

LORENA BORGES MARTINS

**EXTRAÇÃO INTEGRADA DE CARBOIDRATOS E
LIPÍDEOS PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL E
BIODIESEL A PARTIR DA MICROALGA *Chlorella* sp.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

M386e
2018
Martins, Lorena Borges, 1991-
Extração integrada de carboidratos e lipídeos para a produção de
bioetanol e biodiesel a partir da microalga *Chlorella* sp. / Lorena
Borges Martins. - Viçosa, MG, 2018.
xi, 73 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Marcio Arêdes Martins.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 56-67.

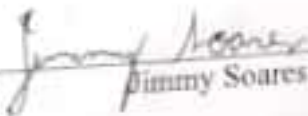
1. Hidrólise. 2. Microalgas. 3. Extração (Química).
4. Biorrefinarias. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Química. II. Título.

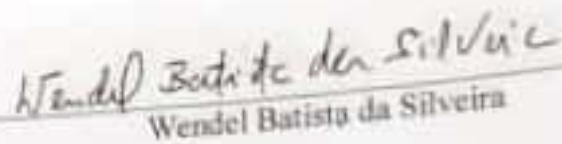
CDD 22. ed. 547.2

EXTRAÇÃO INTEGRADA DE CARBOIDRATOS E LIPÍDEOS PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL E BIODIESEL A PARTIR DA MICROALGA *Chlorella* sp.

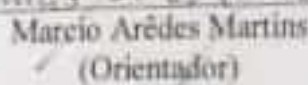
Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Viçosa, como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Química, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de novembro de 2018.


Jimmy Soares


Wendel Batista da Silva


Rita de Cássia Superbi de Sousa


Marcio Arêdes Martins
(Orientador)

*“É preciso força
para sonhar e perceber
que a estrada vai
além do que se vê”
Marcelo Camelo*

Aos meus amados pais e irmã.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me permitir alcançar mais essa conquista.

Aos meus pais Luiz e Lusia, pelo apoio incondicional e por sempre investirem e acreditarem em mim.

A minha irmã pelo carinho e amizade, e por me lembrar que não estou sozinha.

Aos meus amigos por tornarem os meus dias mais alegres e por serem apoio nos momentos difíceis.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PPGENq), pela oportunidade dada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Petrobras pelo financiamento à pesquisa e infraestrutura laboratorial.

Ao Professor Marcio Arêdes pela orientação, confiança, ensinamentos e oportunidades concedidas.

Aos demais membros da banca examinadora, professor Wendel Silveira, professora Rita Superbi e doutor Jimmy Soares por fazerem parte da conclusão de mais essa etapa.

À querida Auxiliadora Martins, por me auxiliar em diferentes análises fora do Laboratório de Biocombustíveis.

A Raquel, pelo carinho e alegria levados ao laboratório todos os dias.

Aos demais colegas do Laboratório de Biocombustíveis: Bruno, Paula, Dilson, Javier, Andry, Gerson, Daniel, Manu, Matheus, Rúben e Maurício, por toda a ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Serviço de Vigilância do Campus Viçosa, por me atender e zelar pela minha segurança nas vezes que precisei sair do Laboratório de Biocombustíveis tarde da noite.

Ao Higor, obrigada pelo carinho, enorme ajuda, palavras de motivação e por me lembrar de que eu sou capaz. Sua amizade foi fundamental nesta jornada.

À Jéssica e Bruna, obrigada pela convivência, conversas e distrações que me proporcionaram em nossa república.

A todos que de um modo geral, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho e para minha formação acadêmica, muito obrigada!

BIOGRAFIA

LORENA BORGES MARTINS, filha de Luiz Antônio Martins e Lusía Lusimar Borges Martins, nasceu em Guarapari, Estado do Espírito Santo, em 09 de junho de 1991.

Em março de 2009 iniciou o Curso de Engenharia Química na Universidade Federal do Espírito Santo, graduando-se em janeiro de 2015.

