

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE TECNOLOGIA
ESCOLA DE QUÍMICA

LUÍSA STEPHANO MIRANDA SAMPAIO CORRÊA

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS, CARBOIDRATOS,
CINZAS E LIPÍDEOS DA BIOMASSA DE *SCENEDESMUS SP*

Rio de Janeiro

2019

LUÍSA STEPHANO MIRANDA SAMPAIO CORRÊA

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS,
CARBOIDRATOS, CINZAS E LIPÍDEOS DA BIOMASSA DE *SCENEDESMUS*
*SP***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao corpo docente da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Química Industrial.

Orientadora: Yordanka Reyes Cruz, D.Sc.

Coorientadora: Carolina Vieira Viegas, D.Sc.

Rio de Janeiro

2019

LUÍSA STEPHANO MIRANDA SAMPAIO CORRÊA

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS,
CARBOIDRATOS, CINZAS E LIPÍDEOS DA BIOMASSA DE *SCENEDESMUS*
*SP***

Monografia em Química Industrial submetida ao Corpo Docente da Escola de Química,
como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Químico Industrial.

Rio de Janeiro, 08 de Janeiro de 2020.

Orientado por:

Yordanka Reyes Cruz, D.Sc. (Orientadora)
Escola de Química – UFRJ

Carolina Vieira Viegas, D.Sc. (Coorientadora)
Escola de Química – UFRJ

Aprovado por:

Adriana dos Anjos Silva, D.Sc.
Escola de Química – UFRJ

Leonard Guimarães Carvalho, D.Sc.
Escola de Química – UFRJ

CIP – Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C824e Corrêa, Luísa Stephano Miranda Sampaio.
Extração e Caracterização das proteínas, carboidratos,
cinzas e lipídeos da Biomassa de *Scenedesmus Sp.* / Luísa
Stephano Miranda Sampaio Corrêa. – Rio de Janeiro, 2019.
63 f. : il.
Orientadora: Yordanka Reyes Cruz, D.Sc.
Coorientadora: Carolina Vieira Viegas, D.Sc.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em
Química Industrial) – Curso de Química Industrial,
Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2019.

1. Biomassa. 2. Microalgas. 3. Scenedesmus sp. I. Cruz,
Yordanka Reyes Cruz, orient. II. Viegas, Carolina Vieira,
coorient. III. Título.

CDD: 544

RESUMO

Os combustíveis fósseis são os maiores responsáveis pela emissão de gases do efeito estufa e, a partir dos anos 80, cresceu o interesse no desenvolvimento e produção de biocombustíveis. Uma das opções encontradas foi usar microalgas para produção de biodiesel. O presente experimento tem por objetivo caracterizar a biomassa da microalga *Scenedesmus sp* quanto ao teor de proteínas, carboidratos, lipídeos e cinzas, e identificar as principais classes lipídicas presentes nas diferentes frações. Tem por justificativa o fato da produção primária global de biomassa ser 50% aquática e 50% terrestre, como uma alternativa emergente, para obtenção de compostos destinados a alimentação. Visa a valorização da microalga *Scenedesmus sp*. (biomassa aquática) para caracterização como possível fonte de proteínas, lipídeos e carboidratos. Metodologicamente, utiliza o método de Kjeldahl, para determinação do teor de proteínas cujo valor foi totalizado em 33,18%, já os carboidratos totais, foram quantificados através da hidrólise ácida da biomassa e, identificados por meio de cromatografia líquida de alta resolução, em que foi obtido um teor de carboidratos totais de 40,74% e dentre estes o presente em maior quantidade foi a glicose. Determina o teor de cinzas presentes na biomassa estudada, onde se tem o resultado de 10,69%. A influência no teor dos lipídeos foi avaliada sob ação de diferentes solventes extratores: Bligh & Dyer, Etanol, Saponificação e *J-Schmid-Bondzynski-Ratzlaff*. As principais classes lipídicas presentes nas frações extraídas foram identificadas utilizando cromatografia em camada delgada (CCD) e foram quantificados o teor de compostos graxos e não-graxos nos extratos lipídicos. O melhor resultado desse experimento foi obtido com a utilização de etanol como solvente extrator, onde foram extraídos em média 8,18% de lipídeos, seguido da extração pelo método de Bligh & Dyer (6,44%), *J:Schmid-Bondzynski-Ratzlaff* (3,57%) e extração básica seguida de saponificação (3,44%). Para os extratos de etanol e Bligh & Dyer a quantidade de componentes graxos obtida foi de 44,74 e 50,96% em relação a quantidade total de material extraído, enquanto nos extratos de *J:Schmid-Bondzynski-Ratzlaff* e saponificação foram de 72 e 76%, respectivamente.

Palavras-chave: Caracterização. Proteínas. Carboidratos. Cinzas. Lipídeos. Microalga.

ABSTRACT

Fossil fuels are mainly responsible for the emission of greenhouse gases and, from the 80's, grew or had interest in the development and production of biofuels. One of the selected options was to use microalgae for biodiesel production. The aim of this experiment is to characterize a *Scenedesmus* sp microalgae biomass in terms of protein, carbohydrate, lipid and ash content, and to identify the main lipid classes present in the different fractions. It has justification or fact that global biomass production is 50% aquatic and 50% terrestrial, as an emerging alternative for the use of compounds used in food. It aims to enhance the microalgae *Scenedesmus* sp. (aquatic biomass) to characterize as a possible source of proteins, lipids and carbohydrates. Methodologically, use the Kjeldahl method to determine the content of substances whose value was totaled 33.18%, already with total carbohydrates, quantified by biomass acid hydrolysis and, by high resolution chemical chromatography, in which used in a total carbohydrate content of 40.74% and of these, the most present was glucose. Determining or ash content has a studied biomass, where it has a result of 10.69%. The influence on lipid content was evaluated in different solvent extractors: Bligh & Dyer, Ethanol, Saponification and J. Schmid-Bondzynski-Ratzlaff. The major lipid classes present in the extra fractions identified using thin layer chromatography (CCD) and quantified or theoretical content of fatty and non-fatty compounds in lipid extracts. The best result of this experiment was used using ethanol as a solvent extractor, where an average of 8.18% lipids were extracted, followed by extraction by the Bligh & Dyer method (6.44%), J: Schmid-Bondzynski. - Ratzlaf (3.57%) and basic extraction followed by saponification (3.44%). For ethanol and Bligh & Dyer extracts, the amount of fatty components was 44.74 and 50.96% in relation to the total amount of material extracted, while in J: Schmid-Bondzynski-Ratzlaff and saponification extracts were 72 and 76%, respectively.

Keywords: Characterization. Proteins. Carbohydrates. Ashes. Lipids. Microalgae.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Foto em microscópio da microalga <i>Scenedesmus sp.</i>	17
Figura 2 -	Lagoa tipo raceway para produção de <i>Spirulina</i> , Earthrise Nutritionals, LLC, Califórnia.....	18
Figura 3 -	Fotobiorreator tubular.....	19
Figura 4 -	Estrutura química de alguns aminoácidos.....	20
Figura 5 -	Estruturas químicas presentes nos carboidratos de microalgas.....	23
Figura 6 -	Classificação lipídica das microalgas.....	25
Figura 7 -	Estruturas químicas presentes nos lipídeos de microalgas.....	26
Figura 8 -	Etapas do cultivo até extração de lipídeos das microalgas e suas possíveis aplicações.....	30
Figura 9 -	Diagrama representativo dos principais componentes da biomassa de <i>Scenedesmus sp.</i> quantificados.....	31
Figura 10 -	Exemplo de marcação da placa TLC 10X10 cm.....	37
Figura 11 -	Composição de carboidratos (di e monossacarídeos presentes na fração de carboidratos) da biomassa de <i>Scenedesmus sp.</i>	40
Figura 12 -	Separação componentes presentes nos extratos lipídicos por cromatografia em camada delgada. Linhas: A – Extrato lipídico- Etanol- B- Extrato lipídico- Bligh & Dyer- C- Extrato lipídico- J:Schmid-Bondzynski-Ratzlaff.; D- Saponificação Componentes Lipídicos (de cima para baixo): 1-Carotenos; 2- éster de esteroide; 3- Éster graxo; 4- Trioleína; 5- Ácido graxo; 6- Diglicerídeos; 7,8 e 9- Pigmentos; 10- Compostos Polares.....	46
Figura 13 -	Cromatograma do extrato lipídico de Etanol.....	46
Figura 14 -	Cromatograma do extrato lipídico de Bligh & Dyer.....	47
Figura 15 -	Cromatograma do extrato lipídico de J:Schmid-Bondzynski-Ratzlaff.....	47
Figura 16 -	Cromatograma do extrato lipídico de saponificação.....	47

Figura 17 -	Componentes graxos presentes nos extratos lipídicos.....	48
Figura 18 -	Placa de cromatografia em camada delgada dos extratos lipídicos sem revelação no Iodo. Extratos Lipídicos: (A) Etanol, (B) Bligh & Dyer, (B) Etanol, (C) J:Schmid-Bondzynski-Ratzlaff e (D) Saponificação.....	48
Figura 19 -	Teor de clorofilas nos extratos lipídicos.....	49
Figura 20 -	Composição de componentes polares e ácidos graxos nos extratos lipídicos.....	50
Figura 21 -	Relação de material graxo X material insaponificável nos extratos lipídicos.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição bioquímica de algumas microalgas tendo como base a biomassa seca.....	12
Tabela 2 -	Comparação entre a composição proteica de alimentos convencionais e de diferentes biomassas de microalgas (% massa seca).....	21
Tabela 3 -	Produtividade em etanol de diferentes matérias-primas (os valores para microalgas são calculados a partir do teor em açúcar).....	24
Tabela 4 -	Quantificação de lipídeos na biomassa seca de <i>Scenedesmus</i> sp.....	43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	JUSTIFICATIVA.....	14
1.2	OBJETIVOS.....	14
1.2.1	Objetivo Geral.....	14
1.2.2	Objetivos Específicos.....	14
2	MICROALGAS	16
2.1	COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DAS MICROALGAS	19
2.1.1	Proteínas.....	20
2.1.2	Carboidratos.....	22
2.1.3	Cinzas.....	25
2.1.4	Lipídeos de microalgas.....	25
2.1	Extração de lipídeos.....	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	MICROALGA SCENEDESMUS SP.....	31
3.2	QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	32
3.3	QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE CARBOIDRATOS TOTAIS.....	32
3.4	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS.....	33
3.5	EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS.....	34
3.5.1	Bligh & Dyer.....	34
3.5.2	Etanol.....	34
3.5.3	Tratamento químico ácido - J: Schmid-Bondzynski-Ratzlaff.....	35
3.5.4	Tratamento químico básico: Saponificação.....	36
3.6	IDENTIFICAÇÃO DAS CLASSES LIPÍDICAS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS.....	39
4.2	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CARBOIDRATOS.....	40
4.3	QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE CINZAS.....	42
4.4	QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE LIPÍDEOS.....	42

4.5	IDENTIFICAÇÃO DAS CLASSES LIPÍDICAS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	45
5	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos aquáticos, que crescem em ambientes de águas doce e salgada. Podem usar diferentes metabolismos energéticos para manutenção de suas estruturas, como fotossíntese, respiração e fixação/assimilação de nitrogênio e CO₂, o que torna algumas espécies organismos únicos, com amplo espectro de aplicação tecnológica (PEREIRA et al., 2012).

Conforme relatado por Chisti (2007) e Rodolfi et al. (2009), as microalgas apresentam algumas vantagens sobre as vegetais superiores como a elevada produtividade de óleo por hectare/ano, uso de águas não apropriadas para agricultura convencional juntamente com a possibilidade de combinar o cultivo de microalgas à biorremediação de águas contaminadas e o intenso sequestro de CO₂. Estima-se que uma quantidade de 1,83 toneladas de CO₂ seja absorvida por cada tonelada de biomassa seca gerada desses microrganismos (PATIL; HONAGUNTIKAR, 2014).

Uma das características relevantes das microalgas é a capacidade destes microrganismos transformarem o dióxido de carbono presente na atmosfera e a luz solar em várias formas de energia, pelo processo de fotossíntese, produzindo polissacarídeos, proteínas, lipídeos e hidrocarbonetos (CHISTI, 2007). Conforme relatado por Becker (2004), há décadas as microalgas são empregadas na aquicultura para alimentação de diversos organismos de interesse econômico e atualmente, as microalgas passaram também a ser cultivadas comercialmente para outras aplicações.

Seu cultivo vem sendo desenvolvido para obtenção de compostos bioativos e medicinais, como os ácidos graxos poliinsaturados e carotenóides, que apresentam propriedades terapêuticas. Também são comercializadas como alimento natural ou suplemento alimentar e são encontradas formulações em pó, tabletes, cápsulas ou extratos. São também incorporadas em massas, petiscos, doces, bebidas etc., tanto como suplemento nutricional quanto como corantes naturais. A valorização da biomassa de microalgas tem sido relatada na literatura como uma das mais promissoras fontes para obtenção de diferentes produtos de interesse industrial como lipídeos, ácidos graxos, carotenóides, proteínas.

A análise bioquímica dos componentes da biomassa de microalgas como o teor de lipídeos, proteínas, carboidratos bem como análise centesimal geram importantes informações a cerca dos principais componentes dessa matéria-prima. A determinação

da composição química da matéria-prima é um parâmetro crítico, pois define a quantidade de energia contida na biomassa e demonstra a presença de componentes inorgânicos que influenciam na composição das cinzas.

Na **Tabela 1** estão apresentadas as composições químicas das principais microalgas comercialmente disponíveis, o teor de óleo encontrado em algumas microalgas pode ultrapassar 50% do peso de massa seca e pode alcançar até 64,4% de lipídeos (AMIN, 2009). Estes organismos podem apresentar variadas proporções de proteínas, lipídeos e carboidratos sendo essas proporções fortemente dependentes da espécie e forma de cultivo.

Tabela 1 - Composição bioquímica de algumas microalgas tendo como base a biomassa seca (%)

Microalga	Proteínas	Carboidratos	Lipídeos totais
<i>Anabaena Cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	62	23	3
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	41-18	14-20
<i>Porphyridum cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Spirogyra</i> sp.	46-63	33-64	11-21
<i>Arthrospira platensis</i>	63	8-14	11

Fonte: Adaptado de BECKER (2006).

Conforme observado por Simopoulos (2002), tem sido dada uma grande importância as fontes de ácidos graxos poliinsaturados, especialmente àqueles da família Ômega – 3, devido a sua reconhecida significância terapêutica. Recentemente, surgiu maior interesse em pesquisas na área de cultivo de microalgas para produção de biocombustíveis, principalmente o biodiesel. Dentre os fatores importantes e motivadores para as atividades de pesquisa e desenvolvimento destacam-se a diminuição das fontes de combustíveis fósseis, matérias-primas alternativas para

diversificação da matriz energética para produção de biocombustíveis e com os possíveis impactos das emissões de CO₂ no clima do planeta (ALABI et al., 2009).

Os carboidratos estão presentes nas células de microalgas desempenhando diversas funções. Pode-se destacar a função estrutural, na parede celular, e de reserva, na forma de amido. A composição da parede celular externa das microalgas varia entre espécies, contendo geralmente polissacarídeos específicos, como pectina e ágar. A parede interna é composta principalmente por celulose e outros compostos, como hemicelulose. O amido é o principal polissacarídeo de reserva e, juntamente com os carboidratos da parede celular, podem ser hidrolisados a monossacarídeos para subsequente fermentação e produção de bioetanol (CHEN et al., 2013). A aplicação destes carboidratos que mais tem sido estudada é para a produção de bioetanol de terceira geração, quando se selecionam espécies de microalgas com habilidade de produzir altas concentrações de carboidratos (MUSSATTO et al., 2010).

