foram aplicadas nas cromatoplasmas pré-ativadas com uma micropipeta capilar graduada (MERK). As placas foram eluidas com um sistema de solventes hexano:acetona 85:15 mais 5 gotas de ácido acético para cada vinte mililitros de solução solvente. Após a

eluição, as placas foram secas na capela a temperatura ambiente e em seguida reveladas com iodo. O tempo de revelação necessário também foi estudado. Após revelação as cromatoplasmas foram escaneadas e as imagens trabalhadas no software Sigmascan® Pro 5 versão teste, para obtenção dos dados de resolução em pixels. Foram preparadas cinco curvas de calibração diferentes, e da média destas curvas foi criado um modelo matemático para calcular a concentração do extrato das microalgas. O tratamento estatístico foi feito com o software Origin®.

4.6. Análise por Cromatografia Gasosa

Nesta análise as mesmas amostras utilizadas na cromatografia em camada delgada foram analisadas por cromatografia gasosa.

Os extratos foram secos a temperatura ambiente sob fluxo de gás nitrogênio e foram analisados por cromatografia gasosa em um cromatografo a gás da marca Bruker equipado com um detector por ionização de chama (FID) a uma temperatura de 250 °C, um injetor split/splitless 20:100 a uma temperatura de 250°C e coluna capilar BR-SWax (Carbowax® polyethylene glycol) 30m, 0,32mm da marca Bruker. O gás de arraste utilizado foi hélio com um fluxo de 68 cm.s⁻¹. O forno do CG foi mantido inicialmente a temperatura de 60 °C por 2 minutos, em seguida iniciou uma rampa de aquecimento com uma taxa de 10 °C/min até 200 °C, depois uma nova rampa com taxa de 5°C/min até 240°C e manteve esta temperatura por 15 min. O limite de detecção para este método cromatográfico foi programado para 1 ppb. O programa Compass CDS foi utilizado para as análises cromatográficas.

Apesar do cromatografo a gás utilizado ter muitos recursos para análise de resultados, o tratamento de dados foi realizado com o auxílio do software Oring® devido à natureza da amostra, que é detectada pelo equipamento como um sinal não clássico da cromatografia a gás, então a área deste sinal não pôde ser calculada pelo programa do próprio cromatografo.

O tratamento dos dados foi feito pela aquisição dos dados no cromatografo a gás e exportação dos dados básicos no formato compatível

como sistema de importação de dados do Origin®, neste programa foi utilizada a ferramenta matemática de cálculo de integração nos picos da região de 7,6 minutos (presente em todos os cromatogramas de todas as microalgas estudadas) e de 21 minutos (triglicerídeos). A razão entre o valor da integral do primeiro pico calcula pelo programa do cromatógrafo e o valor calculado no Origin® foi utilizada como fator de correção do valor calculado no Origin® para o sinal na região de 21 minutos, como descrito na equação abaixo.

$$Int. do triglic. cor. = \frac{Int. pico calc. pelo CG \times Int. do triglic. calc. no origin}{Int. do pico calc. no origin}$$

Após encontrar o valor corrigido para a integral do sinal na região de 21 minutos, este valor foi dividido pela soma da integral de todos os picos presentes no cromatograma que foi multiplicado por 100 para encontrar o valor percentual de lipídeos na amostra de extrato hexânico.

5. Resultados e Discussão

5.1. Análise por Espectroscopia de Infravermelho distante com Transformada de Fourier

Para obter uma curva de calibração sete soluções de concentração conhecida foram analisadas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier. Os sinais relativos ao solvente e a célula de CaF_2 foram abatidos do sinal das soluções. A banda de absorção utilizada para o cálculo de concentração lipídica foi a correspondente a carbonila $\text{C}=\text{O}$ (1750 cm^{-1}), este pico foi selecionado por ser uma ligação característica de ésteres graxos, ácidos graxos e triglicerídeos (substâncias utilizadas na produção do biodiesel), e não apresentarem interferências com os espectros do solvente nem da célula. Na Figura 14 um espectro de infravermelho de uma das soluções padronizadas de óleo de canola comercial é exibido.

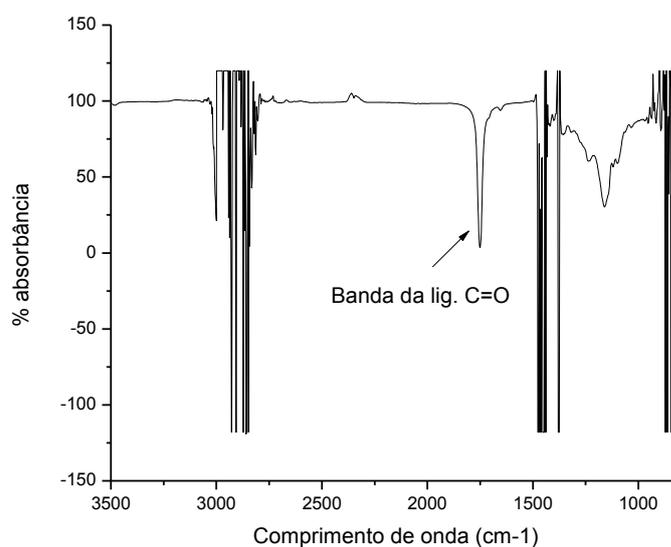


Figura 14. Espectro de infravermelho de uma solução padronizada de óleo de canola. Fonte: Próprio autor.

A figura 14 está distorcida para melhor visualização da banda em 1750 cm^{-1} e portanto exhibe os picos de absorção muito próximos devido às longas cadeias de carbono existentes nos ácidos graxos presentes nas amostras analisadas, principalmente nas regiões de número de onda 2750 cm^{-1} a 3000 cm^{-1} , 1250 cm^{-1} a 1600 cm^{-1} e 800 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} , estas regiões são características de ligações C-H e C=C, ricamente presente nas amostras. Na região de 2750 cm^{-1} a 3000 cm^{-1} estão às ligações de C-H de alcenos e alifáticos, com deformação de estiramento, e as bandas nas regiões de 1250 cm^{-1} a 1600 cm^{-1} e 800 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} são relativas às ligações duplas entre carbonos, a primeira faixa corresponde às deformações de estiramento e a segunda de deformação angular. As muitas vibrações causadas pela radiação infravermelha em ligações semelhantes, presentes na amostra, causam o grande número de picos nas regiões supracitadas e uma perda na resolução do espectro nessas áreas (Lopes, W. A. e Fascio, M., 2004). Contudo o pico referente à ligação C=O é bem definido e único.

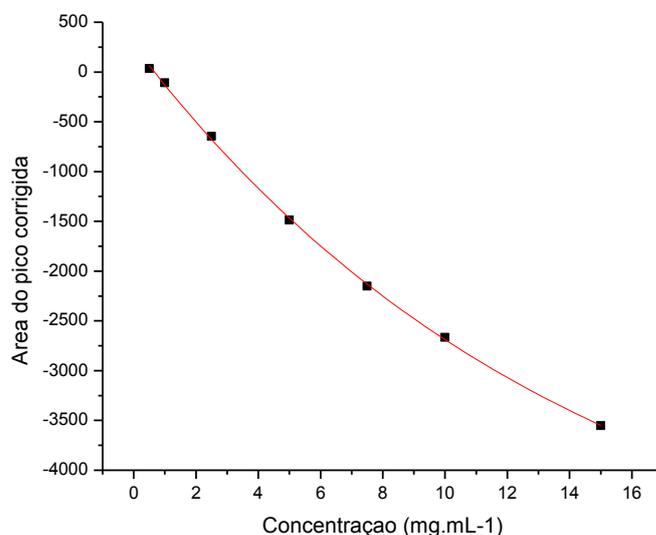


Figura 15. Curva de calibração para análise em FTIR. Fonte: Próprio autor.

Com a área obtida pela integração do pico presente no número de onda de 1750 cm^{-1} , que foi corrigida em todos os pontos pelo mesmo fator para obtenção de uma regressão com decaimento exponencial, criou-se a curva de calibração: $y = -5603,67562 + 5869,06784^{-x}/14,29133$, com $R^2 = 0,99967$ e erro

de 3,78%. Na Figura 15 pode ser visualizado o gráfico que originou a equação acima. Este modelo matemático foi aplicado no cálculo da concentração de lipídeos nas microalgas *Haematococcus pluvialis* e *Nannochloropsis sp.*

Os extratos das microalgas não são soluções de um único soluto como as soluções padronizadas, neles contém além dos lipídeos de interesse para a produção de biodiesel, proteínas, corantes, vitaminas e outras substâncias que absorvem a radiação infravermelha. Algumas dessas substâncias presentes no extrato, por possuírem ligações C=O em sua estrutura molecular, também absorvem na região de número de onda 1750 cm^{-1} e podem fornecer um falso resultado de quantidade de lipídeos.

Um exemplo bastante evidente e facilmente comprovado foi à clorofila. A presença da clorofila nos extratos das microalgas foi evidenciada pela coloração verde característica deste pigmento. Na Figura 16 a estrutura molecular da clorofila é exposta e observa-se a presença de mais de uma ligação C=O, isto implica que, mesmo que a clorofila não tenha grandes concentrações presentes na amostra analisada, o sinal de absorção da radiação infravermelha produzido por esta ligação no espectrograma foi manifestado.

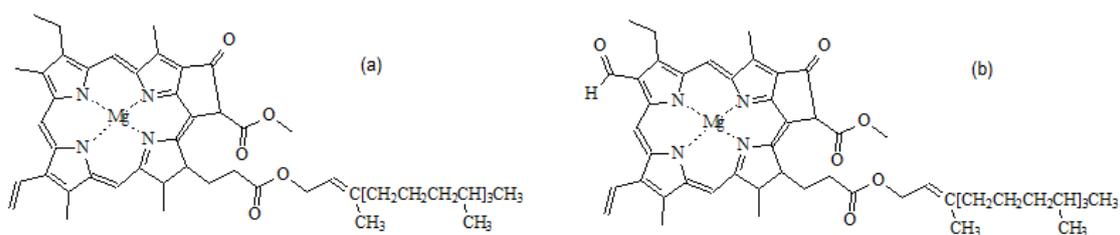


Figura 16. (a) Estrutura molecular da clorofila a, (b) Estrutura molecular da clorofila b. Fonte: Próprio autor.

Na tabela 3 estão descritos os resultados obtidos para as amostras de extratos de microalga analisados. A confirmação da presença de lipídeos nos extratos foi feita por cromatografia em camada delgada e indicou que havia óleo na amostra da *Nannochloropsis sp.*, contudo não foi detectada a presença

de nenhum lipídeo útil para produção de biodiesel na amostra obtida da *H. pluvialis*.

Tabela 3. Valores das amostras dos extratos de microalgas analisadas por espectroscopia de infravermelho longe com transformada de Fourier.