Em agosto de 2016, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Processos Industriais e Biocombustíveis, concluindo-o em novembro de 2018.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Microalgas.....	3
2.2. Composição de carboidratos em microalgas.....	5
2.3. Composição de lipídeos em microalgas	7
2.4. Extração de lipídeos para produção de biodiesel	8
2.5. Síntese e qualidade do biodiesel.....	9
2.6. Processo de produção de bioetanol a partir de microalgas	10
2.6.1. Hidrólise química e enzimática de microalgas	11
2.6.2. Fermentação	12
2.7. Produção integrada de biodiesel e bioetanol a partir de microalgas	14
3. OBJETIVOS.....	16
3.1. Objetivo Geral.....	16
3.2. Objetivos Específicos	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1. Seleção de microalgas	17
4.2. Métodos analíticos.....	19
4.2.1. Determinação do teor de biomassa seca livre de cinzas	19
4.2.2. Quantificação de lipídeos totais	19
4.2.3. Caracterização de lipídeos	20
4.2.4. Determinação do teor de lipídeos neutros por espectrofluorescência	20
4.2.5. Determinação do perfil de monossacarídeos	21
4.2.6. Determinação de carboidratos neutros totais	21

4.2.7. Extração e quantificação de amido	21
4.2.8. Determinação de proteínas solúveis totais	22
4.3. Extração de lipídeos totais	22
4.4. Hidrólise da biomassa algal	23
4.5. Otimização da hidrólise ácida	24
4.6. Extração integrada de carboidratos e lipídeos de <i>Chlorella</i> sp.	25
4.7. Análise estatística	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1. Seleção de microalgas	26
5.1.1. Hidrólise ácida de biomassa algal	26
5.1.2. Conteúdo de amido de <i>Chlorella</i> sp. e <i>S. obliquus</i> BR003	27
5.1.3. Extração de lipídeos	29
5.1.3.1. Efeito do número dos estágios de extração no teor de lipídeos	29
5.1.3.2. Extração de lipídeos totais de <i>Chlorella</i> sp.	31
5.1.3.3. Perfil de ácidos graxos dos lipídeos de <i>Chlorella</i> sp.	34
5.2. Caracterização da biomassa de <i>Chlorella</i> sp.	38
5.3. Otimização da hidrólise ácida de <i>Chlorella</i> sp.	39
5.4. Extração integrada de carboidratos e lipídeos de <i>Chlorella</i> sp.	46
5.4.1. Conteúdo de lipídeos na biomassa residual e fase aquosa pós hidrólise	47
5.4.2. Rotas de extração de carboidratos e lipídeos de <i>Chlorella</i> sp.	49
5.4.3. Composição de ácidos graxos de <i>Chlorella</i> sp.	53
6. CONCLUSÃO	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
ANEXO I – CARACTERIZAÇÃO DE MONOSSACARÍDEOS POR	
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE	68
ANEXO II – VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE CARACTERIZAÇÃO DE	
CARBOIDRATOS NEUTROS TOTAIS	69
ANEXO III – CROMATOGRAMAS.....	71
ANEXO IV – COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE GORDURA ANIMAL.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Rotas de armazenamento de carbono e energia em células de microalgas e potencial produção de biocombustíveis..	4
Figura 2: Reação geral de transesterificação de triglicerídeos a biodiesel.	10
Figura 3: Esquema geral das rotas utilizadas para a extração integrada de lipídeos e carboidratos a partir da biomassa de microalgas.	17
Figura 4: Efeito da concentração de sólidos na hidrólise ácida de <i>S. obliquus</i> BR003 e <i>Chlorella</i> sp. Condições: H ₂ SO ₄ 1 mol L ⁻¹ , 60 minutos e 100 °C.	27
Figura 5: Conteúdo de amido de <i>Chlorella</i> sp. e <i>S. obliquus</i> BR003.	28
Figura 6: Teor de lipídeos totais extraídos de <i>S. obliquus</i> BR003 em diferentes estágios de extração para os sistemas etanol : hexano nas razões de 1:4, 1:3 e 1:2.	31
Figura 7: Teor de lipídeos totais extraídos de <i>Chlorella</i> sp. utilizando os diferentes sistema de extração: Schmid-Bondzynski-Ratzlaff, Bligh & Dyer e etanol:hexano.	32