De acordo com os pesquisadores Becker (2007) e Koyande et al. (2019), a biomassa algacea mostra quantidades promissoras para a utilização como uma possível fonte de proteínas. A qualidade média da maioria das algas examinadas é igual e muitas vezes até superior em comparação com proteínas de plantas convencionais (BECKER, 2006). Conforme observado por Becker (1994), as microalgas apresentam elevados teores de proteínas quando comparadas com fontes convencionais, como soja, leite e carne. Enquanto a carne apresenta um percentual de 43%, a soja 37% e o leite 26%, algumas microalgas como a *Scenedesmus Obliquus*, apresenta um teor de proteínas entre 50 – 56%, a *Synechococcus sp*, 63% e a *Chlorella vulgaris*, 51 – 58%. As proteínas são compostas por diferentes aminoácidos e conseqüentemente, a qualidade nutricional de uma proteína é determinada basicamente pelo conteúdo, proporção e disponibilidade de seus aminoácidos (SPOLAORE et al., 2006).

Neste trabalho, a partir da biomassa da microalga *Scenedesmus sp.*, foi realizada a caracterização do teor de cinzas, proteínas, carboidratos e lipídeos presentes na biomassa. Os principais monossacarídeos presentes nessa fração foram identificados por HPLC e as classes que compõem os extratos lipídicos também foram identificadas por cromatografia em camada delgada. Devido à sua biodiversidade e a seus processos metabólicos particulares as microalgas possuem enorme potencial como fonte alternativa de recursos alimentícios, nutracêuticos e energéticos.

1.1 JUSTIFICATIVA

Estima-se que a produção primária global de biomassa seja 50% aquática e 50% terrestre, como uma alternativa emergente, para obtenção de compostos destinados a alimentação, este trabalho visou a valorização da microalga *Scenedesmus* sp. (biomassa aquática) para caracterização como possível fonte de proteínas, lipídeos e carboidratos.

Até hoje as políticas de governo tem focado quase que exclusivamente no uso de biomassa terrestre, dando pouca atenção às culturas aquáticas. Além do uso das microalgas destinadas para obtenção de compostos de valor agregado, a produção de biocombustíveis, em especial o biodiesel, a partir das microalgas tem sido apontadas como um dos principais gargalos tecnológicos para aumentar a diversificação de matérias primas para produção desse combustível.

1.2 OBJETIVOS

Nesta seção serão apresentados o objetivo geral e os objetivos específicos. Eles servirão de auxílio para a análise e o desenvolvimento desse estudo.

1.2.1 Objetivo Geral

- Caracterizar a biomassa da microalga *Scenedesmus* sp quanto ao teor de proteínas, carboidratos, lipídeos e cinzas, e identificar as principais classes lipídicas presentes nas diferentes frações.

1.2.2 Objetivo Específico

- Determinar o teor de proteínas totais pelo método de Kjeldahl;
- Quantificar o teor de carboidratos totais, mediante a hidrólise ácida da biomassa;
- Identificação e quantificação dos monossacarídeos presentes na biomassa via cromatografia líquida de alta resolução (HPLC);
- Avaliar a influência no teor dos lipídeos sob ação de diferentes solventes extratores: Bligh & Dyer, Etanol, Saponificação e *J- Schmid-Bondzynski-Ratzlaff*;

- Identificar as principais classes lipídicas presentes nas frações extraídas, utilizando cromatografia em camada delgada (CCD);
- Quantificar o teor de compostos graxos e não-graxos nos extratos lipídicos;
- Determinar o teor de cinzas presente na biomassa.

2 MICROALGAS

Microalgas são microrganismos de um grupo muito heterogêneo, aquáticos, microscópicos unicelulares, procariontes ou eucariontes, que podem formar colônias, são dotadas de pigmentos (clorofila, astaxantina, caroteno, luteína), responsáveis por coloração variada e podem ser encontradas em corpos aquáticos em todo o globo terrestre (VAN DER LAAK; RAVEN; VERBONG, 2007).

As microalgas podem ser classificadas segundo a maneira pela qual se dá o seu metabolismo, utilizando fontes orgânicas ou inorgânicas de carbono com ou sem a presença de luz. São quatro os tipos de metabolismo possíveis em microalgas: fotoautotrófico, heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004).

Segundo Meng et al. (2009), as microalgas são os organismos fotossintetizantes mais eficazes no processo de conversão da energia luminosa em energia química. Esta propriedade vem ganhando destaque pelos benefícios gerados ao meio ambiente, pois as microalgas utilizam o CO₂ como nutriente. A fixação de CO₂ por parte das microalgas contribui de forma significativa no ciclo global do carbono, pois o CO₂ produzido pela atividade humana pode ser consumido em parte pelas microalgas convertendo-o em biomassa e outros produtos metabólicos por meio da fotossíntese (HO et al., 2011). Conforme Cohen et al. (1986), a produção de microalgas pode ser justificada por apresentar diversas vantagens, dentre as quais pode-se destacar:

- a) Não requererem terras aráveis, podendo ser cultivada em região desértica e em solo degradado, uma vez que a demanda por terra é utilizada apenas como suporte para o sistema de cultivo;
- b) Embora cresçam em meio aquoso, consomem menos água do que plantas terrestres e a água residual podem ser reutilizadas no processo, reduzindo o consumo global de água doce;
- c) Não competem com a produção de alimentos;
- d) Sua produção pode ser realizada durante todo o ano, não seguindo o regime de safras;
- e) Apresentam alta produtividade em biomassa e rápido acúmulo de lipídeos, de 10 a 50% da massa seca de muitas espécies;

- f) As microalgas podem ser utilizadas para o tratamento de efluentes contaminados com NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^- , no qual utilizam esses nutrientes para o crescimento;
- g) São eficientes fixadoras de carbono atmosférico, ou mesmo o residual de processos industriais, através da fotossíntese;
- h) Podem produzir uma série de outros produtos valiosos além de lipídeos, tais como proteínas, carotenóides e carboidratos, que podem ser utilizados como alimento ou fertilizantes, fermentados para produzir etanol ou outro produto com maior valor agregado.

A *Scenedesmus* sp., representada na **Figura 1**, é uma microalga dominante em lagos e rios de água doce (KIM et al. 2007). Segundo Chaichalerm et al. (2012), estas microalgas são pequenas e não móveis, com colônias constituídas por células alinhadas em uma placa plana. E estas são compostas de 2 a 4 células.

Figura 1 – Foto em microscópio da microalga *Scenedesmus* sp.



Fonte: Řezanka et al. (2004).

Existem dois tipos de sistemas de cultivo usados para produção em larga escala de biomassa de microalgas, os sistemas abertos e os sistemas fechados. Segundo Borowitzka (1999), lagoas tipo Raceway, representada na **Figura 2**, são as mais utilizadas comercialmente. Os sistemas abertos se compõem de um circuito de canais por onde circula o cultivo e a mistura mediante uma roda de paletas que mantêm homogêneos os nutrientes e os microrganismos. O fluxo é guiado ao redor do sistema

por defletores dispostos nos canais (BOROWITZKA, 1999). Normalmente são construídas de concreto, mas existem muitos casos de lagoas raceway cavadas no solo e cobertas com um plástico branco.

Segundo Pérez (2007), um problema presente no cultivo de microalgas em lagoas abertas em relação ao uso de fotobiorreatores, está no fato de que as espécies com conteúdo mais elevado de óleo são as que se reproduzem mais lentamente. Sendo assim, facilmente ocorre a contaminação por espécies de microalgas e bactérias indesejáveis. Contudo, segundo Oilgae (2012) os lagos de cultivo aberto apresentam algumas vantagens: não competem por terra agricultável e podem ser construídos em terras com produção marginal, requerem menos gastos para manutenção, operação e limpeza e podem retornar um balanço energético favorável. É por isso que este tipo de sistema é geralmente encarado como a base para o cultivo de microalgas em larga escala para a produção de biodiesel, embora estejam ainda a serem otimizadas as condições para cultura das espécies chave para a produção de biodiesel.

Figura 2 – Lagoa tipo raceway para produção de *Spirulina*, Earthrise Nutritionals, LLC, Califórnia



Fonte: Kochem (2010).

A produção de microalgas baseada na tecnologia de fotobiorreator fechado é projetada para superar alguns dos principais problemas associados com os sistemas de produção abertos. Por exemplo, os riscos contaminação com sistemas abertos, na maioria das vezes, impedem seu uso para a preparação de produtos de alto valor para uso na indústria farmacêutica e de cosméticos. Além disso, ao contrário da produção em

sistemas abertos, os fotobiorreatores permitem a cultura de espécies únicas de microalgas por períodos prolongados com menor risco de contaminação. No entanto, na atualidade este tipo de sistema possui um alto custo operacional, sendo utilizado apenas para produzir produtos de alto valor agregado (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Os fotobiorreatores, representados na **Figura 3**, consistem em uma série de tubos de vidro ou plástico. Este arranjo de tubos é acoplado a uma coluna de desgaseificação e uma bomba de recirculação, formando um sistema totalmente fechado (CHISTI, 2007).

Figura 3 – Fotobiorreator tubular



Fonte: Greenwell et al. (2010).

2.1 COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DAS MICROALGAS

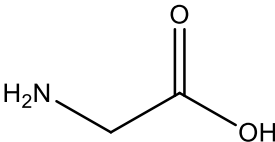
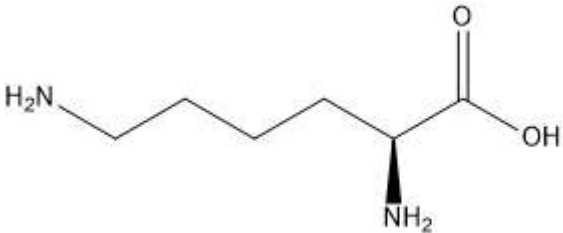
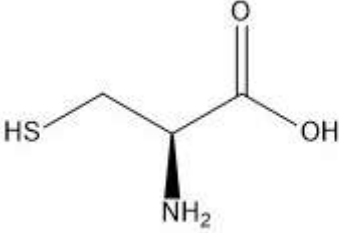
Segundo a literatura, em geral, as microalgas possuem composição química contendo 6 a 52% de proteínas, 5 a 23% de carboidratos e 7 a 23% de lipídeos, podendo haver variação neste conteúdo em função de gênero, espécie e devido às variações nas condições de cultivo para uma mesma espécie. No entanto, os estudos relacionados aos cultivos de diversas espécies de microalgas, comprovam que a disponibilidade de nutrientes, temperatura, pH e a intensidade de luz podem afetar a composição centesimal da microalga cultivada, bem como o conteúdo proteico pode mudar drasticamente ao longo de seu ciclo de vida (LUPPATINI, 2016).

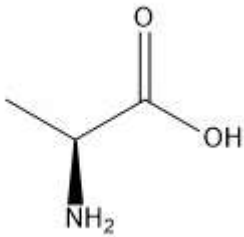
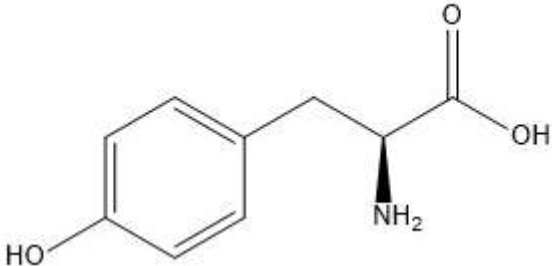
2.1.1 Proteínas

Proteínas são poliamidas de alto peso molecular, sempre compostas por carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio. Podendo ter a presença de outros compostos como enxofre e mais raramente iodo, ferro e fósforo. Proteínas são formadas por uma ou mais cadeias de polipeptídeos. Polipeptídeos são cadeias longas de aminoácidos, que estão ligados entre si através de ligações peptídicas (ligação covalente entre C – N) (SOLOMONS; FRYHLE, 2002).

Aminoácidos são substâncias que apresentam em sua estrutura dois grupos funcionais diferentes, uma carboxila e um grupo amina. Existem 20 aminoácidos que são encontrados nas proteínas, na **Figura 4** abaixo estão exemplificadas as estruturas de alguns aminoácidos. No entanto, muitos animais superiores não possuem a capacidade de sintetizar todos os aminoácidos. Assim, estes animais precisam de certos aminoácidos, os quais são chamados de aminoácidos essenciais, como parte de suas dietas (SOLOMONS; FRYHLE, 2002).

Figura 4 – Estrutura química de alguns aminoácidos

Nome	Estrutura
Glicina	
Lisina	
Cisteína	

Alanina	
Tirosina	

Fonte: Solomons e Fryhle (2002).

A indústria global de alimentos vem explorando amplamente a utilização das microalgas como fonte promissora para novos alimentos quanto para produtos alimentares funcionais. Segundo Becker (1994), nota-se que a alta quantidade de proteínas presentes nas microalgas as torna competitivas quando comparadas com fontes de proteínas convencionais, como pode ser observado na **Tabela 2** abaixo:

Tabela 2 – Comparação entre a composição proteica de alimentos convencionais e de diferentes biomassas de microalgas (% massa seca)

Amostra	Proteína
Carne	43
Leite	26
Arroz	8
Chlorella Vulgaris	51 – 58
Anabaena cylindrica	43 -- 56
Chlamydomonas reinhardtii	48
Porphyridium cruentum	28 - 39
Spirulina máxima	60 – 71
Synechococcus sp	63
Scenedesmus obliquus	50 - 56

Fonte: Adaptado de Becker (1994)

A determinação da concentração de proteínas algais é baseada em estimativas da chamada proteína bruta. Este valor é obtido pela hidrólise da biomassa de algas e estimativa do nitrogênio total (BECKER, 2007).

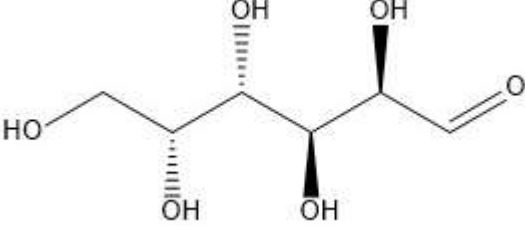
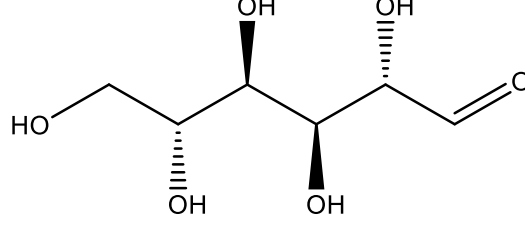
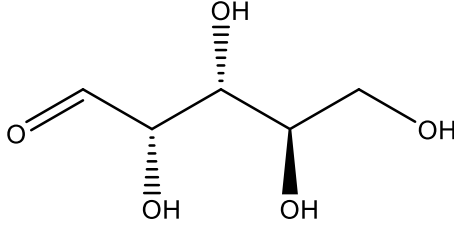
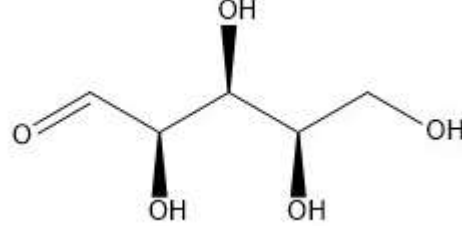
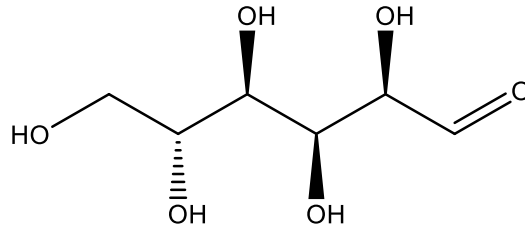
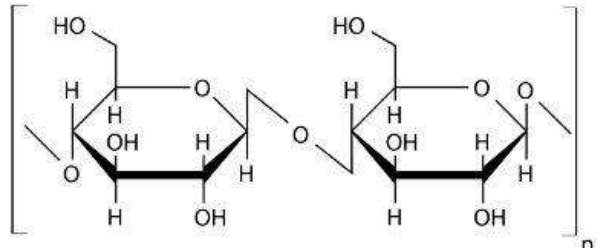
2.1.2 Carboidratos

Conforme observado por Chen et al. (2013), os carboidratos estão presentes nas células de microalgas desempenhando diversas funções. Pode-se destacar a função estrutural, na parede celular, e de reserva, na forma de amido. A composição da parede celular externa das microalgas varia entre espécies, contendo geralmente polissacarídeos específicos, como pectina, ágar e alginato. A parede interna é composta principalmente por celulose e outros compostos, como hemicelulose. O amido é o principal polissacarídeo de reserva e, juntamente com os carboidratos da parede celular, podem ser hidrolisados a monossacarídeos para subsequente fermentação.