Microalga	Área do pico em 1750 cm^{-1} Corrigida (u.a.)	Concentração de lipídeos (mg.mL^{-1})	Percentual de lipídeos obtido da biomassa (%)	Presença de lipídeo confirmada por CCD
<i>H. pluvialis</i>	3683	0,70	7,0	Não
<i>Nannochloropsis sp.</i>	3959	0,02	0,3	Sim

A cromatografia por camada delgada foi utilizada para identificar a presença de lipídeos pois separa os componentes da mistura de substâncias que é o extrato. Então ao analisar os extratos das microalgas *H. pluvialis* e *Nannochloropsis sp.* por essa técnica os pigmentos, proteínas, açúcares, e outras substâncias que podem ser detectadas pela espectroscopia de infravermelho distante como lipídeos foram separadas dos reais lipídeos de interesse e assim foi verificada a presença de triglicerídeos na amostra de *Nannochloropsis sp.*, porém na amostra de *Haematococcus pluvialis* esta substância não foi detectada indicando que a extração não foi eficiente na obtenção dos triglicerídeos e ao visualizar as células de microalga utilizadas para fazer a extração em um microscópio, verificou-se que a parede celular da *H. pluvialis* não havia sido rompida dificultando a extração dos lipídeos, outro fator responsável pela não obtenção dos triglicerídeos é a afinidade com o solvente, uma vez que os extratos foram obtidos pelo método de Bligh e Dyer (1959) que utiliza a mistura de solventes clorofórmio e metanol que possuem maior afinidade com pigmentos como a clorofila e astaxantina que saturam os solventes que possuem menor solubilização dos triglicerídeos. Confirmando o resultado qualitativo dado pela cromatografia em camada delgada. Assim o resultado obtido pelo FTIR foi atribuído a outros compostos como pigmentos e açúcares.

5.2. Análise Multivariada Preliminar para Técnica Espectrofluorimétrica

No MINITAB foram dadas informações do número de variáveis independentes, e obteve-se a programação dos experimentos em duplicata a serem realizados, total de 8 experimentos. Após a realização destes, o valor da intensidade de fluorescência indicado na curva fornecida pelo espectrofluorímetro foi determinado através da integração da banda no *software* ORIGIN, resultado que é mostrado na Tabela 4 abaixo.

Tabela 4. Planejamento fatorial do experimento.

Experimento	Ordem	Nível Tempo de Reação	Nível Concentração do Corante	Área da banda de fluorescência(u.a.)
1	2	-1 (1 h)	-1 (0,72 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	10431
2	5	1 (3 h)	-1 (0,72 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	22576
3	1	-1 (1 h)	1 (2,16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	8278
4	6	1 (3 h)	1 (2,16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	48154
5	8	-1 (1 h)	-1 (0,72 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	11309
6	4	1 (3 h)	-1 (0,72 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	22752
7	3	-1 (1 h)	1 (2,16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	7501
8	7	1 (3 h)	1 (2,16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	48424

Com os dados de resposta, apresentados na Tabela 4, foram obtidos os gráficos que representam a interação existente entre as variáveis independentes (tempo do corante na amostra e concentração do corante na amostra) e a variável dependente (resposta - área da banda de fluorescência). Observou-se no planejamento de experimentos que ambas as variáveis possuem efeitos positivos, ou seja, com o aumento do nível ocorre o aumento da variável resposta (área da banda de fluorescência). Outro ponto observado é que a variável tempo possui uma maior influência na resposta que a variável concentração.

A partir destes dados e por análise gráfica foi confirmada a influência do tempo na variável resposta (área da banda de fluorescência) e mostra que esse efeito é mais intenso para o maior tempo de reação. No menor tempo de contato do corante com a amostra, a reação pode não ter ocorrido a contento o que justifica a pouca influência da variação da quantidade de corante adicionada neste tempo. Os valores de efeito encontrados para as variáveis concentração de corante e tempo de reação foram respectivamente 11322 u.a. e 26097 u.a.

Com os dados do efeito determinou-se que o tempo é o fator de maior influência do processo, e como foi observado que o tempo de 1h não era suficiente para um valor significativo, então para matriz de Doehlert aumentou a quantidade de níveis para esta variável, porém iniciando o estudo em 1,5 hora de reação. Para o tempo utilizou-se um total de cinco níveis (1,5 h, 2 h, 2,5 h, 3 h e 3,5 h) e para a variável concentração, um total de três ($0,72 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $1,44 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $2,16 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A Figura 13 mostra o planejamento da matriz de Doehlert com a combinação dos níveis que foram analisados.

Na ferramenta estatística utilizada para o tratamento de dados, Statistica, foi inserido os níveis dos fatores tempo e concentração para Matriz de Doehlert com suas respectivas respostas e foi gerada a superfície de resposta exibida na Figura 17.

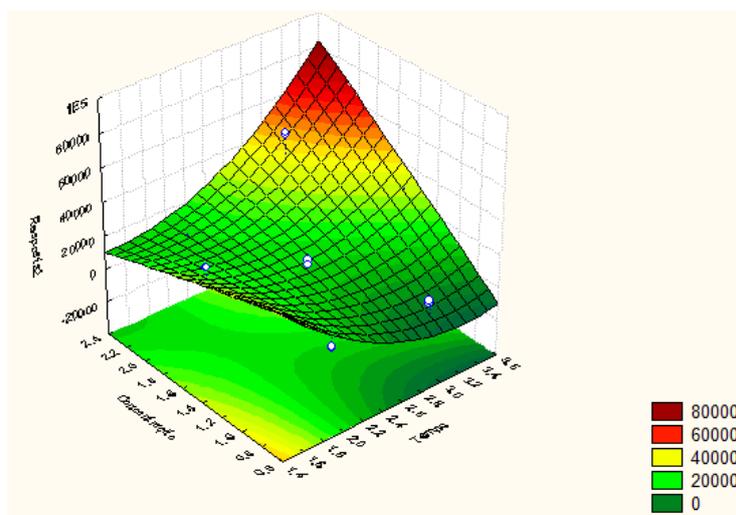


Figura 17. Superfície de resposta para Matriz de Doehlert para os fatores Tempo e Concentração. Fonte: Próprio autor.

O gráfico exibido na Figura 17 mostra uma tendência que o aumento do tempo de reação e da concentração de Vermelho do Nilo pode levar a uma resposta maior. Pela análise dos pontos críticos, o menor tempo de reação necessário para uma resposta significativa é de 2 horas e a solução deve conter pelo menos 1,44 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de corante.

O gráfico de Pareto (Figura 18) obtido nessas experiências indicou que para a faixa escolhida de parâmetros, a interação entre a concentração do corante e o tempo de reação é o efeito mais relevante e tem uma contribuição linear. Também significativo, porém inferior na hierarquia dos principais efeitos são a contribuição linear da concentração de Vermelho do Nilo e a contribuição quadrática do tempo de reação. A influência significativa linear do tempo também foi detectada. A interação quadrática da concentração foi estatisticamente insignificante.

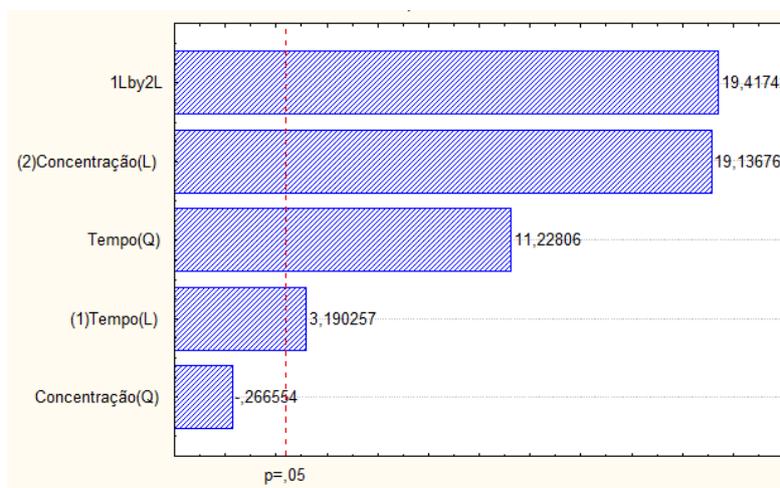


Figura 18. Gráfico de Pareto da estimativa dos efeitos. Fonte: Próprio autor.

5.3. Análise por Espectroscopia de Fluorescência

Devido à luz de excitação, que o equipamento Fluorímetro versão Quimis - protótipo 1 usa, ser produzida por um LED, dispositivo qual não é possível variar o comprimento de onda para um valor desejado específico,

houve um deslocamento nas faixas de luz de excitação e de emissão de fluorescência, na literatura os valores encontrados para as luzes de excitação e de emissão são respectivamente $\lambda = 552$ e 636 nm, mas os utilizados nesta análise foram $\lambda = 519$ e 670 nm como podem ser vistos na Figura 19.

Para obter o valor da intensidade da radiação de fluorescência foi calculada apenas a área do pico respectivo à radiação de fluorescência das células tingidas. Contudo, as microalgas por serem organismos fotossintetizantes possuem um pigmento (clorofila) que fluoresce em uma região próxima à região da radiação de fluorescência das células tingidas (Figura 20), portanto foi realizado um abatimento matemático da área do pico, correspondente a clorofila, da integral da radiação de fluorescência das células tingidas, como visto na Tabela 5. Pela variação do comprimento de onda utilizado na excitação das amostras houve também uma variação na região de fluorescência da clorofila que ao invés de fluorescer em comprimentos de onda específicos para a clorofila A e B, ambas fluoresceram em uma única banda como exibido na figura 20.

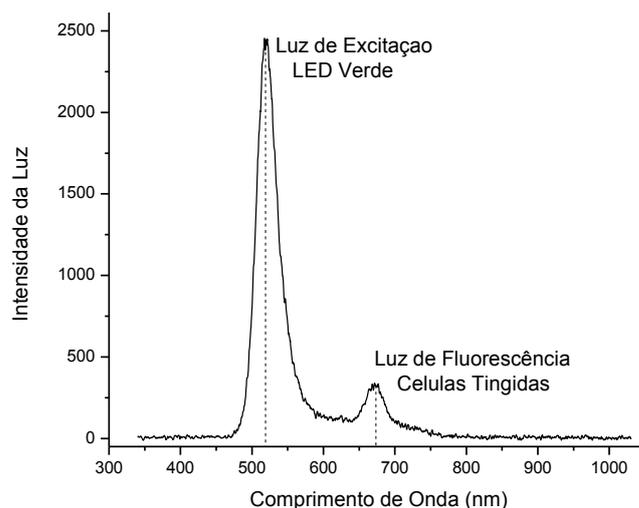


Figura 19. Fluorescência de *Nannochloropsis sp.* tingida com o corante Vermelho do Nilo - Espectro de Fluorescência produzido pelo equipamento Fluorímetro versão Quimis - protótipo 1. Fonte: Próprio autor

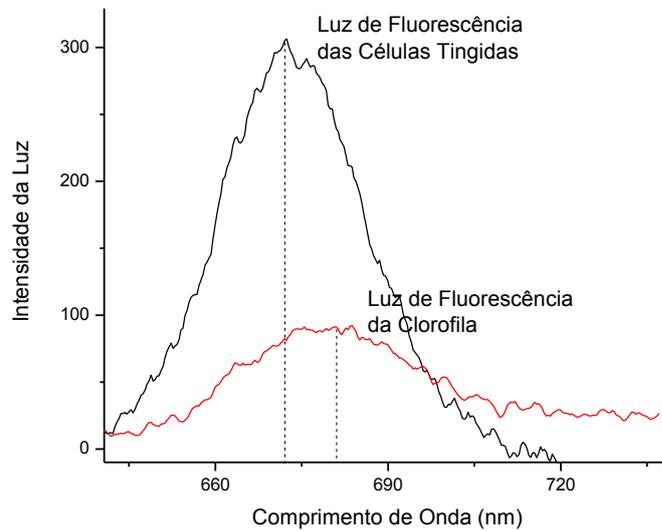


Figura 20. Fluorescência de *Nannochloopsis sp.* tingida com o corante Vermelho do Nilo – Diferença entre os espectros da radiação de fluorescência das células microalgais tingidas e da clorofila. Fonte: Próprio autor

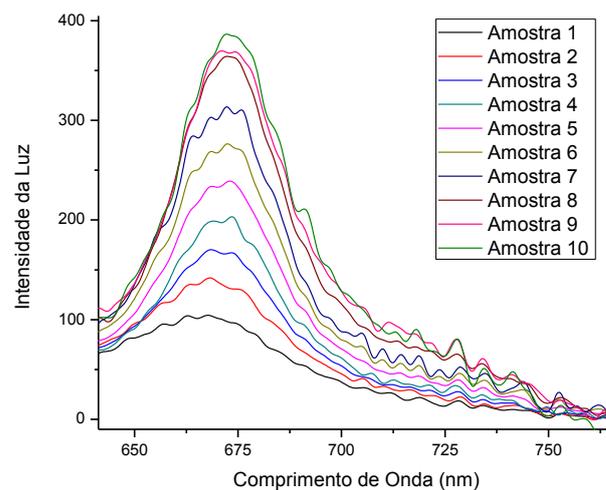


Figura 21. Fluorescência de *Nannochloopsis sp.* tingida com o corante Vermelho do Nilo - Espectros de Fluorescência de todas as amostras analisadas com abatimento do sinal da clorofila. Fonte: Próprio autor

Tabela 5. Correlação entre os valores de área dos espectros de fluorescência das células microalgais de *Nannochloropsis sp.* tingidas e as médias das massas de lipídeos obtidas.