Figura 8: Teor de lipídeos totais para 4 estágios de extração para os sistemas (a) Schmid-Bondzynski-Ratzlaff, (b) Bligh & Dyer e (c) etanol:hexano (1:2) de <i>Chlorella</i> sp.	33
Figura 9: Superfícies de resposta para o rendimento de carboidratos neutros totais na hidrólise ácida de <i>Chlorella</i> sp. variando (a) tempo e temperatura, (b) tempo e concentração de H ₂ SO ₄ , (c) concentração de biomassa e temperatura, (d) concentração de H ₂ SO ₄ e biomassa, (e) concentração de H ₂ SO ₄ e temperatura e (f) concentração de biomassa e tempo.	43
Figura 10: Efeito da concentração de H ₂ SO ₄ na hidrólise de <i>Chlorella</i> sp. A hidrólise ácida foi realizada em autoclave a 121 °C, por 30 minutos, utilizando uma carga de sólidos de 50 g L ⁻¹ .	45
Figura 11: Fluxograma do processo de extração integrada de lipídeos e carboidratos de <i>Chlorella</i> sp. (a) Rota 1: extração de lipídeos – hidrólise ácida; (b) Rota 2: hidrólise ácida – extração de lipídeos.	46
Figura 12: Conteúdo de amido da biomassa intacta e das biomassas residuais, obtidas nos processos da Rota 1 (extração de lipídeos – hidrólise ácida) e Rota 2 (hidrólise ácida – extração de lipídeos).	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação de fontes de matéria-prima para produção de biodiesel e bioetanol.	2
Tabela 2: Composição de diferentes espécies de microalgas em base de massa seca.	4
Tabela 3: Conteúdo de carboidratos em diferentes espécies de microalgas.	6
Tabela 4: Comparação de métodos de extração integrada de lipídeos e carboidratos e respectivo rendimento em bioetanol.	15
Tabela 5: Formulação do meio de cultura L4 modificado.	18
Tabela 6: Sistemas de extração de lipídeos totais de <i>S. obliquus</i> BR003.	23
Tabela 7: Delineamento composto central para a análise do rendimento de carboidratos neutros totais na hidrólise de <i>Chlorella</i> sp.	24
Tabela 8: Teor de lipídeos totais extraídos de <i>S. obliquus</i> BR003 utilizando etanol e hexano.	30
Tabela 9: Teor de lipídeos totais de <i>Chlorella</i> sp. em sistemas de extração contendo 4 estágios.	32
Tabela 10: Perfil de ácidos graxos de <i>Chlorella</i> sp. obtidos por diferentes misturas de solventes de extração – relação de <i>FAMES</i> (%).	34
Tabela 11: Composição de ácidos graxos do óleo de soja, <i>S. obliquus</i> e diferentes espécies de <i>Chlorella</i>	37
Tabela 12: Composição centesimal de <i>Chlorella</i> sp. (% m m _{MSLC} ⁻¹).	38
Tabela 13: Delineamento composto central, com valores decodificados e resposta experimental observada, rendimento de carboidratos neutros totais (RC, % m m ⁻¹).	40
Tabela 14: Análise de variância do modelo quadrático.	42
Tabela 15: Hidrólise ácida de <i>Chlorella</i> sp. e rendimento carboidratos e lipídeos da fase aquosa e biomassa residual.	47
Tabela 16: Lipídeos neutros totais de <i>Chlorella</i> sp. quantificados por espectroscopia de fluorescência (% m _{lipídeos neutros} m _{lipídeos totais} ⁻¹).	48
Tabela 17: Rendimentos de carboidratos e lipídeos, de <i>Chlorella</i> sp., obtidos via Rotas 1 e 2.	49
Tabela 18: Teores de carboidratos e lipídeos de <i>Chlorella</i> sp., nas fases polar e apolar do sistema Schmid-Bondzynski-Ratzlaff.	52
Tabela 19: Perfil de ácidos graxos dos lipídeos de <i>Chlorella</i> sp. obtidos via Rotas 1 e 2 e respectiva conversão em <i>FAMES</i> (%).	53

RESUMO

MARTINS, Lorena Borges, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2018.
Extração integrada de carboidratos e lipídeos para a produção de bioetanol e biodiesel a partir da microalga *Chlorella* sp. Orientador: Marcio Arêdes Martins.