A celulose é um polissacarídeo formado por monômeros de glicose, que se unem através de ligações do tipo β -1,4-glicosídicas. Diferentemente da celulose, a hemicelulose é um polissacarídeo ramificado que pode ser formado por um único tipo ou por dois ou mais tipos diferentes de monossacarídeos. Os principais monossacarídeos constituintes da hemicelulose são as pentoses xilose, arabinose, galactose e manose (OGEDA; PETRI, 2010). O tipo de monossacarídeo que constitui a hemicelulose irá depender da genética de cada espécie de microalga, assim como acontece nas biomassas terrestre, e das condições de cultivo (PEREIRA et al. 2012).

O amido, armazenado por algas verdes, consiste em um polímero insolúvel e de cadeia longa, apresentando entre 10^5 e 10^6 unidades de glicose. Na **Figura 5** abaixo estão representados alguns polissacarídeos e seus monossacarídeos presentes nas microalgas. A biomassa de microalgas difere da biomassa terrestre celulósica na medida em que a composição estrutural carece de lignina e contém maiores níveis de proteína e lipídeos. A ausência de lignina em microalgas torna o processo de lise celular menos complexo que em células vegetais, e, portanto, mais facilitado (MARTÍN-JUÁREZ et al., 2017).

Figura 5 – Estruturas químicas presentes nos carboidratos de microalgas

Nome	Estrutura
Galactose	
Manose	
Arabinose	
Xilose	
Glicose	
Celulose	

Fonte: Solomons e Fryhle (2002).

Os carboidratos presentes nas microalgas já são utilizados em diversas aplicações valorizando a biomassa algácea, entre estas aplicações, pode-se citar: ágar, utilizado para preparo de meios de cultura para crescimento de microrganismos e é utilizado na indústria alimentícia como agente espessante; a pectina tem grande aplicabilidade na indústria alimentícia, como agente geleificante; o alginato é utilizado como agente estabilizante, espessante ou emulsificante nas indústrias de alimentos, cosméticos, papel e corante e no campo médico são utilizados como materiais de impressão dentária (HAHN et al., 2007).

Com relação aos monossacarídeos que compõe a hemicelulose ainda estão sendo estudadas aplicações para obtenção de compostos químicos renováveis de alto valor agregado, visto que alguns, como a xilose, que é uma pentose, vide **Figura 5** acima é uma pentose, ainda não pode ser fermentada a etanol (HAHN et al., 2007).

A aplicação para as moléculas de glicose, que são componentes da celulose e amido, que mais tem sido estudada é para a produção de bioetanol de terceira geração, visto que à semelhança do que se sucede com o potencial para produção de biodiesel, as elevadas produtividades destes microrganismos e a capacidade de algumas espécies acumularem elevados teores de açúcares, torna este tipo de biomassa muito apelativa para servir como matéria-prima para produção de bioetanol quando comparada com fontes convencionais, como se pode observar na **Tabela 3** abaixo (MUSSATTO et al., 2010).

Tabela 3 – Produtividade em etanol de diferentes matérias-primas (os valores para microalgas são calculados a partir do teor em açúcar)

Matéria-prima	Produtividade em etanol (L/ha)
Trigo	2590
Mandioca	3310
Sorgo sacarino	3050 – 4070
Milho	3460 – 4020
Beterraba sacarina	5010 – 6680
Cana de açúcar	6190 – 7500
Microalgas	46 760 – 140 290

Fonte: Adaptado de Mussato et al. (2010).

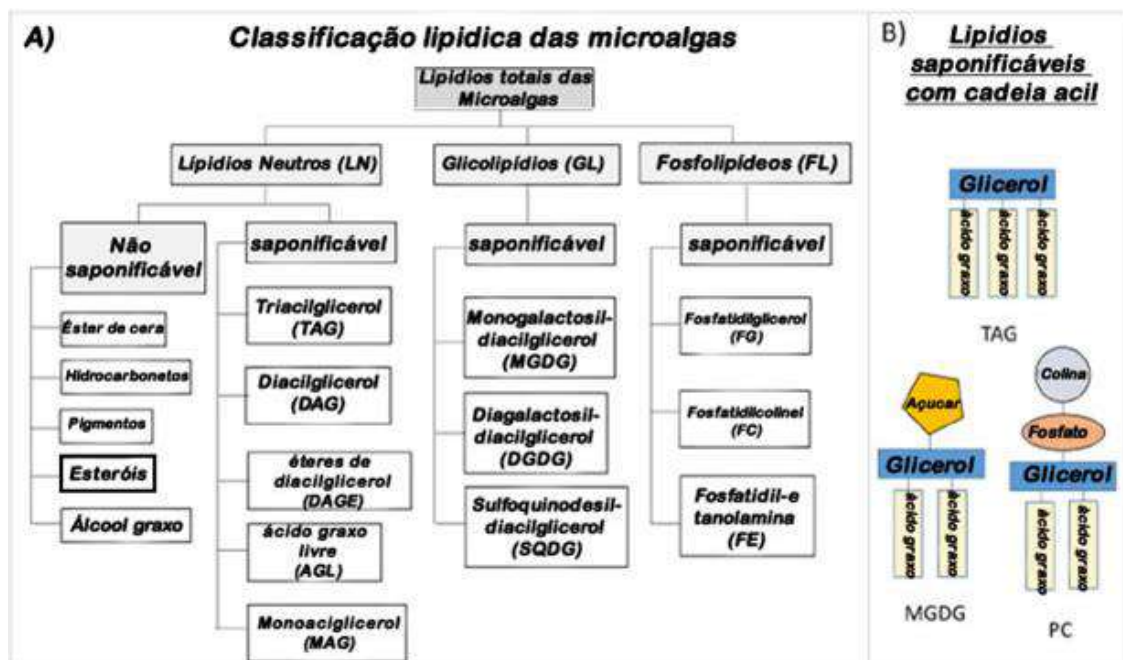
2.1.3 Cinzas

O teor de cinzas das microalgas está relacionado com a espécie de microalga cultivada, tipo de água utilizada para o cultivo, teor de nutrientes não consumidos que são disponibilizados nos meios de cultura ou com o tipo de sistema de cultivo (PEREIRA et. al 2017). O teor de cinzas de uma microalga pode afetar diretamente na qualidade da matéria-prima e suas várias aplicações bem como os processos de purificação e de controle de qualidade do produto (BI; HE, 2012; ROOSTAEI et al., 2018). O teor de cinzas nas microalgas vem sendo apontados na literatura como um dos principais desafios para produção de microalgas em fotobiorreatores abertos (LIU, 2017).

2.1.4 Lipídeos de microalgas

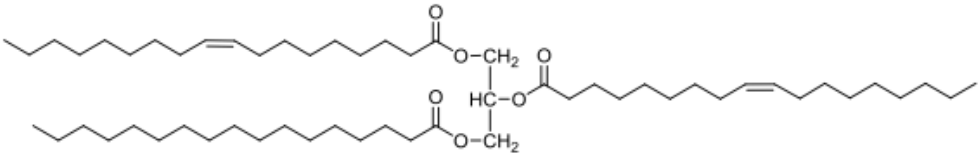
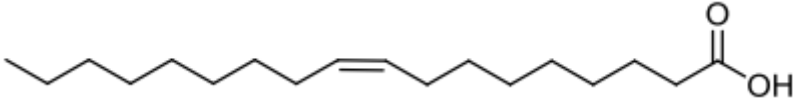
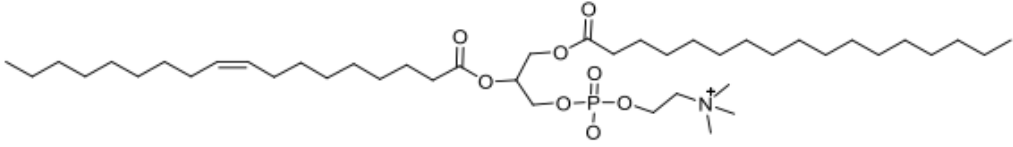
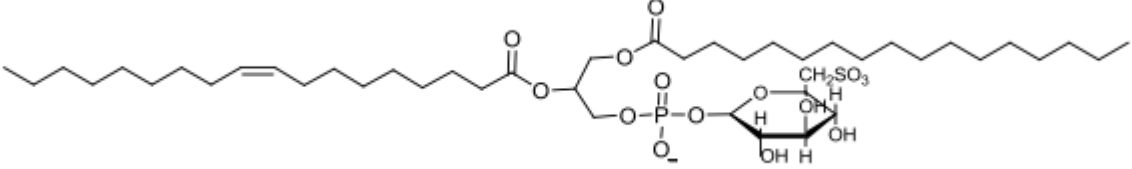
Na figura 6 abaixo estão representadas as diferentes classes lipídicas encontradas nas microalgas.

Figura 6 - Classificação lipídica das microalgas



Fonte: Nelson e Cox (2014)

Figura 7 - Estruturas químicas presentes nos lipídeos de microalgas

Nome	Estrutura
Triglicerídeo	
Ácido graxo	
Fosfolípídeo	
Glicolípídeo	

Fonte: Viegas (2010).

Os lipídeos caracterizam um conjunto de substâncias químicas que, ao contrário das outras classes de compostos orgânicos, não são caracterizadas por algum grupo funcional comum, e sim pela sua alta solubilidade em solventes orgânicos e baixa solubilidade em água (SOLOMONS; FRYHLE, 2005). Os lipídeos são tipicamente compostos por triacilgliceróis, glicolípídeos, fosfolípídeos, lipoproteínas e ácidos graxos contendo entre 12 e 22 carbonos, podendo ser saturados e poli-insaturados. Os lipídeos presentes na biomassa de microalgas são divididos em duas classes principais, com base

em suas características químicas: polares e neutros (também citados como simples, ou apolares).

O termo "lipídeos totais" é usado principalmente para fins de análise, além de acilgliceróis, os lipídeos brutos obtidos a partir de microalgas frequentemente contêm ácidos graxos livres, hidrocarbonetos, cetonas, esteróis, carotenóides e clorofilas. Os acilgliceróis são compostos de ésteres de ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol que atua como esqueleto e são categorizados como mono-, di- e triglicerídeos, de acordo com o número de ácidos graxos ligados ao glicerol. Os ácidos graxos de microalgas variam fundamentalmente de 12 a 24 carbonos de comprimento e podem ser saturados, monoinsaturados ou poliinsaturados (HALIM et al., 2011).

Os lipídeos neutros são os que não contêm grupos carregados, incluem tri-, di- e mono- glicerídeos, ceras e isoprenóides (por exemplo, carotenoides). Sendo triacilgliceróis, geralmente considerados como produto de estocagem. Na **Figura 7** acima podem ser vistas algumas estruturas químicas encontradas nos lipídeos presentes nas microalgas.

Devido à ampla variedade de compostos presentes nesses extratos, deve ser realizada uma distinção entre lipídios saponificáveis e insaponificáveis. Moléculas saponificáveis são as que incluem pelo menos uma cadeia graxa em sua estrutura, que podem ser convertidas em sabão a partir do processo de saponificação e posteriormente em ácido graxo. Lipídeos insaponificáveis são todos os remanescentes que não contêm uma cadeia de acila e, portanto, não podem ser convertidos em sabão. Alguns exemplos de lipídeos insaponificáveis são ésteres de cera, pigmentos (clorofilas, carotenos, etc.), esteróis e hidrocarbonetos. Por esse motivo, o extrato lipídico bruto obtido a partir de microalgas é muitas vezes sujeito a mais de uma etapa de fracionamento antes de ser transesterificado. A detecção, identificação e quantificação precisa dos compostos lipídicos são pré-requisitos para verificar o potencial de cada espécie de microalgas na produção de compostos alvo.

As microalgas são uma fonte promissora para produção de biodiesel devido ao seu rendimento de óleo, este rendimento pode variar de 20 a 50%. Foram relatados valores de 44,7% para *Chlorella sorokiniana*, *Porphyridium cruentum* 34,8% e valores entre 40,8 – 53,9% para *Scenedesmus sp* (CHISTI, 2007).

2.2 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS

A extração de lipídeos é uma das etapas mais importantes para obtenção dos ácidos graxos poliinsaturados e para produção dos biocombustíveis renováveis. Após o término do período estimado para o cultivo das microalgas ocorre a concentração da biomassa (por floculação, por exemplo), através da colheita e desidratação, a extração lipídica é realizada a partir do pó de biomassa seca ou diretamente do concentrado úmido. Em ambas as rotas que utilizam a biomassa seca ou úmida, os solventes desempenham um papel fundamental, e a extração lipídica das microalgas é essencialmente baseada em solventes. Os solventes são usados diretamente ou assistidos por rompimento celular (por métodos mecânicos, químicos ou biológicos) para aumentar a eficiência da extração lipídica (**Figura 8**) (DESHMUKH; KUMAR; BALA, 2019).

Portanto, no presente trabalho, serão apresentados os principais métodos de extração aliados ou não a um pré tratamento da biomassa de microalgas. Os métodos de pré-tratamento como extração por solventes, soxhlet, ultrassom, homogeneização de alta pressão, fluido supercrítico, enzimática e o uso de ácido/base discutidos nesta revisão bibliográfica.

O conceito de química de "igual dissolve igual" é o princípio básico por trás da extração lipídica de microalgas usando solventes. Um solvente ideal requer altos níveis de especificidade para lipídeos, especialmente acilgliceróis e o solvente deve ser volátil o suficiente para garantir baixo consumo de energia na destilação usada para separar o lipídeo dos solventes. A extração de lipídeos de biomassa de algas pode usar solventes não polares, como hexano, benzeno, tolueno, éter dietílico, clorofórmio e solventes polares como o metanol, acetona, acetato de etilo e etanol. Obter informações sobre os solventes que serão utilizados é indispensável devido à diferença de polaridade de cada um, aspecto que influencia diretamente no rendimento de extração dos lipídeos de interesse (CARDOSO et al., 2014). Os solventes orgânicos são muitos utilizados para obtenção dos lipídeos, no entanto, devido a presença de uma parede celular rígida, outras técnicas de rompimento celular têm sido utilizadas para facilitar o processo de extração podem estar associados nessa etapa (ENAMALA et al., 2018).

O princípio por trás do método de extração por ultrassom é que a sonicação intensa do líquido gera ondas sonoras que se propagam no meio líquido e resulta em

ciclos alternados de alta e baixa pressão. Durante o ciclo de alta pressão, as pequenas bolhas de vácuo, que são produzidas no ciclo de baixa pressão, colapsam violentamente e resultam em um fenômeno chamado cavitação. Os jatos líquidos de alta pressão e alta velocidade formam forças de cisalhamento ao redor das células de algas durante a cavitação e quebram a estrutura celular mecanicamente e assim melhoram a transferência de material auxiliando a extração de lipídeos (ENAMALA et al., 2018).