Amostra	Área da Banda da Radiação de Fluorescência (u.a.)	Área da Banda da Radiação de fluorescência abatida e normalizada (u.a.)	Massa de extrato (mg)	Massa de lipídeos (mg)
1	29078,11	43,03	2,60	0,50
2	33489,64	54,80	3,05	0,60
3	38656,73	62,68	2,95	0,65
4	43823,82	70,56	3,85	0,70
5	47105,91	83,89	3,65	0,80
6	50388,01	97,23	4,25	0,85
7	53670,10	109,77	4,95	0,90
8	78408,50	126,23	3,30	0,80
9	94093,97	133,85	5,20	1,05
10	98709,83	134,77	5,95	1,15

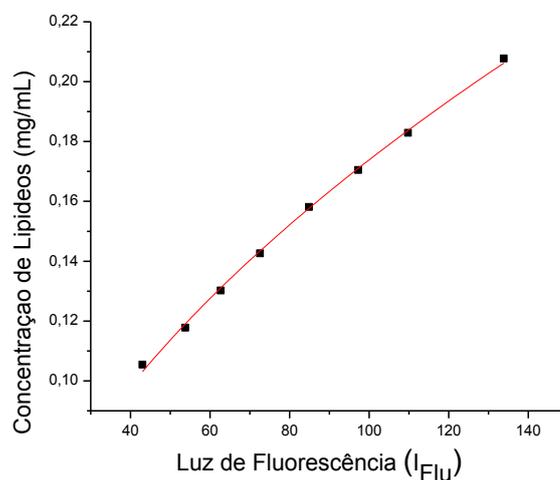


Figura 22. Curva de correlação entre a radiação de fluorescência e a concentração de lipídeos no meio de cultura de *Nannochloropsis sp.* Fonte: Próprio autor

Ao observar a tabela 5, é possível notar uma relação crescente entre a radiação de fluorescência e a massa de lipídeos neutros extraídos. Da regressão numérica dos dados obtidos experimentalmente foi obtida a seguinte relação matemática: $Y \text{ [mg.mL}^{-1}] = 0.0206 \text{ [(mg.mL}^{-1})/I_{\text{fluo}}] (X \text{ [}I_{\text{fluo}}])^{1/2} - 0.031 \text{ [mg.mL}^{-1}]$, com índice de correlação $R^2 = 0,99862$.

Para testar este modelo, duas amostras foram tratadas seguindo o mesmo procedimento experimental utilizado na construção da curva de correlação, microalgas da espécie *Nannochloropsis sp.* com 4 e 6 dias de cultivo, e as quantidades de lipídeos encontradas por mililitros de meio de cultivo foram de $0,15 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,17 \text{ mg.mL}^{-1}$ respectivamente, o que significa 4,4 % e 4,8 % de lipídeos em biomassa seca.

5.4. Análise por Cromatografia em Camada Delgada

Antes de iniciar as análises quantitativas por cromatografia em camada delgada foi realizado um estudo para escolher o revelador mais adequado para o objetivo do trabalho e compatível com as amostras. O primeiro revelador testado foi a radiação ultravioleta, mas este revelador foi eliminado pela dificuldade de repetibilidade na etapa de aquisição de imagens. Depois se testou a vanilina ácida que, após a borrifação da solução na cromatoplaça, necessita de aquecimento. Apesar da vanilina ter demonstrado boa revelação das manchas o controle da temperatura na etapa de aquecimento era difícil o que impossibilitou a repetibilidade do método utilizando este revelador. Também foi testado o ácido fosfomolibídico que apresentou bons resultados para as pequenas concentrações, mas nas maiores concentrações a resolução deste revelador não foi adequada. E por fim aplicou-se o iodo como revelador.

O iodo é um bom revelador para compostos insaturados, porém requer tempo para que a reação ocorra. Então foi realizado um estudo do tempo necessário para que o iodo gasoso reaja com as amostras eluídas na cromatoplaça. As placas foram escaneadas para o cálculo da resolução em pixels (área e intensidade da cor da mancha) de cada amostra utilizada na análise. Na Figura 23 é possível visualizar a evolução da reação durante o tempo. O processo de revelação foi acompanhado por 480 horas, e a aquisição

de imagem realizada com 3,5 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 192 horas, 312 horas e 480 horas. Este acompanhamento foi realizado com óleo de peixe ($\Omega 3$) comercial que foi utilizado como padrão.

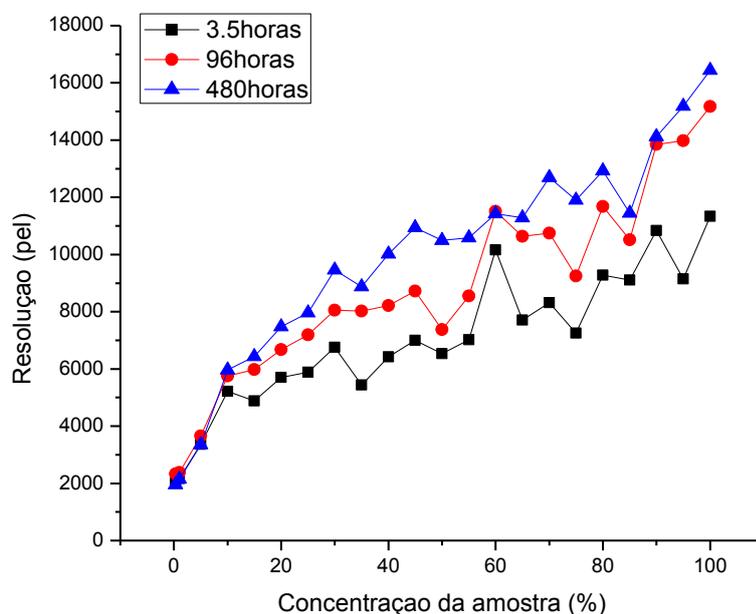


Figura 23. Influência do tempo de revelação com iodo na análise de lipídeos comerciais (óleo de peixe – $\Omega 3$) por CCD. Fonte: Próprio autor

Do gráfico de percentual de lipídeos em solvente é possível observar que para baixas concentrações, o tempo de revelação não influencia a análise; para valores acima de 15%, observa-se uma maior resolução do método para tempos elevados de revelação com iodo.

A perfeita correlação entre os dados (resolução e concentração) neste método é difícil, pois foram utilizadas cromatoplasas nas quais a deposição da fase móvel foi feita no laboratório e apesar do cuidado dispensado, ainda existem diferenças entre as placas, que podem ser causadas por pequenas trepidações no momento do espalhamento ou por diferença de nível, o que provoca inclinação da placa, durante a secagem. Este efeito negativo pode ser visualizado pelo agrupamento das amostras, as de menor concentração foram eluídas em grupos de 4, as intermediárias em grupos de 3 e as de maior

concentração em grupos de 2 amostras. Para evitar este tipo de falhas é recomendado o uso de cromatoplaças comerciais.

Para construir a curva de calibração foi escolhido utilizar a média das cinco curvas de calibração feitas com a micropipeta capilar de 1 μL para diminuir o efeito da diferença entre as cromatoplaças no resultado final.

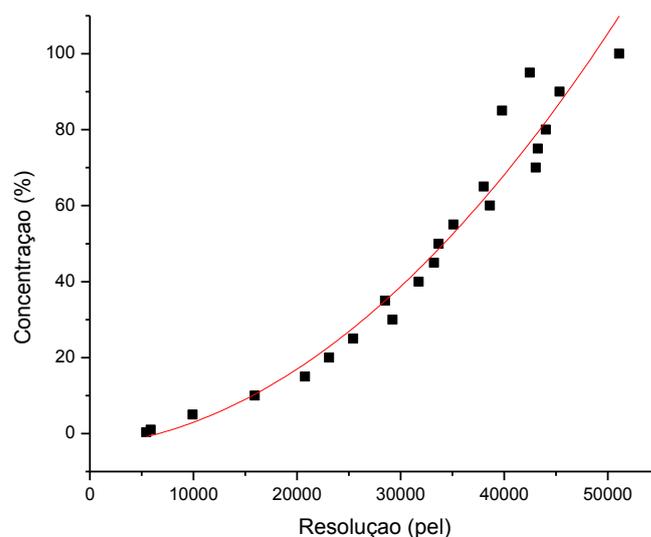


Figura 24. Curva de calibração para análise de teor de lipídeos por CCD. Fonte: Próprio autor

A Figura 24 mostra a curva de calibração. O modelo matemático gerado foi expresso pela equação: $Y[\%] = 3,86049 \times 10^{-8} (X^2[\text{pel}]) + 2,41975 \times 10^{-4} (X[\text{pel}]) - 3,29973[\%]$, $R^2 = 0,94965$.

Aplicando o modelo obtido acima, foram analisados extratos de quatro espécies diferentes de microalgas. O resultado está descrito na Tabela 6.

Tabela 6. Teor de lipídeos por CCD.

Espécie de Microalga	Massa de Extrato (mg)	Teor de Lipídeo no extrato (%)	Teor de Lipídeo na Biomassa seca (%)
<i>Desmodesmus sp.</i>	10,9	4,4	0,5
<i>D. salina</i>	13,7	9,2	1,0
<i>D. tertiolecta</i>	44,3	15,3	6,8
<i>Nannochloropsis sp.</i>	20,5	5,0	1,0

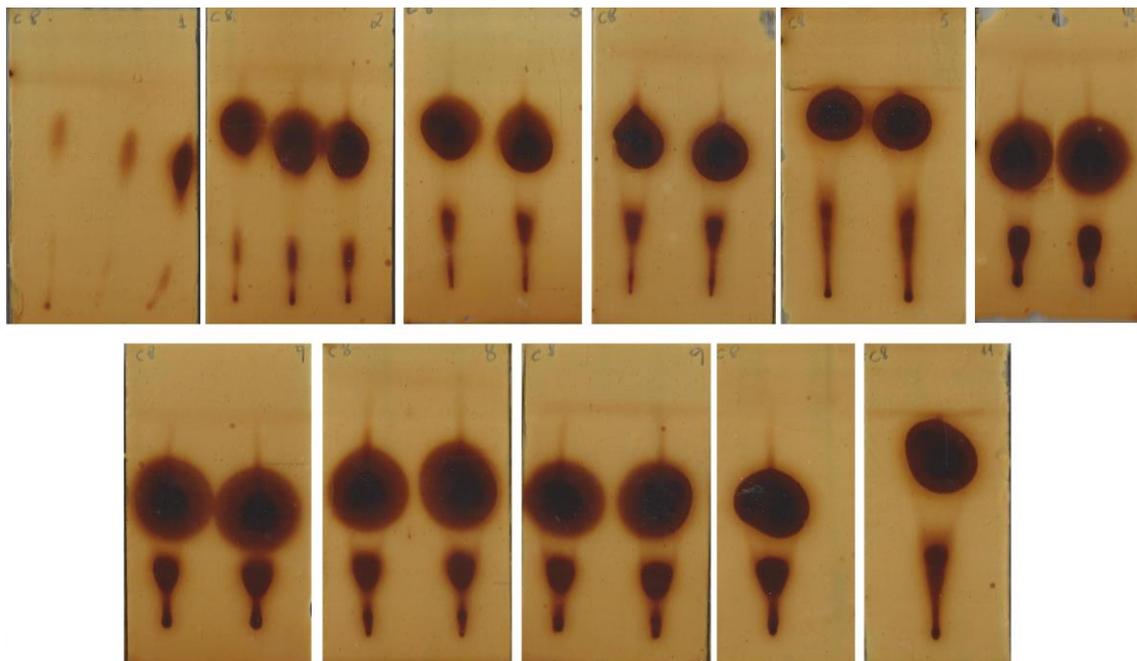


Figura 25. Cromatoplasmas reveladas com iodo com gradiente crescente de teor de óleo. Fonte: Próprio autor

5.5. Análise por Cromatografia Gasosa

As amostras analisadas no cromatografo a gás foram eluidas em uma coluna específica para ésteres e como as amostras não passaram por nenhum processo de transformação química antes da análise, os triglicerídeos e ácidos graxos livres presentes na amostra foram atribuídos aos sinais detectados pelo equipamento como sinal não clássico na cromatografia a gás. Devido à não existência de um padrão cromatográfico adequado para triglicérides de microalga, a identificação do sinal correspondente ao óleo de microalga foi feito através de verificações experimentais de amostras ricas em triglicerídeos que indicaram que essa substância, no método cromatográfico aplicado, possui o tempo de retenção de 21 minutos.

O sinal detectado pelo CG não apresenta o formato clássico de pico devido à natureza da amostra, os triglicerídeos são substâncias com alto peso molecular e longas cadeias carbônicas, o que dificulta a saída da coluna cromatográfica que não é ideal para este tipo de composto. Como os triacilglicerídeos não são compostos facilmente volatilizáveis, então o

desprendimento esta substância da fase estacionária ocorre com o aumento da temperatura resultando no sinal mais largo que os picos convencionais.

A resolução desse sinal pode ser melhorada realizando uma reação de transesterificação na amostra, contudo neste trabalho, as massas de extratos hexânicos utilizadas como amostras não eram suficientes para fazer esta reação, e foi verificado ser possível detectar os lipídeos na forma de triglicerídeos, e a quantificação foi feita com o auxílio de outra ferramenta de tratamento de dados, *software* Origin®. Neste programa foi utilizada a ferramenta matemática de cálculo de integração nos picos da região de 7,6 minutos (presente em todos os cromatogramas de todas as microalgas estudadas, e que serviu de referência para o cálculo, uma vez que foi integrado pelo próprio cromatógrafo) e de 21 minutos (triglicerídeos).

Esta etapa só foi necessária devido à má resolução do sinal atribuído aos triglicerídeos como explicado previamente, se o sinal aparecesse no formato de um pico bem resolvido, não seria preciso utilizar deste recurso matemático, pois o próprio programa que faz a aquisição de dados no cromatógrafo também faz o cálculo do percentual de cada substância presente na amostra. Na literatura estes problemas não são descritos pois a maioria das análises de lipídeos realizadas por cromatografia a gás é feita uma reação previa para a conversão dos triglicerídeos e ácidos graxos em alquil-ésteres compatíveis com as colunas cromatográficas aplicadas.

Os valores calculados de teor de lipídeos nos extratos hexânicos das microalgas *Desmodesmus sp.*, *Dunaliella salina*, *Dunaliella tertiolecta* e *Nannochloropsis sp.* estão exibidos na Tabela 7.

Tabela 7. Teor de lipídeos por CG.

Espécie de Microalga	Massa de Extrato (mg)	Teor de Lipídeos no extrato (%)	Teor de Lipídeos na Biomassa Seca (%)
<i>Desmodesmus sp.</i>	10,9	5,4	0,6
<i>D. salina</i>	13,7	10,9	1,5
<i>D. tertiolecta</i>	44,3	17,7	7,8
<i>Nannochloropsis sp.</i>	20,5	6,2	1,3

5.6. Comparação de Resultados entre as Técnicas Utilizadas

A Tabela 8 apresenta a compilação de todos os resultados encontrados para as análises de quantificação de lipídeos nas microalgas. Apenas para as técnicas de cromatografia por camada delgada e cromatografia a gás foram utilizadas as mesmas amostras. A variação do resultado de uma técnica para outra ocorre pela diferença da sensibilidade do método.

Tabela 8. Resultados de teor de lipídeos obtidos nas diferentes técnicas estudadas.

Espécie de Microalga	Espectroscopia de Infravermelho	Espectrofluorescência	Cromatografia em Camada Delgada	Cromatografia a Gás
<i>Desmodesmus sp.</i>	N A	N A	0,5 %	0,6 %
<i>D. salina</i>	N A	N A	1,0 %	1,5 %
<i>D. tertiolecta</i>	N A	N A	6,8 %	7,8 %
<i>H. pluvialis</i>	7,0 %	N A	N A	N A
<i>Nannochloropsis sp.</i>	0,3 %	4,7 %	1,0 %	1,3 %

*N A = Não analisada

Um motivo que causa a diferença entre os resultados das análises é que o valor obtido pela espectroscopia de infravermelho longe não é confiável, uma vez que por esta técnica não foi possível separar os sinais dos triglicerídeos dos sinais de outros compostos presentes no extrato que também continham a ligação C=O na região de 1750 cm^{-1} . Todavia esta observação foi bastante útil para as análises seguintes, pois se mudou o método de extração, não mais promovendo a extração de lipídeos pela técnica de Bligh & Dyer e passando a utilizar a técnica de extração com hexano, que é um solvente que possui características mais próximas das substâncias desejadas que a mistura de solventes clorofórmio e metanol, obtendo desta forma um extrato mais rico em óleo.

Após constatar que a técnica de infravermelho não seria eficiente para uma análise de cunho quantitativo, não foram feitas novas análises com outras espécies de microalgas por esta técnica, pois os resultados que seriam obtidos não seriam confiáveis, mesmo mudando o método de extração. Apesar do resultado obtido com a espectrofluorescência ser positivo, esta técnica não atendeu os objetivos deste trabalho por ter a etapa de geração da curva de calibração muito demorada, afanosa e sensível à variações do cultivo,

consequentemente outras espécies não foram analisadas por esta técnica. Uma vez que cromatografia em camada delgada apresentou resultados adequados aos que se buscava e características compatíveis com o propósito deste estudo, quatro espécies de microalgas foram avaliadas com estas técnicas e os resultados obtidos comparados por cromatografia a gás.

Das quatro técnicas de análise estudadas neste trabalho, apenas a espectrofluorimetria não envolveu extração da amostra após o desenvolvimento do método, e foi a técnica que apresentou maior teor de lipídeos, isto, pois ao fazer a extração não é possível extrair todos os compostos lipídicos das células microalgais, e ao tingir as células com o corante liposeletivo vermelho do Nilo é possível captar os compostos de interesse dentro da célula.

A espécie *H. pluvialis* não foi estudada nas outras técnicas pois foi previamente detectado a dificuldade do rompimento da parede celular que é feito pela liofilização das células (Damiani, M. C., et al, 2010), e por não ter sido possível utilizar esta técnica de secagem, foi testada o congelamento das células com nitrogênio líquido, e outras técnicas de rompimento celular, porém nenhuma demonstrou eficácia no rompimento celular, portanto esta espécie foi removida da continuidade dos estudos.

Os resultados das amostras analisadas pelas técnicas cromatográficas foram bastante próximos e o desvio do erro entre os valores encontrados nas mesmas amostras ficou em média de 16,51 %. Isso ocorre pois, apesar das técnicas utilizarem os mesmos princípios físico-químicos de separação e análise, outros aspectos provocam essa diferença. Por exemplo a análise por cromatografia a gás é totalmente realizada pelo equipamento desde a injeção até a detecção, enquanto a cromatografia em camada delgada é feita pelo analista, a aplicação é uma etapa muito suscetível ao erro, pois se o volume aplicado com a micropipeta capilar não for precisamente igual todas as vezes, pode ocorrer o erro de aplicar um volume menor que o proposto pelo método, diminuindo o teor de lipídeos real. Outra etapa que pode provocar uma diferença entre o valor real e o encontrado é a etapa de revelação, o iodo sublima e se separa da cromatoplaça muito rapidamente, então é necessário

que o analista faça este passo no menor tempo possível para evitar a perda do revelador antes da aquisição dos dados pela digitalização.

6. Conclusões

A microalga *Haematococcus pluvialis* não pôde ser estudada adequadamente pela dificuldade no rompimento da parede celular que só seria possível com um equipamento de liofilização para secar as células, removendo toda a água a temperatura inferior à 50 °C sob vácuo pelo processo de sublimação, fragilizando a parede celular. Como este equipamento não pode ser utilizado esta espécie não teve seu teor de lipídeos quantificado. Buscou-se a extração com hexano utilizando banho ultrassônico, resfriamento com nitrogênio líquido, alta temperatura e pressão, mas nenhuma dessas tentativas surtiram efeito positivo e a técnica de Bligh & Dyer (1959) foi capaz de extrair diversas outras substâncias menos os lipídeos de interesse.

Todas as microalgas estudadas foram analisadas em seu estado vegetativo, pelo menor tempo de cultivo, estágio em que não ocorre um acúmulo de lipídeos pelas células microalgais, de acordo com a literatura o acúmulo de lipídeos ocorrem nas etapas de cultivo em que as microalgas estão estressadas, com alguma deficiência nutricional ou expostas a um excesso de radiação luminosa.

É necessário determinar um conceito mais adequado para o termo “lipídeos” principalmente em matrizes como as microalgas. A extração de substâncias depende do solvente utilizado, e alguns solventes possuem mais afinidades e interações com substâncias que não interessam aos pesquisadores e produtores de biocombustíveis que podem basear seus modelos, cálculos e planejamentos em resultados imprecisos por considerarem como lipídeos outras substâncias como pigmentos e proteínas.

A espectroscopia de infravermelho longe é uma técnica que possui grande potencial para ser utilizada em análises de lipídeos em nível qualitativo ou comparativo. Por não ser uma técnica muito seletiva, não se adéqua a quantificação de lipídeos em mistura por ser suscetível a interferências de substância que não influenciam no processo de produção do biodiesel. Esta técnica é muito dependente do processo de extração utilizado, podendo indicar valores falsos como no caso da *H. pluvialis* que não apresentou lipídeos uteis

na produção do biodiesel no extrato, mas na análise por FTIR indicou um teor de 7,0 % que foi atribuído a outras substâncias presentes no extrato como a clorofila, astaxantina e outros compostos que apresentam a ligação C=O em sua estrutura molecular. Esta técnica não atingiu os objetivos deste trabalho.