Segundo o autor, uma frequência de 20 a 100 kHz é usada no ultrassom comum. Esta frequência pode ser usada para produzir alta pressão acústica ou cavitação acústica. Diferentes espécies de algas diferem em sua resistência à ruptura e tamanho da célula. Existem evidências, no entanto, de que a ruptura das células de microalgas pode melhorar a extração de lipídios por solvente, além de permitir a colheita de outros produtos intracelulares, como os carotenóides.

Neste sentido, vem sendo utilizado o método de homogeneização sob alta pressão, um método muito relevante para a indústria (LEE et al., 2010; ULLOA et al., 2012). A homogeneização sob alta pressão consiste em fazer passar suspensões de células, a alta pressão, através de um pequeno orifício que liga uma câmara com a pressão atmosférica. Pela súbita descompressão, as células se rompem (TREVAN et al., 1990). Dependendo do composto de interesse, um custo adicional é o de resfriamento, pois, a cada passagem pela válvula, a temperatura do meio sobe cerca de 2 °C para cada 10 MPa aplicados, o que poderia causar a decomposição de compostos termossensíveis (LAM; LEE; MOHAMED, 2012).

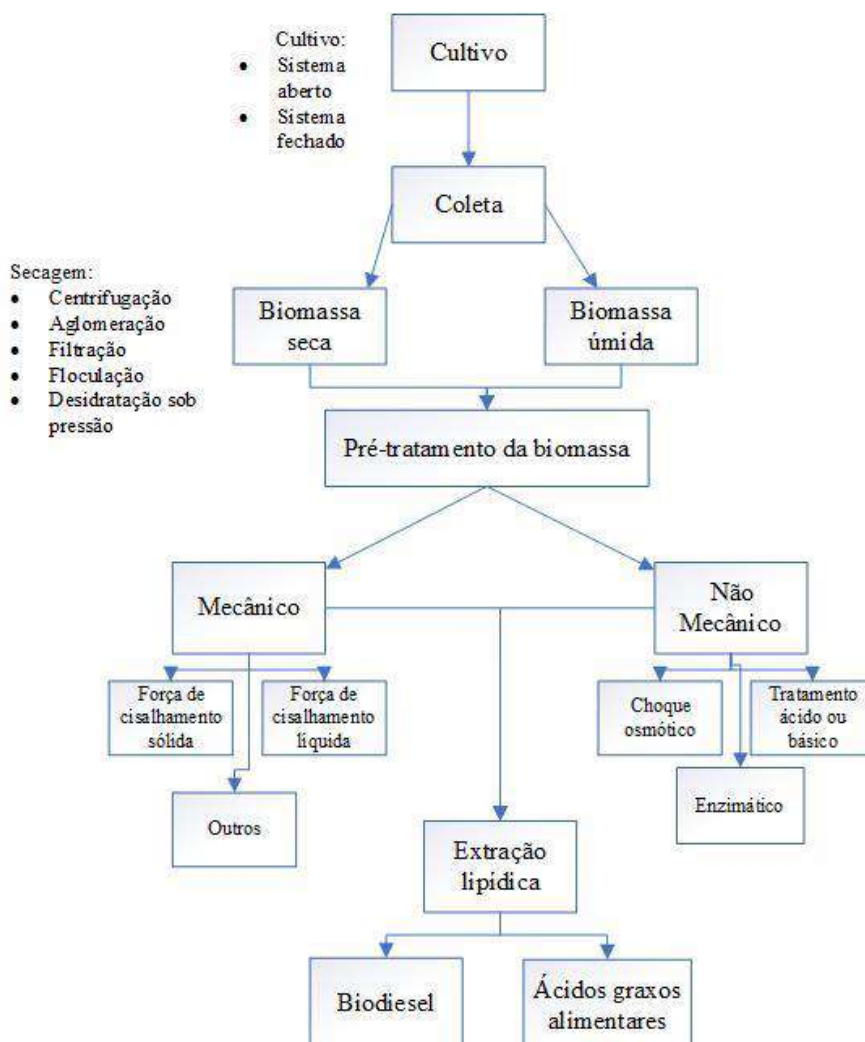
Segundo Enamala et al. (2018), a eficiência de extração supercrítica de CO₂ é afetada por quatro fatores principais: pressão, temperatura, vazão de CO₂ e tempo de extração. Esses fatores, juntamente com o uso de modificadores (mais comumente o etanol como co-solvente), podem ser alterados e ajustados para otimizar as extrações. Quando o etanol é usado como um co-solvente, a polaridade do solvente de extração (neste caso CO₂) é aumentada e a viscosidade do fluido é subsequentemente alterada.

O efeito resultante é um aumento no poder de solvência do CO₂, e a extração requer menor temperatura e pressão, tornando-a mais eficiente. De acordo com Mercer (2011), para tornar os métodos de extração lipídica existentes, viáveis em larga escala, algumas condições operacionais como temperatura, pressão e tempo de extração, precisam ser otimizados; (ii) efeitos sinérgicos de diferentes métodos combinados

precisam ser avaliados economicamente; (iii) o uso de solventes verdes emergentes; (iv) processamento da biomassa úmida para obtenção de produtos de baixo valor agregado, como biocombustível; e a (v) integração do processo *upstream X downstream* (MENEGAZZO, FONSECA, 2019).

Diante deste contexto, o método de extração de lipídeos da biomassa microalgal para este fim deve ser o mais específico e seletivo possível, a fim de minimizar a extração das frações não lipídicas e maximizar as frações desejadas. Atualmente nenhum método de extração é utilizado em larga escala e isso se apresenta como um dos principais obstáculos para extração do óleo a partir de microalgas.

Figura 8 - Etapas do cultivo até extração de lipídeos das microalgas e suas possíveis aplicações



Fonte: A autora.

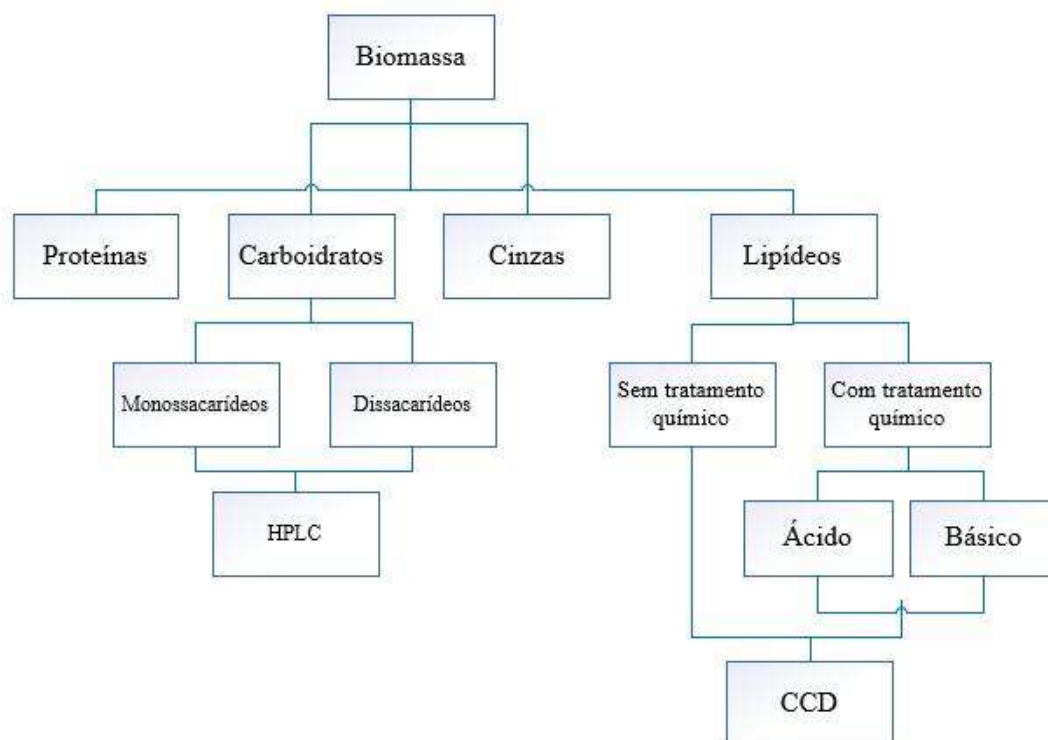
3 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão abordadas as diferentes técnicas utilizadas para caracterização da biomassa de *Scenedesmus sp.*

3.1 MICROALGA *SCENEDESMUS SP.*

As análises foram realizadas na biomassa da espécie *Scenedesmus sp.*, produzidas nos raceway da Unidade Piloto da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. As análises realizadas estão descritas na **Figura 09** abaixo, a qual representa os principais componentes que serão quantificados.

Figura 9 - Diagrama representativo dos principais componentes da biomassa de *Scenedesmus sp.* quantificados



Fonte: A autora.

3.2 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS TOTAIS

A análise de proteínas totais foi realizada pelo método de Kjeldahl clássico modificado (A.O.A.C., 1995). A análise foi iniciada com a digestão de 0,5 g da biomassa seca em ácido sulfúrico 0,05 M em frasco erlemeyer. A amostra foi recolhida em forma de amônia, com ácido bórico 0,033 M e, a seguir, titulou-se diretamente a solução de hidróxido de amônio com a solução de ácido sulfúrico 0,05M. Estes ensaios foram conduzidos no laboratório de tecnologia de alimentos da UFRJ, coordenado pela Profa. Ana Lúcia Vendramini. A análise foi realizada em triplicata.

O conteúdo de proteínas foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Quantidade de proteínas (\%)} = 100 \times 0,014 \times 6,25 \times (V_A - V_B) \times F \times N / P$$

Onde:

P – peso da amostra em gramas

V_A – volume de titulação de H_2SO_4 gasto

V_B – volume de reagente usado para titulação de H_2SO_4 em branco

F – fator de correção da solução de H_2SO_4

N – normalidade do H_2SO_4

6,25 é o fator de conversão de nitrogênio em proteína, 0,014g de nitrogênio é o fator para converter mols de nitrogênio em gramas

3.3 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE CARBOIDRATOS TOTAIS

O procedimento experimental da quantificação de carboidratos está detalhado abaixo e a análise foi elaborada em conjunto com o Laboratório de Bioetanol coordenado pela Profa. Elba P. S. Bon. É necessário que a amostra esteja seca para dar prosseguimento ao presente experimento. A análise foi realizada em triplicata.

Pesou-se $25 \pm 2,5$ mg de biomassa de alga em um tubo de vidro de 10 mL previamente marcado e tarado. Anotou-se o peso da amostra. A amostra foi adicionada 250 μ l de ácido sulfúrico a 72% (p/p) e agitou-se em vortex. Os tubos foram colocados em banho-maria a $30^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$, com nível de água acima do nível de amostra/ácido nos tubos, durante uma hora agitando-se cada tubo vigorosamente a cada 10 minutos. Após o período de uma hora as amostras foram retiradas do banho-maria e adicionou-se 7 mL

de água mili-Q para reduzir a concentração de ácido sulfúrico para 4% (p/p). As amostras seladas foram autoclavadas durante uma hora a 121°C usando a configuração de líquidos. Após a conclusão do ciclo da autoclave a mesma foi aberta e os tubos foram mantidos por 15 minutos no interior da mesma. Após as amostras serem removidas da autoclave as mesmas foram deixadas resfriando por uma hora.

Após as amostras atingirem a temperatura ambiente, as mesmas foram agitadas e retirou-se uma alíquota de 3 mL que foi colocada em um tubo falcon de 50 mL para neutralização com carbonato de cálcio até que atingissem um pH entre 6 e 8. A cada adição de carbonato de cálcio a amostra foi agitada em vortex. A amostra então neutralizada foi centrifugada durante 10 minutos. Após a centrifugação a amostra foi filtrada através de um filtro de nylon de 0,2 µm. O hidrolisado filtrado foi colocado em um eppendorf e depois acondicionado em frascos próprios para análise em HPLC.

Na análise por HPLC para quantificação dos monossacarídeos, foram utilizados padrões de: D(+) glicose, D(+) xilose, D(+) galactose, L(+) arabinose e D(+) manose. O volume de amostra utilizado foi de 50 mL, a fase móvel usada foi água 18,2 MegaOhm, 0,2 µm filtrada, utilizando uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min, a uma temperatura da coluna de 85°C e do detector de 55°C. O tempo de análise foi de 50 minutos.

3.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS

Para determinação do teor de cinzas foi utilizado calor de um forno mufla entre temperatura de 550 – 570 °C por 4 horas, onde ocorreu a queima da amostra destruindo totalmente a matéria orgânica e deixando somente os minerais presentes, sendo assim as cinzas de um material pode ser ponto de partida para análise de minerais específicos.

Neste experimento, foi pesado em balança analítica um cadinho de porcelana previamente calcinado em mufla a 550°C, até que fosse obtido peso constante. Pesou-se 1,00 g de amostra previamente homogeneizada no cadinho. O cadinho foi levado para mufla programada para aumentar a temperatura de 10°C por minuto, até ser alcançada a temperatura de 550°C. Após a temperatura ser alcançada, a amostra foi deixada na mufla por 240 minutos. Após este período, a mufla foi desligada e deixou-se esfriar até atingir aproximadamente 100°C, o cadinho foi então retirado da mufla e colocado em dessecador até atingir temperatura ambiente. Realizou-se novamente a pesagem de

cadinho + cinzas e a diferença obtida correspondeu a cinzas a 550°C. A análise foi realizada em triplicata.

3.5 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS

Nesta seção serão abordadas as diferentes técnicas utilizadas para extração dos lipídeos da biomassa de *Scenedesmus sp.*

3.5.1 Bligh & Dyer

A determinação do teor de lipídeos totais pelo método de Bligh & Dyer (clorofórmio:metanol 2:1) foi realizada seguindo o procedimento descrito abaixo. Os experimentos foram conduzidos em triplicatas e os rendimentos das extrações foram determinados em percentagem, em relação à massa seca. Os extratos obtidos foram avaliados por CCD (cromatografia em camada delgada) de acordo com o procedimento que será descrito abaixo no item 3.7 e comparados com os padrões lipídicos disponíveis.

Com o auxílio do programa Image Master Total Lab versão 1.11 foram estimadas as quantidades de cada um dos componentes/ Em balança analítica, foi pesada 5,00 g de biomassa seca em balão volumétrico previamente pesado. A esta amostra foram adicionados 20 mL de clorofórmio e 10 mL de metanol. Esta mistura foi agitada durante 2 horas para mistura eficiente da biomassa e solvente. A solução foi passada em funil com auxílio de papel filtro para separação da biomassa. O solvente foi evaporado em rotaevaporador a 75°C sob vácuo, após sua evaporação o balão foi seco em estufa a 105°C, resfriado em dessecador e então pesado em balança analítica.

3.5.2 Etanol

Pesou-se 10,00 gramas da biomassa seca moída de microalgas que foram acondicionadas em cartucho de celulose, inserido dentro do aparato de Soxhlet, e de 200 mL de etanol adicionados no balão localizado na parte inferior do equipamento, que foi posteriormente aquecido até aproximadamente 80°C. Depois de 48 horas realizando este procedimento, o balão contendo o solvente e o conteúdo solubilizado foi levado para

um evaporador rotativo, a fim de recuperar todo o solvente, e seguidamente para estufa a 60 °C até peso constante.

Os experimentos foram conduzidos em triplicatas e os rendimentos das extrações foram determinados em percentagem, em relação à massa seca. Os extratos obtidos foram avaliados por CCD (cromatografia em camada delgada) de acordo com o procedimento que será descrito abaixo no item 3.7 e comparados com os padrões lipídicos disponíveis. Com o auxílio do programa Image Master Total Lab versão 1.11 foram estimadas as quantidades de cada um dos componentes.