A espectrofluorimetria, apesar de ter apresentado resultados positivos na quantificação de lipídeos neutros na microalga *Nannochloropsis sp.* de uma média de 4,7% para células na primeira semana de cultivo. E uma vez que o método está concluído a análise é rápida, esta técnica provou ser pouco eficaz pois para cada espécie de microalga é necessário fazer uma curva de calibração como a exibida na Figura 22 e, por ser apenas reproduzível nas mesmas condições de cultivo. Isto é se algum nutriente for modificado, se a temperatura for alterada ou as condições de iluminação mudarem, o método de análise deve ser novamente refeito em todas as etapas, para a geração de uma nova curva de calibração, que é um processo longo, demorado, e consome muitos recursos, em especial o solvente para a purificação das amostras.

A análise dos extratos hexânicos por cromatografia em camada delgada apresentou os seguintes resultados de teor de lipídeos para a espécie *Desmodesmus sp.*:0,5 %, *Dunaliella salina*:1,0 %, *Dunaliella tertiolecta*:6,8 % e *Nannochloropsis sp.*:1,0 %. Esta técnica é rápida, simples e de baixo custo, atingindo parcialmente o objetivo do trabalho de desenvolver um método de análise com essas características. Contudo é necessário, para maior segurança nos resultados, realizar as aplicações com muito cuidado para evitar erros de paralaxe.

A análise dos extratos hexânicos por cromatografia a gás apresentou os resultados de teor de óleo de 0,59 % para *Desmodesmus sp.*, 1,5% para *Dunaliella salina*, 7,8 % para *Dunaliella tertiolecta* e 1,3% para *Nannochloropsis sp.* Esta é a técnica mais utilizada atualmente para quantificação de lipídeos, através da análise das amostras de óleo transesterificadas, contudo neste trabalho, a etapa da reação de transesterificação foi eliminada do método, reduzindo um pouco o custo da análise. Porém o tempo de análise aumentou, já que uma nova etapa de tratamento de dados foi implementada.

Quando a etapa de extração é necessária no método de análise, uma parte das substâncias de interesse permanece ainda dentro das células microalgais, não sendo possível garantir a confiabilidade do resultado absoluto. Técnicas que envolvem a análise direta dos lipídeos dentro das células podem apresentar maiores resultados na quantidade de lipídeos. Contudo, como não existem padrões de células com valores conhecidos de lipídeos, ainda é necessário a etapa de extração no desenvolvimento do método para a obtenção de valores de associação dos lipídeos, gerando um método de análise que não apresenta resultados plenos. Então é possível fazer uma análise segura do teor de lipídeos nos extratos, entretanto o teor verdadeiro na biomassa não pode ser quantificado incontestavelmente.

O método de extração possui uma grande influência no resultado da análise, apesar do método de Bligh & Dyer ser amplamente utilizado para a extração de lipídeos, este método extrai uma grande quantidade de outros componentes que não são interessantes para o processo de produção de biodiesel. Se a quantificação for apenas realizada pela gravimetria do extrato obtido, ocorre um erro na quantificação que pode produzir valores incertos ou contestáveis como microalgas com teor de lipídeos acima de 70% da biomassa seca. Contudo a extração com solventes apolares e com maiores cadeias carbônicas são mais favoráveis por se assemelharem com os triglicerídeos, ésteres graxos e ácidos graxos livres, possuem maior seletividade, produzindo extratos mais ricos em lipídeos e com menos impurezas de proteínas e corantes produzidos pelas células.

Em trabalhos futuros podem ser estudados melhores tratamentos para rompimento da membrana celular da *Haematococcus pluvialis* por métodos físicos e realizar a extração e análises em células microalgais estressadas. Outras técnicas de análise podem ser estudadas, como a Ressonância Magnética Nuclear, Raio-x ou tentar trabalhar algumas das técnicas estudadas neste trabalho variando os pontos morosos.

7. Referências Bibliográficas

Adams, C.; Godfrey, V.; Wahlen, B.; Seefeldt, L.; Bugbee, B. Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content tradeoff in oleaginous green microalgae. *Bioresource Technology*, 131, 188–194, 2013.

Amaro, H. M. et al. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Appl Energy* (2011), doi:[10.1016/j.apenergy.2010.12.014](https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.014)

Amin, S. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae *Energy Conversion and Management* 50 (2009) 1834–1840

Balabin, M. R., Safieva, R. Z., Lomakina, E. I. Gasoline classification using near infrared (NIR) spectroscopy data: Comparison of multivariate techniques. *Analytica Chimica Acta*, 671, 27–35, 2010.

Balabin, M. R., Lomakina, E. I., Safieva, R. Z. Neural network (ANN) approach to biodiesel analysis: Analysis of biodiesel density, kinematic viscosity, methanol and water contents using near infrared (NIR) spectroscopy. *Fuel*, 90, 2007–2015, 2011.

Baños, R., Manzano-Agugliaro, F., Montoya, F.G., Gil, C., Alcayde, A., Gomez, J. Optimization methods applied to renewable and sustainable energy: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* v.15 (2011) p. 1753–1766.

Bligh E.I. and Dyer W.J. 1959. A rapid method of lipid extraction and purification *Can. J. Biochem. Physiol.* 35, 911-917.

Brown L. M.; Zeiler, K. G. – Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. *Energy Conversion and Management*, 34, 1005-13, 1993.

Brum, A. A. S.; Arruda, L. F.; Regitano-d'Arce, M. A. B. Métodos de Extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. *Química Nova*, v. 32, n.4, p. 849-854, 2009.

Campbell, P. K., Beer, T., Batten, D. Life cycle assessment of biodiesel production from microalgae in ponds. *Bioresource Technology* 102, 50 – 56. 2011.

Carrero, A. et al. Hierarchical zeolites as catalysts for biodiesel production from *Nannochloropsis* microalgae oil. *Catalysis Today*, v 167, n 1, p 148-153, 2011.

Carvalho, R. M. Desenvolvimento e análise energética do processo de obtenção do biodiesel de microalga por metanólise *in situ*. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Engenharia da Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2010.

Cifuentes, A., Gonzales, M. e Parra, O. Métodos para el cultivo de microalgas de ambientes hipersalinos. Manual de Métodos Fisiológicos. Alveal, K., Ferrario, F., Oliveira, E. & San, E. (Ed.) Universidad de Concepción. Concepción. Chile. 1995.

Ciola, R., Fundamentos da cromatografia a gás, 2ª ed., Editora Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 1985.

Cheirsilp, B., Mixed culture of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for lipid production from industrial wastes and its use as biodiesel feedstock, *New Biotechnol.* (2011), doi:[10.1016/j.nbt.2011.01.004](https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.01.004)

Chen, C-Y.; Yeh, K-L.; Aisyah, R.; Lee, D-J.; Chang, J-S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology* 102 (2011) 71–81

Chen, W.; Sommerfeld, M.; Hu, Q. Microwave-assisted Nile red method for *in vivo* quantification of neutral lipids in microalgae. *Bioresource Technology* 102 (2011) 135–141

Chisti, Y. Microalgae as sustainable cell factories. *Environ. Eng. Manag. J.* 2006; 5:261–74.

- Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25, 294–306
- Collins, C. H., Braga, G. L., Bonato, P. S. (coordenadores), *Fundamentos de Cromatografia*, Editora da Unicamp, Campinas, 2006.
- Cooksey, K. E., Guckert, J. B., Williams, S. A., Callis, P. R. Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile Red. *Journal of Microbiological Methods*, p. 333–345, 1987
- Couto, R. M.; Simões, P. C.; Reis, A.; Silva, T. L.; Martins, V. H.; Sánchez-Vicente, Y. Supercritical fluid extraction of lipids from the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii*. *Eng. Life Sci.* 2010, 10, No. 2, 158–164
- Damiani, M.C.; Popovich, C. A.; Constenla, D.; Leonardini, P. I. Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potencial use as a biodiesel feedstock. *Bioresource Technology*, 101, 3801 – 3807, 2010.
- Dean, A. P.; Sigeo, D. C.; Estrada, B.; Pittman, J. K. Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresource Technology* 101 (2010) 4499–4507
- Demirbas A., “Comparison of transesterification methods for production of biodiesel from vegetable oils and fats”. *Energy Conversion and Management* Volume 49, Issue 1, January 2008, Pages 125-130.
- Demirbas A, Demirbas M. F. *Algae energy: algae as a new source of biodiesel*. London: Springer-Verlag; 2010.
- Demirbas, A., Demirbas, M. F. Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Conversion and Management*, v 52, n 1, p 163-170, 2011.
- Demirbas M. F. Biofuels from algae for sustainable development. *Appl Energy* (2011), doi:[10.1016/j.apenergy.2011.01.059](https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.01.059)
- Dias, F. S., et al. Application of multivariate techniques for optimization of direct method for determination of lead in naphtha and petroleum

condensate by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Microchim Acta*, v 158, p 321–326, 2007.

Doehlert, D.H., *Appl. Stat.* 19 (1970) 23. Apud Ferreira, S. L.C., et al. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry—review. *Talanta*, v 63, p 1061–1067, 2004.

Dong, Q.; Zhao, X. M. In situ carbon dioxide xation in the process of natural astaxanthin production by a mixed culture of *Haematococcus pluvialis* and *Phaf arhodozyma*. *Catalysis Today*, Estados Unidos, v. 98, n.4, p. 537–544, 2004.

Dos Santos, W. N. L. et al. An on-line pre-concentration system for determination of cadmium in drinking water using FAAS. *Journal of Hazardous Materials B137*, 1357–1361, 2006.

Dos Santos W.N.L.; Dias F.D.; Rebouças M.V.; Pereira M.D.; Lemos V. A.; Teixeira L. S. G. Mercury determination in petroleum products by electrothermal atomic absorption spectrometry after in situ preconcentration using multiple injections. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21,1327.2006.

Escaleira, L. A. Extração e Pré-concentração no Ponto Nuvem para a Determinação de Metais em Águas Salinas por Espectrometria de Emissão Ótica com Fonte de Plasma Indutivamente Acoplado. 101 f. Dissertação (Mestrado em Geociências) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, 2005.

Ferreira, S. L. C., et al. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry—review. *Talanta*, v 63, p 1061–1067, 2004.

Focke, W. W., et al. The effect of synthetic antioxidants on the oxidative stability of biodiesel. *Fuel* 94, 227 – 233.2012

Folch, J.; Lees, M.; *J. Biol. Chem.* 1957, 226, 497.

Ghiggi, V. Estudo do crescimento e indução da produção do pigmento astaxantina por *Haematococcus pluvialis*. Dissertação de mestrado do Curso de Pós-graduação em processos Biotecnológico da Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007.

Gilmour, D. J. The effect of osmotic stress on photosynthesis in the unicellular green alga *Dunaliella tertiolecta*. Tese de Doutorado. Departamento de botânica da University of Glasgow. Reino Unido, 1982.

Godoy, I. J., Teixeira, J. P. F., Nagai, V., E Rettori, C. Determinação do teor de óleo em sementes individuais de amendoim pelo método de ressonância magnética nuclear: estudo de variância e relação Com o método soxhlet. *Bragantia*, Campinas, 45(1):161-169, 1986.

Gomes, M.; Biondi, A.; Brianezi T.; Glass, V. O. Brasil dos agrocombustíveis: gordura animal, dendê, algodão, pinhão-mansão, girassol e canola. *Relatório da ONG Repórter Brasil*, v. 5, p. 7-28, 2009.

Gonzalez, W. A., Sales, E. A., Essayem, N. Transesterification of rapeseed oil with ethanol over heterogeneous heteropolyacids, *Catalysis Communications*, 10, 92–97. 2008.

Greenwell, H. C.; Laurens, L. M. L.; Shields, R. J.; Lovitt, R. W.; Flynn, K. J. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *Journal of the Royal Society Interface* (2010) 7, 703–726 doi:10.1098/rsif.2009.0322

Grisoli R., Coelho S. T., Matai P. H. L. S., *Energia Microbiológica*, Revista de Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente - v.4, n.2, Artigo 3, maio/ ago. 2009

Grobbelaar J. U. Algal nutrition. In Richmond A, editor. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Wiley-Blackwell; 2004.