3.5.3 Tratamento químico ácido - *J: Schmid-Bondzynski-Ratzlaff*

Pesou-se um bécher de 100 mL previamente seco em estufa a 102°C e resfriado em dessecador. Neste bécher, foi pesada 5 g de amostra. A esta amostra foi adicionada 50 mL de ácido clorídrico 8M e agitou-se esta solução. A solução foi aquecida em banho-maria a 70°C por 10 minutos e após o aquecimento foi deixado o frasco em repouso por 10 minutos a 25°C. A esta amostra foram adicionados 50 mL de álcool etílico, 125 mL de éter dietílico e 125 mL de éter de petróleo e em seguida a solução foi agitada manualmente por 1 minuto.

A fase superior foi vertida em um funil de separação. Esta fase foi lavada duas vezes com água destilada para retirar o excesso de ácido clorídrico e o pH da água retirada foi medido. A fase etérea lavada foi vertida para um bécher previamente seco e pesado e então colocada em chapa aquecedora a 80°C para completa evaporação do solvente. Após a remoção dos solventes, a amostra foi acondicionada em estufa a 100 ± 2°C durante 1 hora. Após ser retirada da estufa a amostra foi resfriada em dessecador e pesada.

Os experimentos foram conduzidos em triplicatas e os rendimentos das extrações foram determinados em percentagem, em relação à massa seca. Os extratos obtidos foram avaliados por CCD (cromatografia em camada delgada) de acordo com o procedimento que será descrito abaixo no item 3.7 e comparados com os padrões lipídicos disponíveis. Com o auxílio do programa Image Master Total Lab versão 1.11 foram estimadas as quantidades de cada um dos compo

3.5.4 Tratamento químico básico: Saponificação

A saponificação foi conduzida misturando 5 g de biomassa seca com 50 mL de solução hidroalcoólica (20% de KOH em 95% álcool m/v) em banho de óleo sob agitação magnética de 200 rpm, por 1 hora a 70°C. Depois de concluída a reação, a amostra foi filtrada a vácuo para retirada da biomassa residual. O produto da saponificação, ainda quente, foi transferido para um funil de separação e, após atingir a temperatura ambiente, adicionou-se 50 mL da solução hexano:água (70:30) e agitou-se energicamente o funil. Este procedimento foi repetido 2 vezes.

A mistura homogeneizada foi mantida em repouso até separação efetiva das fases. A fase inferior foi removida, obtendo-se então a fase superior contendo o material insaponificável. Em seguida, esta fase foi lavada 3 vezes com 50 mL de água, até atingir o pH neutro, com o objetivo de remover o sabão residual. Posteriormente, foi transferida para um balão tarado e seco acoplado a um rotoevaporador para remoção do solvente. Finalmente, após a evaporação do solvente, o balão foi seco em estufa a 60 °C até peso constante.

À fração saponificável (fase inferior), oriunda da saponificação, adicionou-se uma quantidade molar estequiométrica de H_3PO_4 obtendo-se, desta forma, os ácidos graxos. A reação inversa (sabão - ácido graxo) foi conduzida sob agitação magnética de 200 rpm a 70 °C. Após o tempo reacional, de 1 hora, a amostra foi transferida para um funil de decantação, separando-se os ácidos graxos com adição de 2 x 50 mL de hexano. Esta fração hexânica, contendo os ácidos graxos, foi lavada com 2 X 15 mL de água para retirada do sal remanescente. O hexano foi rotaevaporado e recuperado.

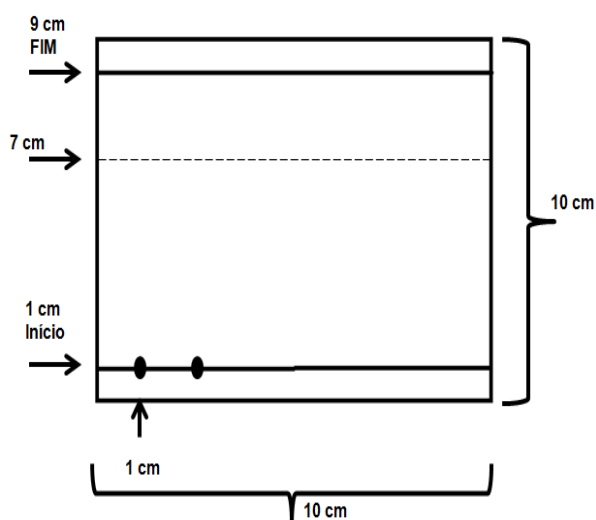
Os experimentos foram conduzidos em triplicatas e os rendimentos das extrações foram determinados em percentagem, em relação à massa seca. Os extratos obtidos foram avaliados por CCD (cromatografia em camada delgada) de acordo com o de acordo com o procedimento que será descrito abaixo no item 3.7 e comparados com os padrões lipídicos disponíveis. Com o auxílio do programa Image Master Total Lab versão 1.11 foram estimadas as quantidades de cada um dos componentes.

3.6 IDENTIFICAÇÃO DAS CLASSES LIPÍDICAS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Na identificação das classes lipídicas de interesse, presentes nos extratos de microalga, utilizou-se o método modificado de Cromatografia em camada delgada (CCD) (inglês: *Thin layer chromatography, TLC*). Nessa análise 0,001 g da fração lipídica extraída foram dissolvidos em 600 μl de clorofórmio. O equivalente a 0,03 μl da solução foi aplicada em uma placa de sílica gel 60 TLC (Merck) com auxílio de uma pipeta automática. Além da amostra que foi analisada, quantidades iguais dos padrões trioleína, dioleína, monooleína, ácido graxo, éster graxo, betacaroteno, ergosterol e oleato de colesterol foram aplicados nas placas para comparação e quantificação.

Para garantir uma separação eficiente e obter bandas agudas de lipídeos apolares a separação foi realizada conforme descrito a seguir. Primeiro, utilizou-se na separação dos lipídeos a mistura de solventes composta por éter de petróleo / éter dietílico / ácido acético (70:30:2) (v/v), até atingir 2/3 da altura da placa de sílica (7 cm). Depois de secar a placa, a separação continuou na mesma direção usando a mistura de solventes composta por éter de petróleo / éter dietílico (100:2) (v/v) até atingir o topo da placa (9 cm).

Figura 10 - Exemplo de marcação da placa TLC 10X10 cm



Fonte: A autora.

A placa cromatográfica após eluição foi revelada com vapor de iodo e o fator de retenção das manchas dos padrões e dos componentes das amostras foi determinado. Para conseguir uma coloração irreversível dos lipídeos apolares e dos esteróis na placa CCD, a mesma foi mantida em um solução de 0,63 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 60 mL de água, 60 mL de metanol e 4 mL de ácido sulfúrico por 10 segundos, seguida de aquecimento a 105 °C. A intensidade da coloração depende do tempo de aquecimento, que deve ser de 30 minutos no mínimo. Após concluído o procedimento foi tirada uma foto da placa e utilizado o programa Image Master Total Lab versão 1.11 para quantificação das classes lipídicas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos nas diferentes técnicas de caracterização da biomassa de *Scenedesmus* sp. estudada.

4.1 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS

Na determinação do teor de proteínas da biomassa de *Scenedesmus* sp. pelo método de Kjeldahl no presente trabalho obteve-se o teor de 33,18% ($\pm 0,03$). Este valor é próximo ao relatado para esta espécie na literatura. González López et al. (2010), relataram que o conteúdo proteico de *Scenedesmus* sp. foi encontrado na faixa de 30-50%, dependendo do método de pré-tratamento de rompimento celular aplicado. Um teor de proteína de 41,8% para a cepa *Scenedesmus almeriensis* foi relatado por Romero et al. (2012). Becker (2007) relatou um conteúdo de proteína para *Scenedesmus obliquus* entre 50 e 55%. *Scenedesmus* sp. é uma microalga eucariótica, que se apresenta entre os gêneros de água doce mais comuns. *Scenedesmus almeriensis* é uma nova cepa de *Scenedesmus* sp., que apresenta muitas vantagens, como alta taxa de crescimento e tolerância a altas temperaturas e altas concentrações de cobre.

Como observado por Becker (2007), os relatos publicados na literatura sobre concentrações de proteínas algais, é baseada em estimativas da chamada proteína bruta, comumente usada na avaliação de alimentos e rações. Este valor é obtido por hidrólise da biomassa de algas e estimativa do nitrogênio total. Como além da proteína também outros constituintes das microalgas, como por exemplo, ácidos nucleicos, aminos, glucosamidas e materiais da parede celular, contêm nitrogênio, esse cálculo resulta em uma superestimação do teor real de proteínas. Segundo dados reportados, o conteúdo de nitrogênio não proteico é de 12% na *Scenedesmus obliquus*.

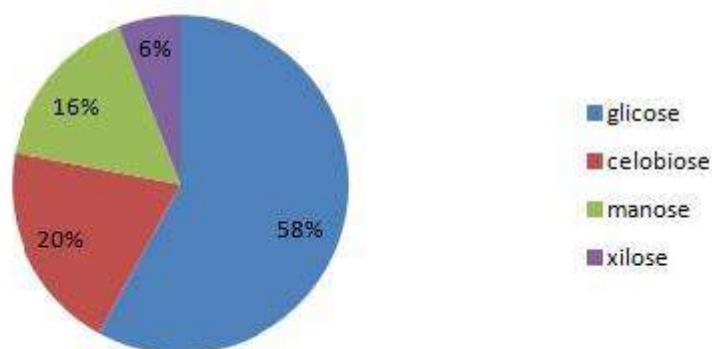
Além disso, as proteínas são compostas por diferentes aminoácidos e, portanto, a qualidade nutricional de uma proteína é determinada basicamente pelo conteúdo, proporção e disponibilidade de seus aminoácidos. Portanto, é necessária a realização de um aminograma para avaliar a sua aplicabilidade como fonte proteica. Tendo como base a proteína vegetal mais utilizada atualmente, que é a oriunda da soja, a qual possui um teor proteico relatado por Fontana (1996) entre 36-40% pode-se concluir que a biomassa de microalgas se equipara a esta fonte convencional em teor proteico. No entanto, não

se pode afirmar se a biomassa microalgal é viável para uma futura aplicação na área alimentícia, visto que é necessária a realização da análise de seus aminoácidos.

4.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CARBOIDRATOS

A amostra analisada apresentou um teor de carboidratos totais de 40,74 % (\pm 0,04). No gráfico apresentado na **Figura 11** abaixo se pode observar que dentre os carboidratos predominantes, quantificados por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), ressalta-se o alto teor de glicose para esta amostra (58%), seguido de celobiose, manose e xilose.

Figura 11 – Composição de carboidratos (di e monossacarídeos presentes na fração de carboidratos) da biomassa de *Scenedesmus sp*



Fonte: A autora.

A celulose é um polissacarídeo formado por monômeros de glicose, que se unem através de ligações β -1,4-glicosídicas, enquanto a celobiose é um dissacarídeo glicosil-glicose, composto por duas moléculas de glicose unidas por ligações β -1,4-glicosídicas. Valores elevados de glicose, como o apresentado na biomassa analisada (58 %), indicam uma boa eficiência na etapa de hidrólise da celulose. Como citado anteriormente, o tipo de monossacarídeo que constitui a hemicelulose irá depender da genética de cada espécie de microalga, assim como acontece nas biomassas terrestres e

das condições de cultivo. Na biomassa analisada foram identificadas a presença de xilose e manose.

Embora a informação sobre as estruturas originais de polissacarídeos não esteja disponível neste trabalho, a presença dos monossacarídeos individuais nestes organismos modelo pode dar alguma indicação do carboidrato de origem com base em informações da literatura. Algumas microalgas podem conter uma grande quantidade de carboidratos na parede celular (principalmente na forma de celulose e polissacarídeos solúveis) e acumulados nos plastídios como material de reserva (principalmente na forma de amido).

Em estudos realizados por Chng et al. (2017) na biomassa de *Scenedesmus dimorphus* foi encontrado um teor de 49,7% de carboidratos totais, em que 44,5% corresponde ao percentual de amido e o restante consiste em polissacarídeos estruturais, principalmente da parede celular. Na investigação, o perfil de açúcar indicou a presença de dextrina, sacarose, glicose e galactose. Takeda (1996) relatou que na biomassa de *Scenedesmus* os açúcares identificados como componentes da parede celular são na grande parte das vezes glicose (componente majoritário), galactose e manose. Ainda segundo Takeda (1995), algas verdes como *S. dimorphus* possuem parede celular unicelular construída a partir de celulose e armazenam carbono como amido.

Silva et al. (2018), relataram ter encontrado a glicose como monossacarídeo predominante na biomassa de *Scenedesmus obliquus*, responsável por mais de 70% do açúcar total, juntamente com a xilose (16,14%). Considerando o alto teor de carboidratos encontrados na espécie estudada no presente trabalho deve-se ressaltar a importância do aproveitamento destes, como forma de agregar valor ao processo.

A aplicação destes carboidratos que mais tem sido estudada é para produção de bioetanol de terceira geração, quando se selecionam espécies de microalgas com habilidade de produzir altas concentrações de carboidratos ao invés de lipídeos como composto de reserva energética (MUSSATTO et al., 2010). Estudos indicam que o meio de cultivo com restrição de nitrogênio é um dos principais fatores que acarretam o acúmulo de carboidratos pelas microalgas, já que estas direcionam o fluxo de carbono para a síntese de carboidratos em detrimento da produção de proteínas (BEHRENS et al., 1989; DRAGONE et al., 2011).

4.3 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE CINZAS

Na presente análise da biomassa de *Scenedesmus sp*, foi encontrado um valor de 10,69% ($\pm 0,03$) de teor de cinzas. Este valor está de acordo com o relatado na literatura para microalgas cultivadas em sistema aberto. De Lima et al. (2018), por exemplo, relataram ter encontrado valores entre 21,67% a 26,3% de cinzas para *Chlorella sp*. cultivada em fotobiorreator aberto, Matos et al. (2018), relataram ter encontrado valores de cinzas de 14,5% ($\pm 2,5$) e 32,8% ($\pm 3,0$) para *Chlorella vulgaris* cultivada em raceway sob dois diferentes tipos de condições de cultivo. Enquanto Hirata et al. (1996) relataram um percentual de 2,7% de cinzas na biomassa de *Chlorella sp*. cultivada em fotobiorreator fechado e Tibbetts et al. (2015) relataram um valor de 5,8% de cinzas para *Chlorella sp*. sob o mesmo tipo de cultivo.

Portanto, o valor de cinzas na biomassa de microalgas pode ser diretamente relacionado ao sistema de cultivo de biomassa, visto que nos sistemas abertos encontra-se um maior teor de cinzas do que nos sistemas fechados. No presente estudo, em que as microalgas foram cultivadas em raceway obteve-se valores de cinzas superiores aos encontrados na literatura para sistemas de cultivo fechados. A composição destas cinzas foi posteriormente investigada e inicialmente suspeitava-se que as cinzas seriam majoritariamente compostas por nutrientes não consumidos. No entanto, análises indicaram uma composição majoritária de sílica e cálcio, o que pode ser parcialmente explicada devido ao fato de o tanque estar em uma localidade sujeita a contaminação fundamentalmente por areia.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE LIPÍDEOS

A quantificação do teor de lipídeos presentes na biomassa analisada foi realizada seguindo os métodos descritos nos itens 3.5.1, 3.5.2, 3.5.3 e 3.5.4 descritos acima. Na **Tabela 4** são apresentados os resultados dessa quantificação.

Tabela 4 – Quantificação de lipídeos na biomassa seca de *Scenedesmus sp.*

% de lipídeos /100 g de biomassa seca*			
Sem tratamento químico		Com tratamento químico	
Bligh & Dyer	Etanol	J:Schmid-Bondzynski-Ratzlaf	Básico/Saponificação
6,44 ±0,11	8,18 ±0,13	3,57 ±0,19	3,44 ±0,21

*biomassa livre de cinzas

Fonte: A autora.

A partir da Tabela 4, se pode observar o elevado teor de lipídeos obtido com a utilização de etanol como solvente. Tal fato pode ser explicado, conforme observado por Viegas (2010), pela maior polaridade do etanol em comparação com os demais solventes. Devido a sua maior polaridade o etanol possibilita uma maior permeabilidade na célula visto que a maior parte de lipídeos nas microalgas está associada aos lipídeos de membrana, os quais são polares. Sendo assim, ocorre a extração de uma maior quantidade de componentes. Além disso, a extração de lipídeos com etanol apresenta um maior teor, pois além de lipídeos estão sendo extraídos outros compostos como açúcares, pigmentos, devido a sua afinidade com este solvente, o que conduz a resultados superestimados.

O maior teor de lipídeos na extração com etanol também foi obtido por Silva (2013) que utilizou para a extração do óleo de microalgas o n-hexano, etanol e etanol+água (adição de 4% e 10% de água (v/v) em etanol) como solventes, classificando então o etanol como o melhor solvente para extração de óleo de microalgas da espécie *Chlorella pyrenoidosa*.

Resultado semelhante foi obtido por Yang et al. (2014), em que o rendimento de lipídeos da biomassa de *Picochlorum sp* na extração com etanol também foi o maior valor apresentado, 33,04%. O percentual de lipídeos obtidos por Bligh & Dyer está referenciado na tabela 4. Dentre os solventes usados nos diferentes métodos, a mistura (clorofórmio – metanol 2:1) usada no Bligh & Dyer apresentou a segunda maior quantidade de extrato lipídico. Esse comportamento pode ser parcialmente explicado devido à presença de lipídeos neutros no interior da célula, que se ligam fortemente via pontes de hidrogênio às proteínas localizadas na membrana celular, formando um complexo com lipídeos polares.

As interações de Van der Waals entre o solvente apolar e os lipídeos não são capazes de romper essa membrana baseada nas associações lipídeos-proteínas. Os solventes polares, tais como metanol ou etanol, rompem essas associações, formando ligações de hidrogênio com os lipídeos polares no complexo. Portanto, a adição de um solvente polar a um solvente apolar facilita a extração do complexo de lipídeos neutros associados à membrana, mas os lipídeos polares e apolares também podem ser extraídos. Assim, o emprego de uma mistura de solventes apolar e polar conduz a rendimentos muito mais elevados de extração de lipídeos, que quando se utilizam solventes de baixa polaridade (VIEGAS, 2010).

Embora esse método seja muito eficaz na extração de lipídios totais, do ponto de vista da saúde humana e do meio ambiente, eles podem ser considerados perigosos em altos níveis de exposição. O clorofórmio é um solvente halogenado cancerígeno, o que significa que seu armazenamento prolongado pode levar à formação de fosgênio e ácido clorídrico. Assim, seu uso na extração de lipídios em escala industrial é estritamente proibido. O valor de lipídeos totais encontrados pelo método da extração com Bligh & Dyer estão de acordo com os relatados na literatura. Baumgartner (2011) encontrou para *Scenedesmus sp.* um valor de 8,3% utilizando este método e Shin et al. (2014) encontraram o valor de 14,5% para esta mesma espécie.

Os teores de lipídeos alcançados pelo método de Ratzlaff em termos quantitativos foram inferiores aos alcançados com Bligh & Dyer. Esses valores podem estar relacionados, por exemplo, com a baixa eficiência da hidrólise ácida e com a polaridade dos solventes utilizados para extração (mistura de etanol, éter etílico e éter de petróleo).

Na extração de lipídeos com tratamento químico seguido de saponificação, o intuito foi direcionar a extração para que seja mais seletiva e pura de modo que se obtenha o material saponificável. Conforme observado em estudos realizados por Schroeder (2013), a saponificação é a reação dos triacilglicerídeos com álcali promovendo o rompimento das ligações ésteres na matriz lipoproteica e então formando sabão. Após a formação do sabão, é necessário transformá-lo no respectivo ácido graxo conjugado através de uma reação ácido/base. No processo de saponificação, os ácidos são obtidos na forma de sais em vez de como lipídeos brutos em um primeiro passo, o que poderia reduzir custos e tempo operacional em comparação com a extração de lipídeo seguida de saponificação (GRIMA et al., 1994). O teor de lipídeos encontrados

por Schroeder (2013) para biomassa de *Scenedesmus sp.* por este método de saponificação variou de 5,28% ($\pm 0,34$) a 11,92% ($\pm 0,96$) e mostrou que esse método foi mais seletivo para os lipídeos com cadeia graxa, conseqüentemente, saponificáveis.

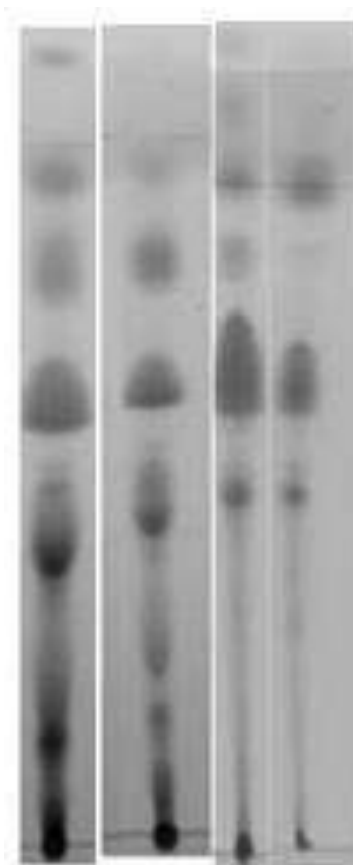
4.5 IDENTIFICAÇÃO DAS CLASSES LIPÍDICAS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Para a identificação das classes lipídicas presentes nos extratos, obtidos pelos diferentes métodos avaliados neste trabalho, utilizou-se a técnica de cromatografia em camada delgada. O principal objetivo desta identificação está relacionado com a necessidade de selecionar procedimentos de extração mais seletivos aos compostos graxos, por exemplo para a produção de biodiesel. Pode-se verificar na **Figura 12**, os extratos apresentaram carotenos, clorofilas, ácidos graxos, triglicerídeos, ésteres graxos, diglicerídeos e esteróis identificados de acordo com o tempo de retenção e ordem de eluição de cada composto.

Nos extratos sem tratamento químico, como no caso do etanol e Bligh & Dyer (2:1) foi detectada a presença de ácidos graxos livres como componentes majoritários nas frações. A quantidade de água presente na biomassa após a coleta (85% de umidade) e o tempo de 24 horas associado ao processo de descongelamento e temperatura de 100°C realizada na secagem da biomassa provavelmente contribuíram com a degradação dos triglicerídeos, aumentando a quantidade de ácidos graxos livres. Além disso a clorofila pode sofrer fotooxidação gerando radicais $O^{\cdot-}$ na célula que possam a promover a degradação dos lipídios (SMOUSE; DAVID, 1989).

De acordo com a literatura que a microalga *Phaeodactylum tricornutum* também apresentou elevados teores de ácidos graxos livres, o que provavelmente resultou da degradação lipídica durante o tempo de armazenamento e processamento da biomassa (RYCKEBOSCH et al., 2011). De acordo com o autor, ao armazenar biomassa de microalgas in natura, sem nenhum tipo de inativação enzimática com alta quantidade de água, a lipólise ocorrem naturalmente. Já nos extratos via Ratzlaff e Saponificação, esse resultado pode ser explicado em parte devido ao tratamento químico da biomassa (Hidrólise ácida e básica, respectivamente).

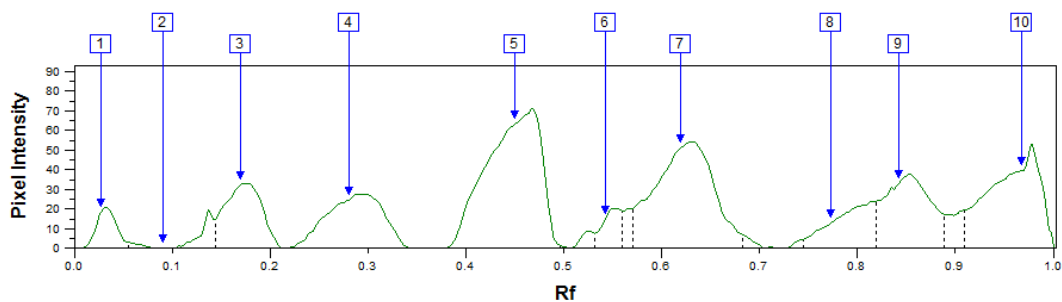
Figura 12 - Separação componentes presentes nos extratos lipídicos por cromatografia em camada delgada. Linhas: A – Extrato lipídico- *Etanol*- B- Extrato lipídico- *Bligh & Dyer*- C- Extrato lipídico- *J:Schmid-Bondzynski-Ratzlaff*.; D- Saponificação Componentes Lipídicos (de cima para baixo): 1-Carotenos; 2- éster de esterol; 3- Éster graxo; 4- Trioleína; 5- Ácido graxo; 6- Diglicerídeos; 7,8 e 9- Pigmentos; 10- Compostos Polares



Fonte: A autora.

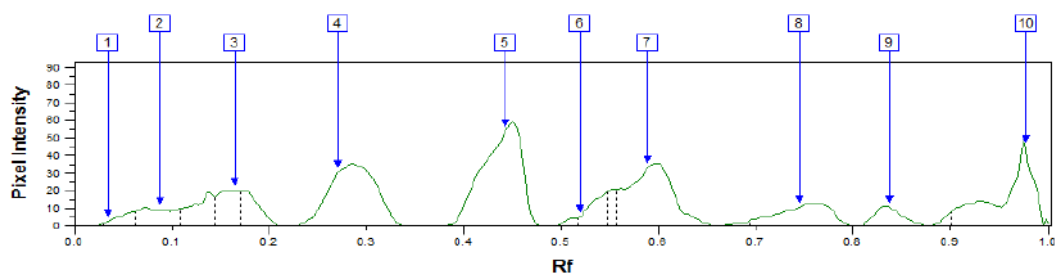
Os cromatogramas gerados a partir da **Figura 12** referentes aos extratos lipídicos da *Scenedesmus* sp. podem ser observados nas **Figuras 13-16**:

Figura 13 - Cromatograma do extrato lipídico de Etanol



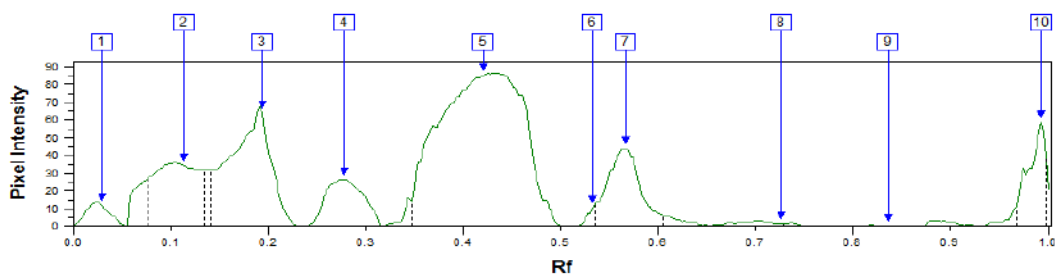
Fonte: A autora.

Figura 14 - Cromatograma do extrato lipídico de *Bligh & Dyer*



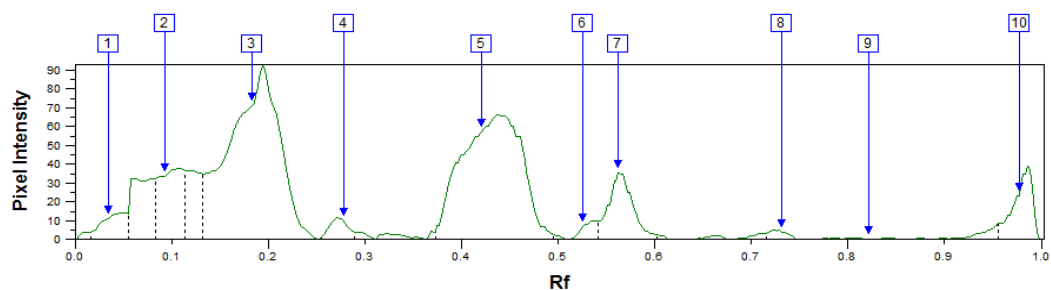
Fonte: A autora.

Figura 15 - Cromatograma do extrato lipídico de *J:Schmid-Bondzynski-Ratzlaff*



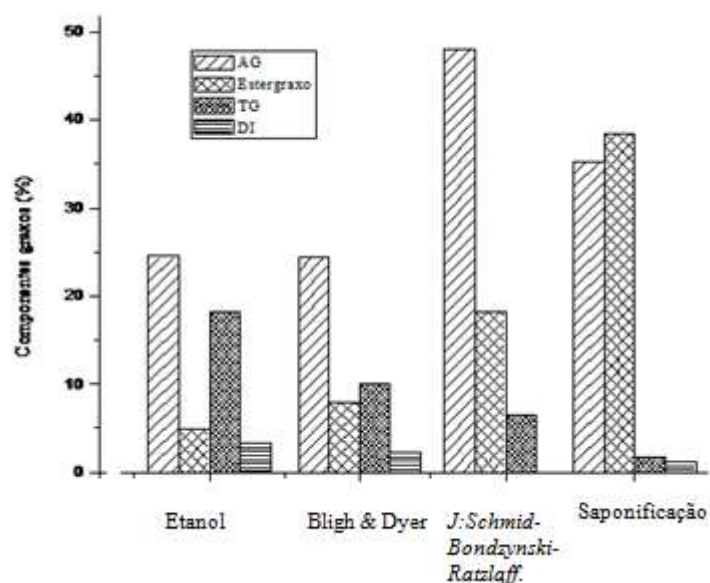
Fonte: A autora.

Figura 16 - Cromatograma do extrato lipídico de saponificação



Fonte: A autora.

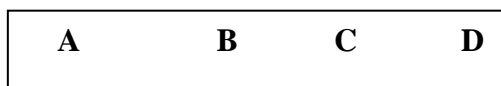
De acordo os percentuais dos compostos graxos identificados na cromatografia de camada delgada (**Figura 17**) pode-se observar uma variação em relação ao percentual de triglicerídeos presentes nos extratos de *Bligh & Dyer* quando comparado com os extratos *J:Schmid-Bondzynski-Ratzlaff*.

Figura 17 - Componentes graxos presentes nos extratos lipídicos¹

Fonte: A autora.

Conforme pode ser evidenciado pelas placas de cromatografia em camada delgada, os solventes usados nas extrações com Bligh & Dyer e etanol não contemplaram apenas lipídeos neutros, mas também pigmentos e esteróis (**Figura 18**). Nos extratos de Bligh & Dyer e etanol observa-se a presença de pigmentos verdes (**Figura 18**), já nos extratos de *J:Schmid-Bondzynski-Ratzlaff* (ácido) e Saponificação (básico) estes compostos não em pequenas quantidades identificados:

Figura 18 - Placa de cromatografia em camada delgada dos extratos lipídicos sem revelação no Iodo. Extratos Lipídicos: (A) Etanol, (B) Bligh & Dyer, (B) Etanol, (C) J:Schmid-Bondzynski-Ratzlaff e (D) Saponificação

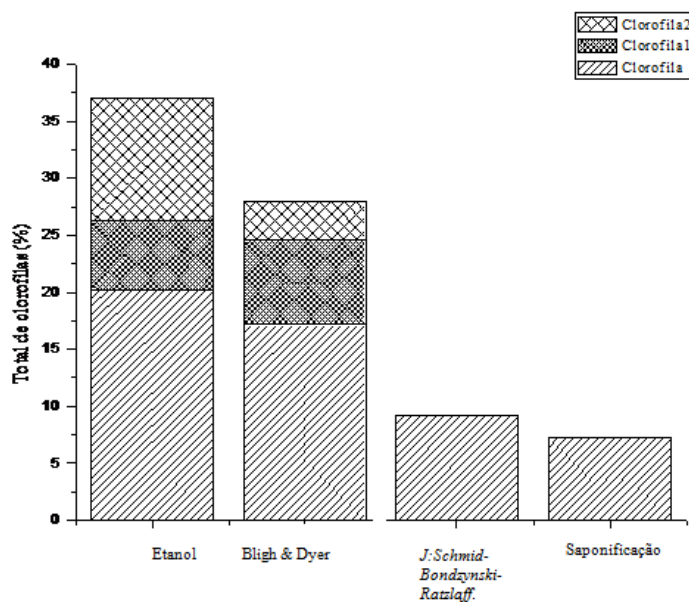


¹ Legenda: AG: Ácidos graxos; TG: Triglicerídeos; Di: Diglicerídeos.