Hamad B., Lopes de Souza R.O., Sapaly G., Carneiro Rocha M.G., Pries de Oliveira P.G., Gonzalez, W.A.; Sales E. A.; Essayem, N. Transesterification of rapeseed oil with ethanol over heterogeneous heteropolyacids. *Catalysis Communications*, v.10, p. 92–97, 2008.

Harun, R.; Singh, M.; Forde, G. M.; Danquah, M. K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (2010) 1037–1047

Huang, G-H., Chen, G., Chen, F. Rapid screening method for lipid production in alga based on Nile red fluorescence. *Biomass and Bioenergy*, 33, 1386-1392. 2009.

Huang, G.; Chen, F.; Wei, D.; Zhang, X.; Chen, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*, 87 38–46, 2010.

Imamoglu, E.; Sukan, F. V.; Dalay, M. C. Effect of different Culture Media and Light Intensities on Growth of *Haematococcus pluvialis*. *International Journal of Natural and Engineering Sciences*, v. 3, 2007.

Isleten-Hosoglu, M.; Gultepe, I.; Elibot, M. Optimization of carbon and nitrogen sources for biomass and lipid production by *Chlorella saccharophila* under heterotrophic conditions and development of Nile red fluorescence based method for quantification of its neutral lipid content. *Biochemical Engineering Journal*, 61, 11-19, 2012.

Junqueira, M. S. D. "Adicionalidade" ambiental do álcool combustível: um benefício ambiental verdadeiro ou somente mais uma matriz energética - um estudo do ciclo de vida deste combustível. *RAE electron.*, São Paulo , v. 1, n. 1, June 2002 .

Knothe, G. Some aspects of biodiesel oxidative stability. *Fuel Processing Technology* 88, 669-677, 2007

Li, Y.; Horsman, M.; Wu, N.; Lan, C. Q.; Dubois-Calero, N. 2008. Biofuels from microalgae. *Biotechnol. Prog.* 24, 815–820.

Liu, Z-Y.; Wang G-C.; Zhou, B-C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology* 99 (2008) 4717–4722

Liu G.Z.; Han Y.J.; Wang L.; Zhang X.W.; Mi Z.T. Solid Deposits from Thermal Stressing of n-López, D. E.; Mullins, J. C.; Bruce, D. A. 2010. Energy Life Cycle Assessment for the Production of Biodiesel from Rendered Lipids in the United States. *Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 49, p. 2419-2432. 2009.

Liu, J.; Huang, J.; Sun, Z.; Zhong, Y.; Jiang, Y.; Chen, F. Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: Assessment of algal oils for biodiesel production. *Bioresource Technology* 102 (2011) 106–110

Ma, F.; Clements, L. D.; Hanna, M. A. Biodiesel Fuel from Animal Fat. Ancillary Studies on Transesterification of Beef Tallow. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 37, 3768-3771. 1998.

Mata, T. M.; Martins, A. A.; Caetano, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (2010) 217–232

Meng X, Yang J, Xu X, Zhang L, Nie Q, Xian M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*; 34, 1–5, 2009.

Metcalf, L. D. A. A.; Schimitz, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, North Carolina, v.38, p. 510, 1966.

Milne, T.A., Evans, R.J., Nagle, N. Catalytic conversion of microalgae and vegetable oils to premium gasoline, with shape-selective zeolites. *Biomass* 21, 219–232, 1990.

Minitab® Release 14 Statistical Software, Minitab Inc., Quality Plaza 1829 Pine Hall Rd, State College, PA 16801-3008, EUA, 2004.

Minowa, T., Yokoyama, S.-Y., Kishimoto, M., Okakura, T. Oil production from algal cells of *Dunaliella tertiolecta* by direct thermochemical liquefaction. *Fuel* 1995; 74:1735–8.

Miranda, J. R. P. C. Produção de Bioetanol a Partir da Microalga *Scenedesmus obliquus*. Dissertação de mestrado. Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa, Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, 2011.

Moazami, N.; Ranjbar, R.; Ashori, A.; Tangestani, M.; Nejad, A. S. Biomass and lipid productivities of marine microalgae isolated from the Persian Gulf and the Qeshm Island. *Biomass and Bioenergy*. v. 35, p. 1935 – 1939, 2011.

Monteiro, M.R., Ambrozin, A.R.P., Lião, L.M., Ferreira, A.G. Critical review on analytical methods for biodiesel characterization. *Talanta* 77 (2008) 593–605

Morin P.; Hamad B.; Sapaly G.; Rocha, M.G. C.; Oliveira, P.G. P.; Gonzalez W. A.; Sales, E. A.; Essayem N. Transesterification of rapeseed oil with ethanol I. Catalysis with homogeneous Keggin heteropolyacids, *Applied Catalysis A: General* 330, 69–76, 2007.

Monteiro, M.R., Ambrozin, A.R.P., Lião, L.M., Boffo, E. F., Pereira-Filho, E. R., Ferreira, A.G. ¹H NMR and multivariate calibration for the prediction of biodiesel concentration in diesel blends. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 86, 581-585, 2009.

Monteiro, M.R., Ambrozin, A.R.P., Lião, L.M., Ferreira, A.G. Determination of biodiesel blend levels in different diesel samples by ¹H NMR. *Fuel* 88 (2009) 691–696

Morais, M. G.; Costa, J. A. V. Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas com dióxido de carbono. *Ciênc. Agrotec.*, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1245-1251, jul./ago., 2008.

Origin® 7.0 SR0, OriginLab Corporation, One Roundhouse Plaza, Northampton, MA 01060, EUA, 2003.

Pacheco, W. F., et al. Fluorimetric determination of cyclofenil using photochemical derivatization, *Talanta*, v 74, p 1442–1449, 2008.

Pan, Y-Y.; Wang, S-T.; Chuang L-T.; Chang, Y-W.; Chen, C-N. N. Isolation of thermo-tolerant and high lipid content green microalgae: Oil accumulation is predominantly controlled by photosystem efficiency during stress treatments in *Desmodesmus*. *Bioresource Technology* 102 (2011) 10510–10517

Portela, J. G.; Costa, A. C. S.; Teixeira, L. S. G. Determination of Vitamin B-6 in pharmaceutical formulations by flow injection-solid phase spectrophotometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34, 543. 2004.

Quadros, D. G. de et al .Biodigestão anaeróbia de dejetos de caprinos e ovinos em reator contínuo de PVC flexível. *Rev. bras. eng. agríc. ambient.*, Campina Grande , v. 14, n. 3, Mar. 2010 .

Radmann, E. M.; Costa, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 7, 1609-1612, 2008.

Razon L.F., Tan, R.R. Net energy analysis of the production of biodiesel and biogas from the microalgae: *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis*. *Appl Energy* (2011), doi:[10.1016/j.apenergy.2010.12.052](https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.052)

Rodolfi, L.; Zittelli, G. C.; Bassi, N.; Padovani, G.; Biondi, N.; Bonini, G.; Tredici, M. R. Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 102, No. 1, January 1, 2009

RUDIC V. e DUDNÍCENCO T., Process For Cultivation of Green Alga *Haematococcus pluvialis* (Flotow). MD Patent Nr. A 2000 0154, 2000.

Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C.; Spectrometric Identification of Organic Compounds, 5th ed., John Wiley & Sons: New York, 1991.

Satyanarayana, K. G., Mariano, A. B., Vargas, J. V. C. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. INTERNATIONAL JOURNAL OF ENERGY RESEARCH.35, 291–311, 2011

Saydut, A., Kafadar, A. B., Tonbul, Y., Kaya, C., Aydin, F. and Hamamci. C. Comparison of the biodiesel quality produced from refined sunflower (*Helianthus annuus L*) oil and waste cooking oil ENERGY EXPLORATION & EXPLOITATION v 28 n 6, 2010 pp. 499-512

Semary, N. A. E. The polyphasic description of a *Desmodesmus* spp. Isolate with the potential of bioactive compounds production. Biotechnol. Agron. Soc. Environ.2011 15(2), 231-238

Sharma, Y. C., Singh, B. Development of biodiesel: Current scenario. Renewable and Sustainable Energy Reviews 13, 1646 – 1651, 2009.

Sigma Scan Pro 5 for Windows, SPSS, Incorporated, First Floor St Andrew's House, West Street, Woking, Surrey GU21, 2000. Versão Teste.

Silva, T. L.; Santos, C.A; Reis, A. Multi-parameter flow cytometry as a tool to monitor heterotrophic microalgal batch fermentations for oil production towards biodiesel. Biotechnology and Bioprocess Engineering, v 14, n 3, p 330-337, 2009.

Skoog, A. D., West, D. M., Holler, F. J. Crouch, R. S., Fundamentos de Química Analítica, Thonsons, Learning, 2006.Tradução da 8^a ed. Norte Americana.

Soto, M. N. Efecto de productos de naturaleza zeolitica sobre el crecimiento y la calidad dietetica de microalgas para la acuicultura. Tese de doutorado na Pós-graduação Interinstitucional em Ciências Pecuarias. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia da Universidade de Colima. Mexico, 2000.

Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. Commercial Applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2006; 101(2):87–96

Teixeira, C. M. L. L.; Morales, E. Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel. In: *I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel*, 2006, Brasília. Anais do : I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, Brasília, DF: MCT/ABIPTI, p.91-96, 2006.

Statistica for Windows, StatSoft Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK 741014, EUA, 2006.

Teófilo, R. F. E Ferreira, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas Eletrônicas para Cálculos de Planejamentos Experimentais, um Tutorial. *Quim. Nova*, v. 29, n. 2, p 338-350, 2006.

Vijayaraghavan, K.; Hemanathan, K. Biodiesel Production from Freshwater Algae. *Energy Fuels*, 23, 5448–5453, 2009: DOI: 10.1021/ef9006033

Wahlen, B.D., Willis, R.M., Seefeldt, L.C., 2011. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. *Bioresour. Technol.* 102, 2724–2730.

Walne, P. R. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. *Fishery Invest. London*, v. 25, p. 1-53, 1966.

Walne, P, R. 1979 *Culture of Bivalve Molluscs: 50 years experience at Conwy*. 2th Londres: The White friars Press Ltd. 189p.

Wu, L. F.; Chen, P. C.; Huang, A. P.; Lee. C. M. The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater. *Bioresource Technology* 113 (2012) 14–18

Yang H., Irudayaraj J., Paradkar M.M., *Food Chem.* 93 (2005) 25–32.

Zhekisheva, M.; Boussiba, S.; Khozin-Goldberg, I.; Zarka, A.; Cohen, Z. Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters. *J. Phycol*, 38, 325 – 331, 2002.

Zhukova, N. V. e Aizdaicher, N. A. Fatty Acid Composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry*, v. 39, n. 2, p.351-356, 1995.