Fonte: A autora.

Figura 19 - Teor de clorofilas nos extratos lipídicos



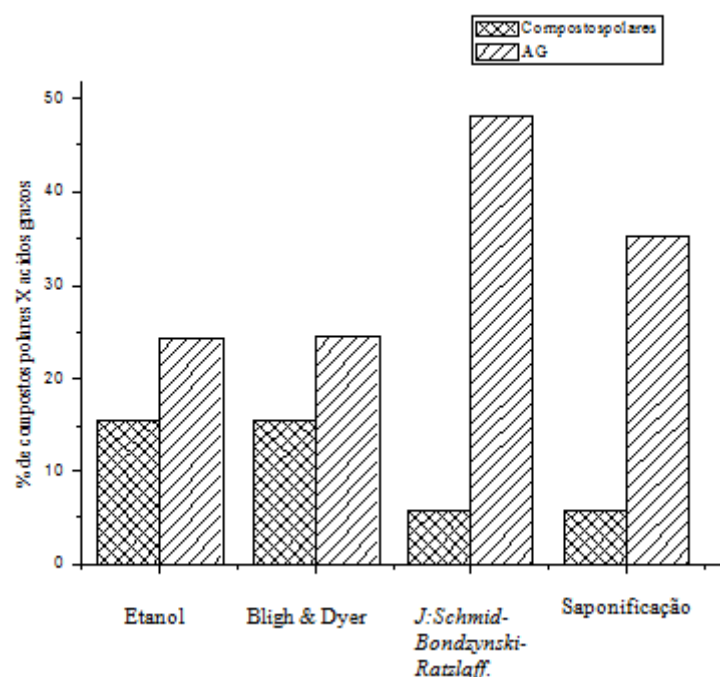
Fonte: A autora.

A perda de cor durante a hidrólise devido a clorofila *a* uma marrom azeitona (HEATON et al., 1996), característica da feofitina pode ocorrer pela presença de H⁺, fato que pode ser justificado pela adição de HCl na etapa de hidrólise da biomassa. Este

fenômeno é conhecido como feofitinação, onde o magnésio do centro da molécula de clorofila é substituído por hidrogênio. Outro tipo comum de reação da clorofila é na presença de OH⁻ no meio, onde ocorre a remoção da cadeia fitol, conduzindo à formação de clorofilida ou feoforbídeo (MARTINS; SILVA, 2002). Esse resultado leva a concluir que o uso de etanol e Bligh & Dyer para extração de lipídeos conduz a resultados superestimados.

Nos pontos de origem de aplicação da amostra sob a placa de cromatografia, nos extratos lipídicos de etanol e Bligh & Dyer indicaram uma maior concentração de compostos polares (Figura 20).

Figura 20 - Composição de componentes polares e ácidos graxos nos extratos lipídicos²



Fonte: A autora.

Os compostos retidos na base da placa não apresentaram afinidade suficiente para interagir com a fase móvel composta por éter de petróleo e éter etílico tendo mais afinidade a fase estacionária (Sílica). Neste caso, quanto maior for a afinidade dos compostos separados com a fase estacionária maior será a polaridade dos mesmos. Foi possível avaliar que a quantidade de compostos polares presentes nos extratos de etanol

² Legenda: AG: ácidos graxos

e Bligh & Dyer representaram 15,59 e 15,55 % dos lipídeos totais identificados. Na presença etanol e de clorofórmio e metanol, utilizados no Bligh & Dyer, um maior número de lipídeos polares foram extraídos devido à afinidade aos solventes extratores visto que, as microalgas cultivadas nesse trabalho foram realizadas de forma autotrófica, de acordo com Chen et al. (2011), em microalgas cultivadas sob essa forma apresentaram 70,6% de lipídios polares, enquanto nas microalgas cultivadas de forma heterotróficas, apenas 19% de lipídios totais eram lipídios polares.

Não foi realizada uma separação adicional dos lipídeos polares, porém de acordo com Wang et al. (2016), a grande maioria dos lipídeos polares presentes nas microalgas incluem os fosfolipídios e glicolipídios. A diminuição na quantidade de lipídeos polares nos extratos de *J.Schmid-Bondzynski-Ratzlaff* e saponificação pode ser explicado devido ao uso de base e ácido, respectivamente, nesses procedimentos. Tanto o ácido quanto a base hidrolisam os lipídeos complexos como fosfolipídeos, glicolipídeos e também os esteróis, liberando a cadeia graxa para o extrato. Em outras espécies de microalgas estudadas (CHEN et al., 2011), foi possível observar que a maioria dos lipídeos disponíveis estão na forma de lipídeos com maior polaridade, como os lipídeos presentes na parede celular.

No extrato produzido tratamento químico, *J.Schmid-Bondzynski-Ratzlaff* (ácido) e saponificação (base) observa-se o desaparecimento dos esteróis (compostos apolares) e a presença de ésteres etílicos. Os ésteres etílicos são oriundos da transesterificação/esterificação dos triglicerídeos e ácidos graxos formados durante a reação do ácido/base com os álcoois presentes no meio reacional. Na reação ocorre uma competição entre a reação de hidrólise e a reação de transesterificação/esterificação devido à presença de dois nucleófilos fortes como o OH⁻ e o -OCH₂CH₃ devido a presença de água, etanol, base e ácido.

Nos extratos lipídicos obtidos via *J.Schmid-Bondzynski-Ratzlaff* e saponificação, verifica-se uma diminuição na variabilidade dos compostos presentes nessa fração, quando comparado com os extratos obtidos via etanol e Bligh & Dyer, por exemplo, visto que, os extratos lipídicos obtidos sem tratamento químico apresentaram uma grande quantidade de compostos insaponificáveis (principalmente clorofilas), um refino químico (via saponificação), por exemplo, desse material mostrou-se um procedimento adequado de purificação e concentração dos compostos graxos.

Nos extratos lipídicos foram detectados a presença de hidrocarbonetos com duplas ligações conjugadas no mesmo tempo de retenção de carotenos em quantidades de até 2% em relação ao extrato lipídico. Por exemplo, durante a fotossíntese a microalga absorve luz solar, nutrientes e CO₂ que são convertidos em biomassa e, ao mesmo tempo, produz oxigênio molecular. Como, o oxigênio é facilmente ativado pela radiação ultravioleta ou pelo calor da luz solar transformando-se em espécies reativas de oxigênio, altamente oxidantes, as plantas e as microalgas desenvolveram um mecanismo de proteção contra essas espécies reativas de oxigênio, que consiste na produção de numerosos e eficientes compostos antioxidantes como os carotenoides.

Para biocombustíveis, as matérias-primas devem apresentar uma elevada concentração de triglicerídeos, já a *Scenedesmus* sp. apresentou uma quantidade inferior (23%) comparadas às oleaginosas convencionais (90-98%). Quando comparamos os teores de triglicerídeos obtidos neste trabalho com os teores relatados para outras microalgas pode-se verificar uma diferença na composição, por exemplo, foram menores as presentes na microalga *Parietochloris incisa* que apresentou 42,9% e a *Pavlova lutheri* com 40,3% de triglicerídeos (PETKOV et al., 2012).

Para a *Scenedesmus* relatada por Wang et al. (2016), o teor de triglicerídeos não ultrapassou 4,1 % no extrato lipídico. Ainda de acordo com os mesmos autores o tempo de cultivo não teve efeito no teor total de ácidos graxos, mas influenciou na concentração de outras classes lipídicas, já que o teor de lipídeos polares diminuiu. Esses resultados sugerem que as condições de cultivo das microalgas influenciam na síntese de triglicerídeos e de outras classes lipídicas. Nos extratos lipídicos foram observados até 12% de esteróis em relação a fração graxa.

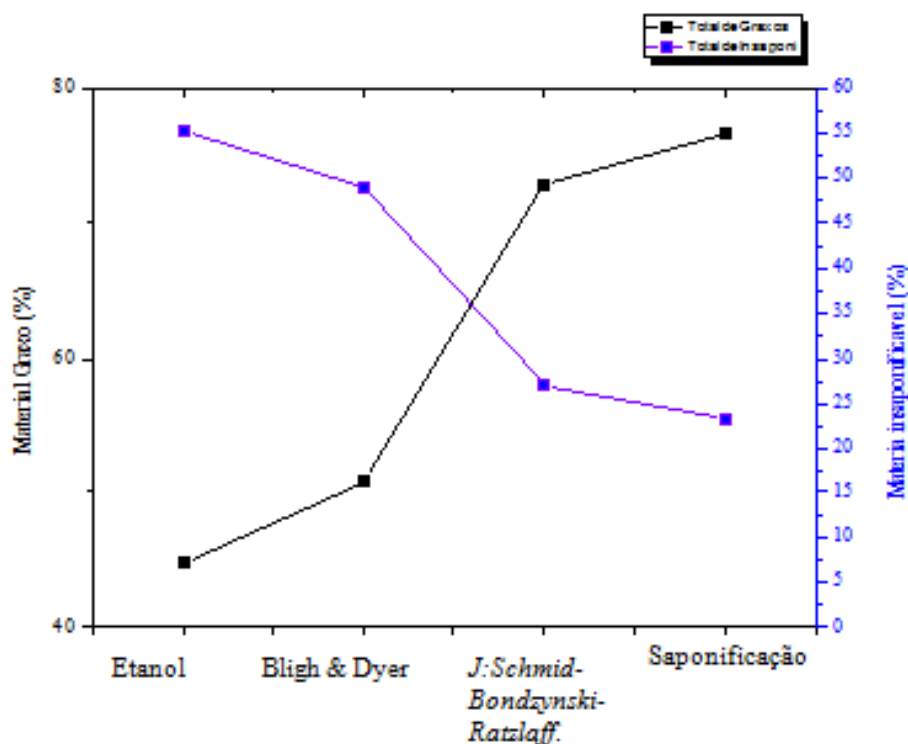
De acordo com a literatura, existe uma grande quantidade de compostos (esteróis, carotenóides, entre outros) com afinidade lipofílica aos solventes como éter de petróleo, hexano e acetato de etila. De acordo com a literatura, os esteróis são importantes constituintes das membranas celulares dos organismos eucariotos, encontrando-se entrelaçados com bicamadas fosfolipídicas. Através dessa existência, os esteróis desempenham papéis significativos na manutenção da estabilidade estrutural da célula e na aclimação à temperatura da membrana.

Os esteróis ajudam a manter a fluidez e a permeabilidade, controlando o movimento de cadeias de ácidos graxos dentro da membrana (PEDROSO, 2009). No entanto, tem sido relatado na literatura que as mudanças nas condições de crescimento,

como a taxa de renovação de culturas semicontínuas, a concentração de sal no meio de crescimento, o tipo de fotobiorreator, a intensidade luminosa, o conteúdo de fósforo, a temperatura e o estágio de crescimento das microalgas podem afetar a produção de esteróis pelas microalgas. A quantidade de esteróis presentes na biomassa da microalga estudada pode ser considerada alta, quando comparada com outras matérias-primas como o milho que apresenta 0,8 % de esteróis totais (SUAREZ et al. 2019).

Após a análise individual dos componentes, de acordo com a **Figura 21** neste trabalho também avaliou-se a quantidade de material graxo de cada um dos extratos. Os componentes foram classificados como graxo o somatório dos componentes lipídicos: teor de ésteres graxos + ácidos graxos + triglicerídeos + diglicerídeos. Como insaponificável, não graxo, foram considerados os carotenos + éster de esterol + clorofilas + compostos polares. Nesse caso, foram desprezadas as possíveis conversões dos compostos polares em ácidos graxos livres presentes nos extratos para não superestimar os resultados. De acordo com **Figura 21** pode-se observar que a hidrólise ácida e básica contribuíram para o aumento dos componentes graxos da *Scenedesmus* sp.

Apesar dos extratos, obtidos via etanol e Bligh & Dyer, (sem conversão química), apresentarem teores de lipídeos totais superiores aos encontrados nos extratos com conversão química (Ratzlaff e Saponificação), a fração produzida por tratamento químico mostrou-se mais pura, com maior concentração de compostos graxos. O percentual de compostos graxos nos extratos de J:Schmid-Bondzynski-Ratzlaff e Saponificação foram de 72 e 76 %, respectivamente (**Figura 21**).

Figura 21 - Relação de material graxo X material insaponificável nos extratos lipídicos

Fonte: A autora.

A quantidade de fração graxa obtida para a biomassa *Scenedesmus* sp. avaliada nesse trabalho foi superior a relatada por Petrov, et. al. (2012) onde os autores afirmaram que foi possível obter 50% de compostos graxos após a hidrólise do extrato lipídico. Já para os extratos de etanol e Bligh & Dyer da *Scenedesmus* sp essa quantidade foi de 44,74 e 50,96% de componentes graxos em relação a quantidade total de material extraído.

Foi possível verificar que existe grande variação no percentual de lipídeos quando são utilizados diferentes métodos/solventes de extração. Dependendo do método e/ou solvente existe uma maior afinidade por determinados compostos, o que pode ser atribuído à polaridade do solvente e à modificação química da estrutura dos lipídeos.

5 CONCLUSÃO

O teor de proteínas obtido para biomassa de *Scenedesmus sp.* foi de $33,18 \pm 0,03\%$. Esse teor pode ser considerado alto quando comparado com as fontes proteicas convencionais, como a soja que apresenta um teor entre 36-40%. Portanto, a biomassa proveniente das microalgas apresentou potencial como fonte proteica. Para avaliar a potencialidade desta biomassa para a citada aplicação serão necessários diversos ensaios, dentre eles, verificar a composição dos aminoácidos presentes nessa fração.

Os principais macrocomponentes foram os carboidratos com $40,74 \pm 0,04\%$ e o monossacarídeo identificado em maior quantidade foi a glicose (58%), a qual pode ser utilizada para uma possível fermentação em etanol.

O teor de cinzas presentes na biomassa analisada foi de $10,69 \pm 0,03\%$, esse valor pode estar relacionado com o tipo de sistema de cultivo que é sujeito a contaminações externas, como areia.

Na quantificação dos lipídeos extraídos sem tratamento químico na presença de etanol e Bligh & Dyer os teores foram de $8,18 \pm 0,13\%$ e $6,44 \pm 0,11\%$, respectivamente. Visando a produção de biodiesel esta biomassa não demonstrou potencial como candidata a matéria-prima devido ao baixo teor de lipídeos e triglicerídeos.

Os extratos lipídicos da *Scenedesmus sp.* extraídos com *Bligh & Dyer* tiveram como constituinte principal a presença de aproximadamente 25% de ácidos graxos livres. No extratos lipídicos obtidos via etanol e Bligh & Dyer aproximadamente 50% da composição dessa fração é constituída de compostos graxos enquanto que a outra metade é composta por fração insaponificável composta principalmente de clorofilas, éster de esteroide e carotenos. Os extratos lipídicos sem tratamento químico apresentaram uma quantidade significativa de componentes insaponificáveis que superestimaram os resultados. Portanto, uma etapa adicional de separação e concentração dos componentes graxos possibilitará no aumento da qualidade dos extratos.