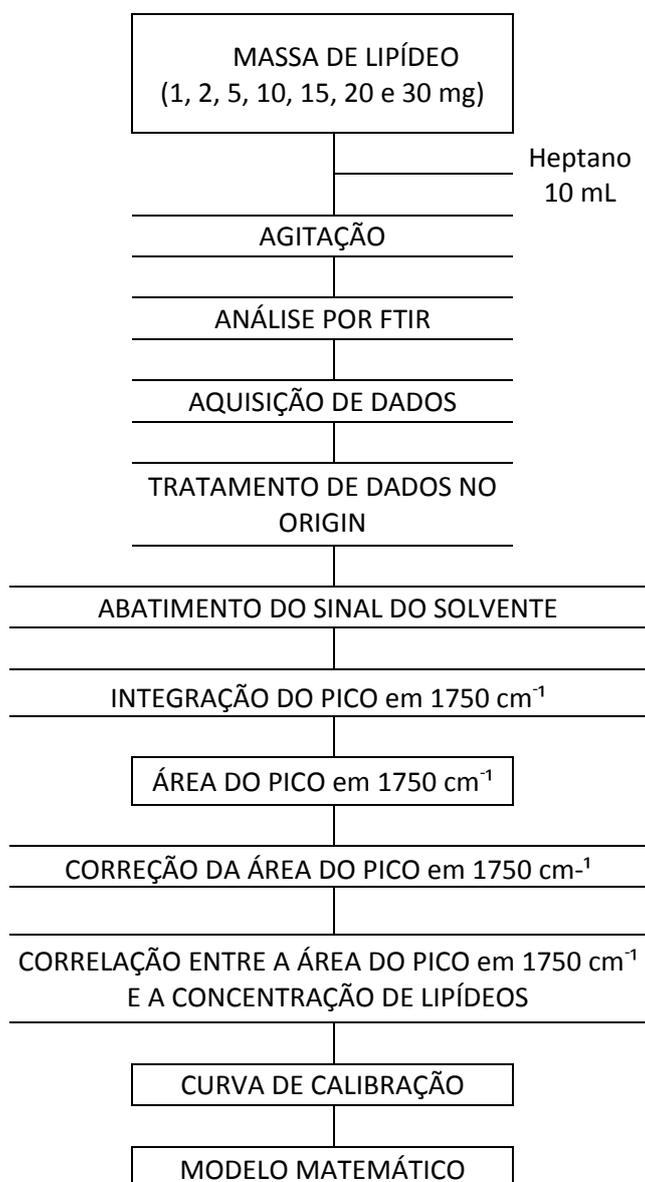
Anexos

ANEXO I

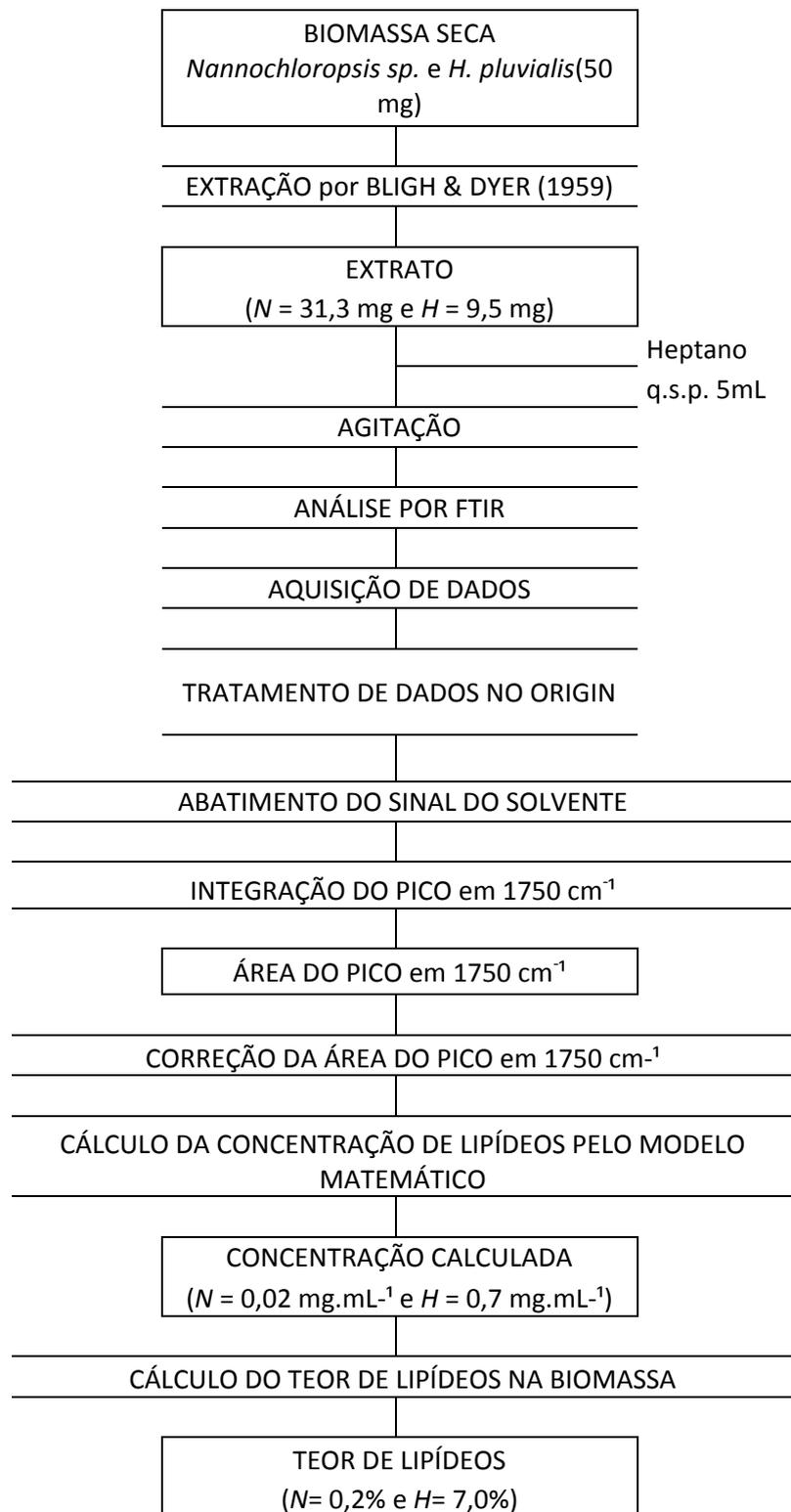
Esquema de Cálculos com Fluxograma de Etapas Experimentais

TÉCNICA: ESPECTROSCÓPIA DE INFRAVERMELHO LONGE COM TRANSFORMADA DE FOURIER

CURVA DE CALIBRAÇÃO

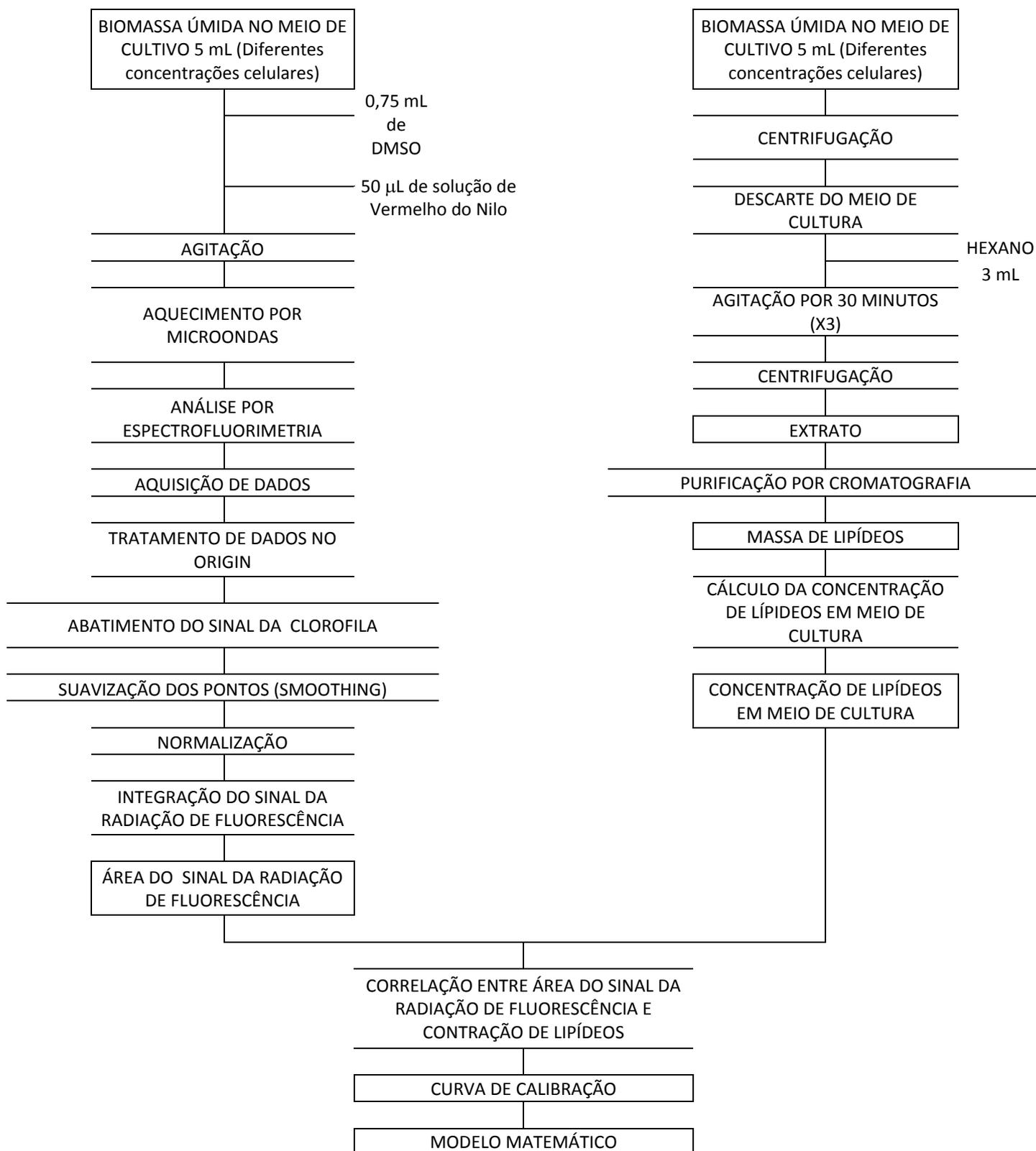


ANÁLISE DAS AMOSTRAS



TÉCNICA: ESPECTROFLUORESCÊNCIA

CURVA DE CALIBRAÇÃO

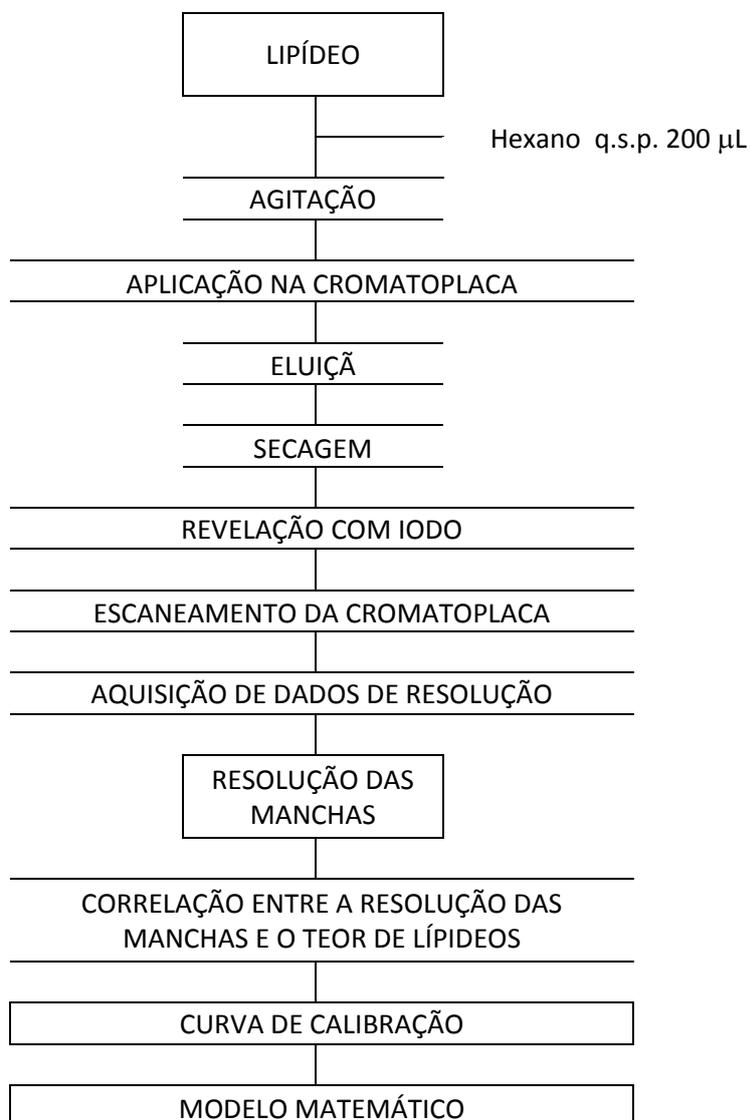


ANÁLISE DAS AMOSTRAS

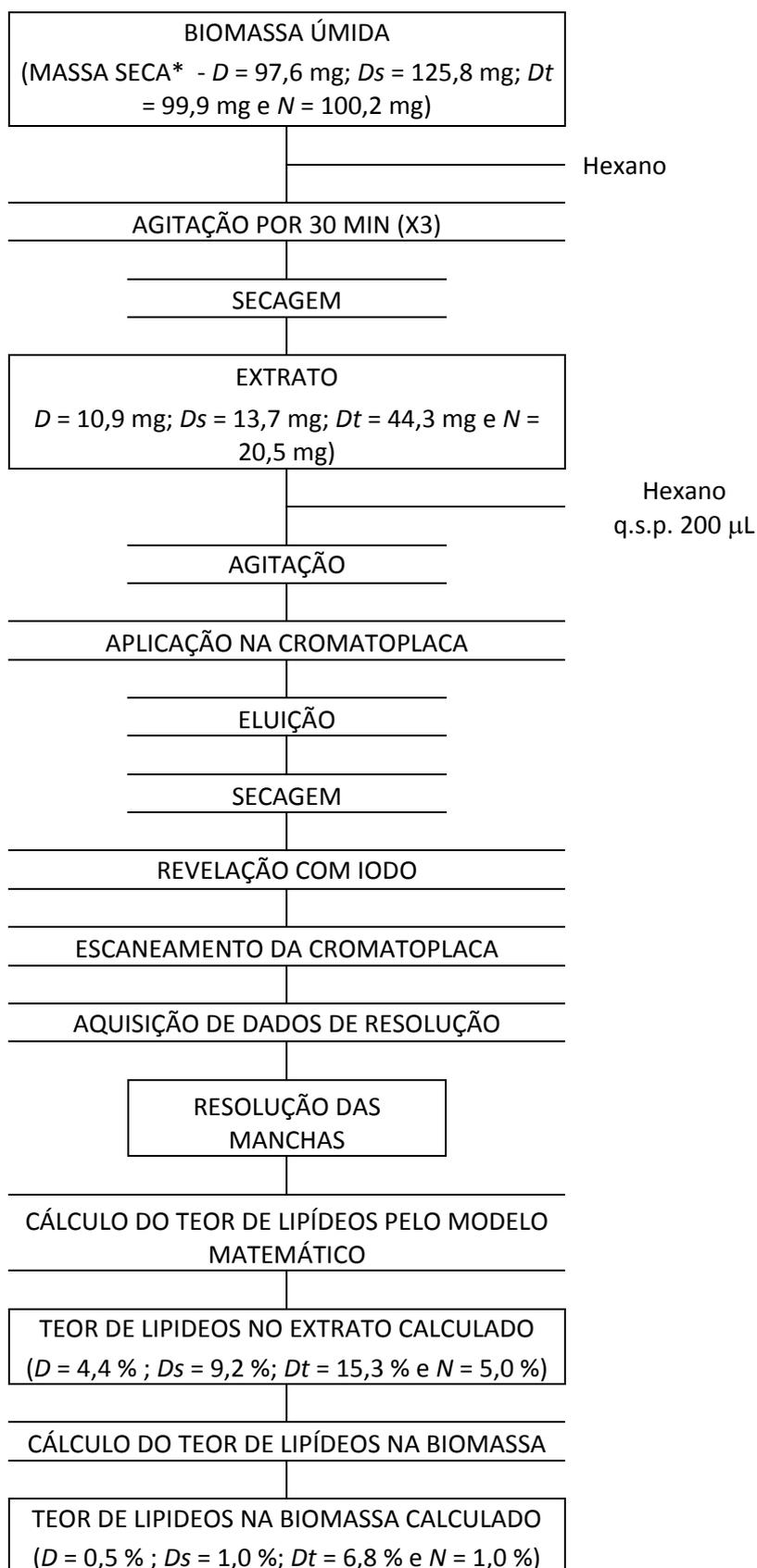


TÉCNICA: CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

CURVA DE CALIBRAÇÃO



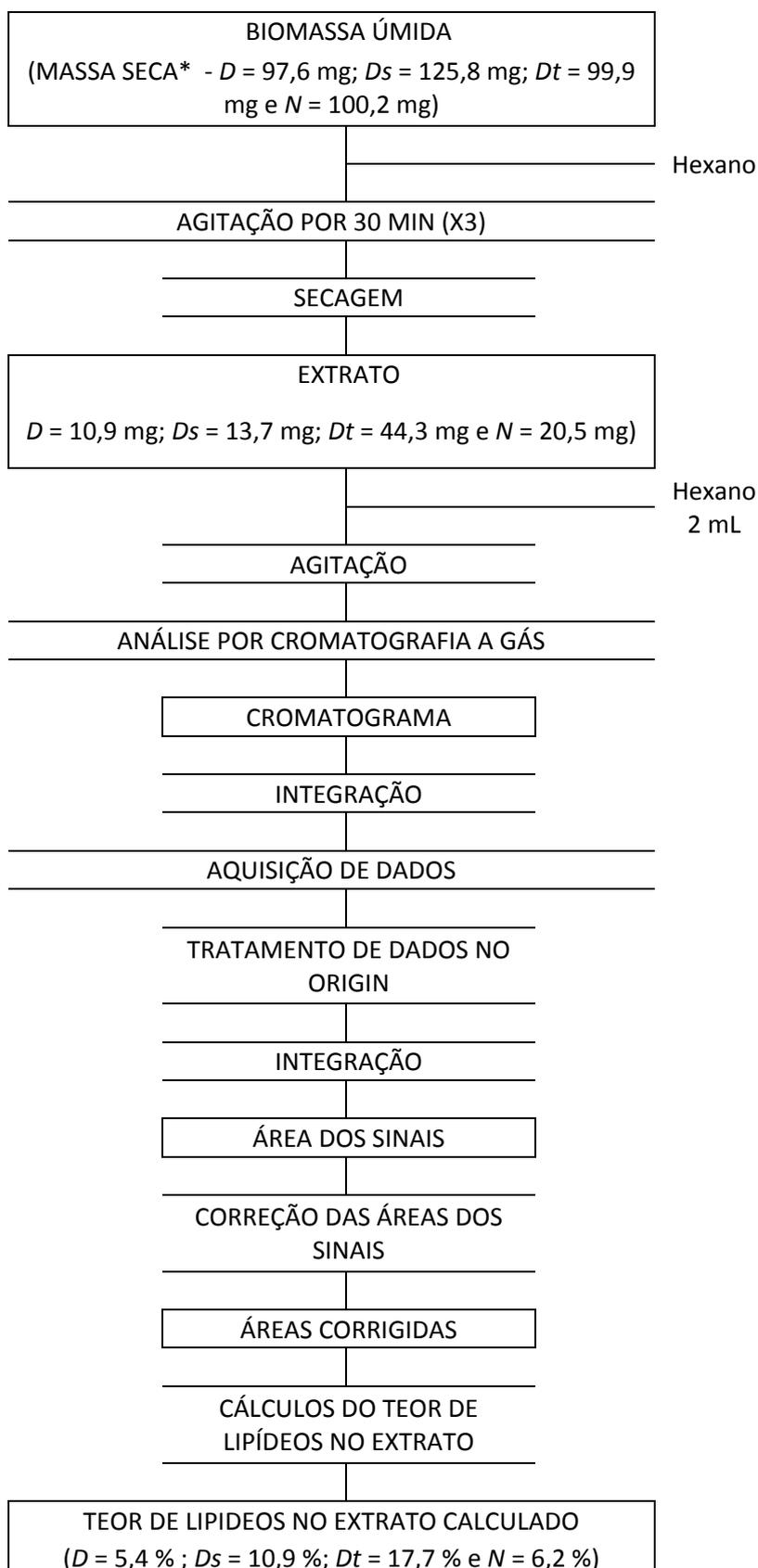
ANÁLISE DAS AMOSTRAS



*MASSA SECA = Biomassa seca após extração + massa seca do extrato

TÉCNICA: CROMATOGRAFIA A GÁS

ANÁLISE DAS AMOSTRAS



CÁLCULO DO TEOR DE LIPÍDEOS NA BIOMASSA

TEOR DE LIPÍDEOS NA BIOMASSA CALCULADO
($D = 0,6\%$; $Ds = 1,5\%$; $Dt = 7,8\%$ e $N = 1,3\%$)

*MASSA SECA = Biomassa seca após extração + massa seca do extrato

$D = \textit{Desmodesmus sp.}$ $Ds = \textit{Dunaliella salina}$
 $N = \textit{Nannochloropsis sp.}$ $Dt = \textit{Dunaliella tertiolecta}$
 $H = \textit{Haematococcus pluvialis}$

ANEXO II

Tabela de Meios de cultivo

Nutrientes g.L ⁻¹	Meio de Cultivo	Rudic	Basal de Bold (BBM)	Conwy	Conwy Modificado	Solução de metais	Solução de metais traço 1	Solução de metais traço 2	Solução de Vitamina
K ₂ HPO ₄		0,08	0,175	-	-	-	-	-	-
KH ₂ PO ₄		0,02	0,075	-	-	-	-	-	-
MgSO ₄		0,01	-	-	-	-	-	-	-
CaCl ₂		0,0585	-	-	-	-	-	-	-
EDTA		0,0075	0,01	0,045	0,045	-	-	-	-
NaCl		0,02	0,025	-	-	-	-	-	-
CaCl ₂ .2H ₂ O		-	0,025	-	-	-	-	-	-
MgSO ₄ .7H ₂ O		-	0,0075	-	-	-	-	-	-
KOH		-	0,0062	-	-	-	-	-	-
FeSO ₄ .7H ₂ O		-	0,00498	-	-	-	-	-	-
FeCl ₃ .6H ₂ O		-	-	0,0013	0,0013	-	-	-	-
Na ₂ HPO ₄		-	-	0,02	0,02	-	-	-	-
MnCl ₂ .4H ₂ O		-	-	0,0036	0,0036	-	1,81	-	-
H ₂ BO ₃		-	0,00805	0,0336	0,0336	0,3	2,86	-	-
MnSO ₄ .H ₂ O		-	-	-	-	1,5	-	-	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O		-	-	-	-	0,1	0,222	-	-
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O		-	-	-	-	0,3	-	0,9	-

UFBA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA POLITÉCNICA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA INDUSTRIAL - PEI

Rua Aristides Novis, 02, 6º andar, Federação, Salvador BA

CEP: 40.210-630

Telefone: (71) 3283-9800

E-mail: pei@ufba.br

Home page: <http://www.pei.ufba.br>