A extração de lipídeos junto com a hidrólise ácida e básica da biomassa de *Scenedesmus sp.* possibilitou a obtenção de 72,84% e 76,66% de material graxo nos extratos lipídicos, respectivamente. O tratamento ácido e básico possibilitou o aumento da quantidade de ácidos graxos livres nos extratos lipídicos pela hidrólise dos lipídeos complexos, compostos polares e triglicerídeos.

REFERÊNCIAS

ALABI, A. O.; TAMPIER, M.; BIBEAU, E. **Microalgae technologies & processes for biofuels-bioenergy production in British Columbia**: current technology, suitability & barriers to implementation. Vancouver, BC: British Columbia Innovation Council, 2009. Disponível em: <http://www.etipbioenergy.eu/images/Seed_Science_microalgae_appendices.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2019

AMIN, S. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. **Energy conversion and management**, v. 50, n. 7, p. 1834-1840, 2009. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/223623141_Review_on_biofuel_oil_and_gas_production_processes_from_microalgae>. Acesso em: 22 nov. 2019.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C). **Official methods of analysis of the**. Association of Official Analytical Chemists (method 991.20). Arlington: A.O.A.C. p. 10-12, 1995.

BAUMGARTNER, T. R. S. 2011. **Cultivo e extração de óleo das microalgas Scenedesmus sp. e Spirulina sp. para a síntese de ésteres visando à produção de biodiesel**. 124 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 2011. Disponível em: <<http://repositorio.uem.br:8080/jspui/bitstream/1/3628/1/000207987.pdf>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

BEHRENS, P. W. et al. Eicosapentaenoic acid from microalgae. Novel Microbial Products for Medicine and Agriculture. **Elsevier**, p. 253-259, 1989.

BECKER, E. W. **Microalgae**: biotechnology and microbiology. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology advances**, v. 25, n. 2, p. 207-210, 2004.

_____. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology advances**, v. 25, n. 2, p. 207-210, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17196357>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

BI, Z.; HE, B. B. Characterization of microalgae for the purpose of biofuel production. **Transactions of the ASABE**, v. 56, n. 4, p. 1529-1539, 2013.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubs and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 313-321, 1999. Disponível em: <<https://www.tib.eu/en/search/id/ceaba%3ACEAB19990608263/Commercial-production-of-microalgae-ponds-tanks/>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae: a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and**

sustainable energy reviews, v. 14, n. 2, p. 557-577, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1364032109002408>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

CARDOSO, W. A. et al. Comparação entre métodos de extração de óleo de microalgas. **Revista de Iniciação Científica**, v. 12, n. 1, 2014. Disponível em: <<http://periodicos.unesc.net/iniciacaocientifica/article/view/1640>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

CHAICHALERM, S. et al. Culture of microalgal strains isolated from natural habitats in Thailand in various enriched media. **Applied Energy**, v. 89, n. 1, p. 296-302, 2012. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/257157002_Culture_of_microalgal_strains_isolated_from_natural_habitats_in_Thailand_in_various_enriched_media>. Acesso em: 22 nov. 2019.

CHEN, C. et al. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 1-10, 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/236130187_Microalgae-based_carbohydrates_for_biofuel_production>. Acesso em: 22 nov. 2019.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17350212>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

CHNG, L. M.; LEE, K. T.; CHAN, D. J. C. Synergistic effect of pretreatment and fermentation process on carbohydrate-rich *Scenedesmus dimorphus* for bioethanol production. **Energy conversion and management**, v. 141, p. 410-419, 2017. Disponível em: <<https://pubag.nal.usda.gov/catalog/5671488>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

CHOJNACKA, K., MARQUEZ-ROCHA, F. J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 21-34, 2004. Disponível em: <<https://scialert.net/abstract/?doi=biotech.2004.21.34>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

COHEN, Z. Products from microalgae. In: RICHMOND, A. **CRC Handbook of Microalgal Mass Culture**. Boca Raton: CRC, 1986. p. 421-454.

COONEY, M.; YOUNG, G.; NAGLE, N. Extraction of bio-oils from microalgae. **Separation & Purification Reviews**, v. 38, n. 4, p. 291-325, 2009. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15422110903327919>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

_____.; PATE, R. Bio-oil from photosynthetic microalgae: case study. **Bioresource technology**, v. 102, n. 1, p. 166-177, 2011. Disponível em: <<https://www.semanticscholar.org/paper/Bio-oil-from-photosynthetic-microalgae%3A-a-case-study.-Cooney-Young/bde3d4d5d056836c52ef2e1537cce480dce0c00e>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

DAVID, L. N.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

LIMA, J. F. et al. Enhancement of Lipid Accumulation in *Chlorella* Sp. Farming Culture Held in Open Photobioreactors. **The International Journal of Engineering and Science**, v. 7, p. 88-99, 2018. Disponível em: <<http://www.theijes.com/papers/vol7-issue6/Version-1/M0706018899.pdf>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

DESHMUKH, S.; KUMAR, R.; BALA, K. Microalgae biodiesel: A review on oil extraction, fatty acid composition, properties and effect on engine performance and emissions. **Fuel processing technology**, v. 191, p. 232-247, 2019. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/333032273_Microalgae_biodiesel_A_review_on_oil_extraction_fatty_acid_composition_properties_and_effect_on_engine_performance_and_emissions>. Acesso em: 22 nov. 2019.

DÍAZ, G. C. et al. Primary Separation of Antioxidants (Unsaponifiables) the Wet Biomass Microalgae *Chlamydomonas* sp. and Production of the Biodiesel. **Natural Science**, v. 6, n. 15, p. 1210, 2014. Disponível em: <https://file.scirp.org/pdf/NS_2014093013351579.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2019.

DRAGONE, G. et al. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. **Applied Energy**, v. 88, p. 3331-3335, 2011. <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.990.1385&rep=rep1&type=pdf>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

ENAMALA, M. K. et al. Production of biofuels from microalgae: a review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 94, p. 49-68, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032118303551>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

FONTANA, J. D. O DUELO SOJA versus MICRO-ALGAS no BIODIESEL BRASILEIRO e INTERNACIONAL. **Biodiesel**, 2011. Disponível em: <<https://www.biodieselbr.com/noticias/colunistas/convidado/duelo-soja-versus-micro-algas-biodiesel-brasileiro-internacional-260111>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

GARCÍA, J. M. R.; FERNÁNDEZ, F. G A.; SEVILLA, J. M. F. Development of a process for the production of l-amino-acids concentrates from microalgae by enzymatic hydrolysis. **Bioresource technology**, v. 112, p. 164-170, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22418080>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

GREENWELL, H. C. et al. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. **Journal of the royal society interface**, v. 7, n. 46, p. 703-726, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2874236/>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

GRIMA, E. M. et al. Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, n. 9, p. 955-959, 1994.

HAHN, B. et al. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 74, n. 5, p. 937-953, 2007.

HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. **Bioresource technology**, v. 102, n. 1, p. 178-185, 2011.

HIRATA, S. et al. Carbon dioxide fixation in batch culture of *Chlorella* sp. using a photobioreactor with a sunlight-collection device. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 81, n. 5, p. 470-472, 1996. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=JP9607483>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

KIM, D. G. et al. Harvest of *Scenedesmus* sp. with bioflocculant and reuse of culture medium for subsequent high-density cultures. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3163-3168, 2011. Disponível em: <<http://europemc.org/abstract/med/21094603>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

KOCHEM, L. H. **Caracterização de fotobiorreator air-lift para cultivo de microrganismos**. Trabalho de conclusão do curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/35198/000792984.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

KOYANDE, A. K. et al. Microalgae: a potential alternative to health supplementation for humans. **Food Science and Human Wellness**, v. 8, n. 1, p. 16-24, 2019. Disponível em: <<https://pubag.nal.usda.gov/catalog/6342920>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

LAM, M. K.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Current status and challenges on microalgae-based carbon capture. *International Journal of Greenhouse gas control*, v. 10, p. 456-469, 2012.

LEE, J. et al. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource technology**, v. 101, n. 1, p. 75-77, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19386486>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

LIU, K. Characterization of ash in algae and other materials by determination of wet acid indigestible ash and microscopic examination. **Algal research**, v. 25, p. 307-321, 2017.

LÓPEZ, C. V. G. et al. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. **Bioresource technology**, v. 101, n. 19, p. 7587-7591, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20494571>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

LUPATINI, A. L. et al. **Extração de proteínas e carboidratos da biomassa de *Spirulina platensis* e caracterização da fração proteica**. 2016. Dissertação (Mestrado)

em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Paraná, 2016. Disponível em:
<http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/2180/1/MD_PPGTA_M_Lupatini%2C%20Anne%20Luize_2016.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2019.

MARTÍN-JUÁREZ, J. et al. Breakthroughs in bioalcohol production from microalgae: Solving the hurdles. *In*: _____. **Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts**. Woodhead Publishing, 2017. p. 183-207.

MARTINS, R. C.; SILVA, C. L. M. Modelling colour and chlorophyll losses of frozen green beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). **International Journal of Refrigeration**, v. 25, n. 7, p. 966-974, 2002.

MATOS, Â. P. et al. CULTIVATION OF *Chlorella vulgaris* IN MEDIUM SUPPLEMENTED WITH DESALINATION CONCENTRATE GROWN IN A PILOT-SCALE OPEN RACEWAY. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 1183-1192, 2018. Disponível em:
<<http://www.scielo.br/pdf/bjce/v35n4/0104-6632-bjce-35-04-1183.pdf>>. Acesso em: 21/11/2019.

MENEGAZZO, M. L.; FONSECA, G. G. Biomass recovery and lipid extraction processes for microalgae biofuels production: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 107, p. 87-107, 2019. Disponível em:
<<https://ideas.repec.org/a/eee/rensus/v107y2019icp87-107.html>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

MENG, Xin et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable energy**, v. 34, n. 1, p. 1-5, 2009.

MUSSATTO, S. I. et al. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 817-830, 2010. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20630488>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010040422010000700023&script=sci_abstract&tlng=ES>. Acesso em: 22 nov. 2019.

OILGAE. **Biodiesel from Algae**. 2012. Disponível em:
<<http://www.oilgae.com/algae/oil/biod/biod.html>>. Acesso em: 29 nov. 2019.

PATIL, J. A.; HONAGUNTIKAR, P. An Overview on developments in biodiesel 11 production from algae. **International Journal of Science and Research**, v. 3, n. 12, p. 102–106, 2014.

PEDROSO, N. M. V. Papel da membrana plasmática na adaptação de *Saccharomyces cerevisiae* ao H₂O₂. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Faculdade de Lisboa, Lisboa, 2009. Disponível em:

<https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/1600/1/17504_TESE_FINALacrobat.pdf>.
Acesso em: 22 nov. 2019.

PEREIRA, C. M. P. et al. Biodiesel derived from microalgae: advances and perspectives. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2013-2018, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010040422012001000022&script=sci_abstract> . Acesso em: 22 nov. 2019.

PEREIRA, M. I. B. **Avaliação do cultivo mixotrófico da spirulina platensis (arthrospira platensis) utilizando soro de queijo mozzarella de búfala como fonte de carbono orgânico**. 2017. Dissertação (Mestrado em produção animal) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2017. Disponível em: <<https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/26325>>. Acesso em: 03 dez. 2019.

PETKOV, G. et al. A critical look at the microalgae biodiesel. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 114, n. 2, p. 103-111, 2012.

ŘEZANKA, T. et al. Natural microbial UV radiation filters: mycosporine-like amino acids. **Folia microbiologica**, v. 49, n. 4, p. 339-352, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15530001>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

RYCKEBOSCH, E. et al. Influence of drying and storage on lipid and carotenoid stability of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 20, p. 11063-11069, 2011.

RODOLFI, L. et al. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and bioengineering**, v. 102, n. 1, p. 100-112, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18683258>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

ROOSTAEI, J. et al. Mixotrophic Microalgae Biofilm: A Novel Algae Cultivation Strategy for Improved Productivity and Cost-efficiency of Biofuel Feedstock Production. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 125-128, 2018.

SCHROEDER, L. **Obtenção de ácidos graxos de biomassa úmida de microalgas através de saponificação**. 2013. 90f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/35116>>. Acesso em: 21 nov. 2019.

SERRATO, A. G. Extraction of oil from soybeans. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 58, n. 3, p. 157-159, 1981. Disponível em: <<https://aocs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1007/BF02582327>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

SHIN, H. et al. Lipid extraction from *Scenedesmus* sp. microalgae for biodiesel production using hot compressed hexane. **Fuel**, v. 130, p. 66-69, 2014. Disponível em: <https://uknowledge.uky.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1016&context=caer_facpub>. Acesso em: 22 nov. 2019.

SILVA, G. S. **Extração do óleo de microalgas para produção de biodiesel**. 2013. 89 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/33351>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

SILVA, C. E. F. et al. A systematic study regarding hydrolysis and ethanol fermentation from microalgal biomass. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 14, p. 172-182, 2018.

SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 fatty acids in wild plants, nuts and seeds. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 11, p. 163-173, 2002. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1440-6047.11.s.6.5.x>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

SOLOMONS, T. W. G; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002.

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16569602>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

SUAREZ, P. A. Z et al. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Quím. Nova**, v. 32, n. 3, p. 768-775, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422009000300020&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 22 nov. 2019.

TAKEDA, H. Cell wall sugars of some Scenedesmus species. **Phytochemistry**, v. 42, n. 3, p. 673-675, 1996. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0031942295009523>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

TIBBETTS, S. M. et al. Biochemical characterization of microalgal biomass from freshwater species isolated in Alberta, Canada for animal feed applications. **Algal research**, v. 11, p. 435-447, 2015. Disponível em: <<https://nrcpublications.canada.ca/eng/view/accepted/?id=8213ff06-6821-4372-89dd-7fbeba7929d2>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

TREVAN, M. D. et al. **Biotecnologia: princípios biológicos**. Zaragoza: Acribia, 1990.

TULASHIE, S. K.; SALIFU, S. Potential production of biodiesel from green microalgae. **Biofuels**, p. 1-8, 2017. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17597269.2017.1348188>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

ULLOA, G. et al. On the double role of surfactants as microalgae cell lysis agents and antioxidants extractants. **Green Chemistry**, v. 14, n. 4, p. 1044-1051, 2012. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/gc/c2gc16262h#!divAbstract>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

VAN DER LAAK, W. W. M.; RAVEN, R. P. J. M.; VERBONG, G. P. J. Strategic niche management for biofuels: Analysing past experiments for developing new biofuel policies. *Energy Policy*, v. 35, n. 6, p. 3213-3225, 2007.

VIEGAS, C. V. Extração e caracterização dos lipídeos da microalga *Chlorella pyrenoidosa* visando à produção de ésteres graxos. 2010. Dissertação (Mestrado em Química tecnológica e Ambiental) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2010. Disponível em: <<http://repositorio.furg.br/handle/1/6328>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

VIEGAS, C. V. et al. Algal products beyond lipids: Comprehensive characterization of different products in direct saponification of green alga *Chlorella* sp. **Algal research**, v. 11, p. 156-164, 2015. Disponível em: <<https://pubag.nal.usda.gov/catalog/5355265>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

WANG, Z. et al. Selection of microalgae for simultaneous biogas upgrading and biogas slurry nutrient reduction under various photoperiods. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 91, n. 7, p. 1982-1989, 2016.

YANG, F. et al. A novel lipid extraction method from wet microalga *Picochlorum* sp. at room temperature. **Mar drugs**, v. 12, n. 3, p. 1258-1270, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3967208/>>. Acesso em: 22 nov. 2019.