Estima-se que a população mundial irá exceder 9 bilhões em 2050, aumentando a demanda por energia e contribuindo para a escassez de terras aráveis. A produção em larga escala de combustíveis renováveis é uma alternativa promissora para mitigar a dependência de combustíveis fósseis. Microalgas são capazes de acumular lipídeos e carboidratos, que podem ser convertidos em biodiesel e bioetanol, sendo potenciais candidatas a processos de biorrefinaria. O presente estudo teve por objetivo a extração integrada de carboidratos e lipídeos da microalga *Chlorella* sp. em um conceito de biorrefinaria, em que as rotas de extração de lipídeos-extração de carboidratos (Rota 1) e extração de carboidratos-extração de lipídeos (Rota 2) foram estudadas. A extração de lipídeos com os solventes etanol e hexano foi otimizada quanto à proporção de solventes e o número de estágios necessários para se obter um rendimento eficiente de lipídeos. A extração de carboidratos foi realizada por meio de um delineamento composto central em que os parâmetros temperatura, tempo, concentração de ácido sulfúrico e concentração de biomassa foram otimizados. A extração de lipídeos na proporção 1:2 de etanol e hexano e 4 estágios de extração resultou em 93 % de rendimento. A hidrólise ácida com solução a 5 % (v v⁻¹) de H₂SO₄, 120 °C, 10 minutos e 10 g L⁻¹ de sólidos totais, resultou em um rendimento de 89 % de carboidratos neutros totais. Ambas as condições foram empregadas nas Rotas 1 e 2 e observou-se que o tratamento ácido anterior à extração de lipídeos resultou em um aumento de 49,9 % (Rota 1) para 96,3 % (Rota 2) de lipídeos extraídos e uma maior conversão em *FAMES*. A extração de lipídeos anterior a hidrólise (Rota 1) não degradou os polissacarídeos de reserva e estruturais, porém não contribuiu significativamente para o aumento do rendimento de carboidratos. Portanto, a hidrólise ácida é um fator crucial para o aumento do rendimento de lipídeos e a Rota 2 é uma alternativa promissora para a valorização de lipídeos e carboidratos, para posterior produção de biodiesel e fermentação a bioetanol, respectivamente, em uma biorrefinaria.

ABSTRACT

MARTINS, Lorena Borges, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2018.
Integrated extraction of carbohydrates and lipids to produce bioethanol and biodiesel from microalga *Chlorella* sp. Advisor: Marcio Arêdes Martins.

It is estimated that the world's population will exceed 9 billion by 2050, increasing the demand for energy and contributing to the scarcity of arable land. Large scale production of renewable fuels is a promising alternative to mitigate dependence on fossil fuels. Microalgae are able to accumulate lipids and carbohydrates, which can be converted into biodiesel and bioethanol, being potential candidates for a biorefinery processes. The objective of the present study was the integrated extraction of carbohydrates and lipids from the microalgae *Chlorella* sp. in a biorefinery concept, in which the routes lipid extraction-carbohydrate extraction (Route 1) and carbohydrate extraction-lipid extraction (Route 2) were studied. The extraction of lipids, with the solvents ethanol and hexane, was optimized according to the solvent ratio and the number of stages required to obtain an efficient lipid yield. The extraction of carbohydrates was investigated in a central composite design in which the parameters temperature, time, sulfuric acid concentration and biomass concentration were optimized. Extraction of lipids in the ratio ethanol: hexane (1: 2) and 4 extraction stages resulted in a yield of 93 %. Acid hydrolysis with 5 % (v v⁻¹) H₂SO₄, 120 °C, 10 minutes and a solid load of 10 g L⁻¹ resulted in a yield of 89 % of total neutral carbohydrates. Both conditions were used in the routes and it was observed that the acid treatment given prior to lipid extraction resulted in an increase from 49.9 % (Route 1) to 96.3 % (Route 2) of extracted lipids and a higher conversion in FAMES. Extraction of lipids prior to hydrolysis (Route 1) did not degrade storage and structural polysaccharides, however did not contribute significantly to the increase in carbohydrate yield. Therefore, acid hydrolysis is a crucial factor for the increase of lipid yield and Route 2 is a promising alternative for the valorization of lipids and carbohydrates, for subsequent production of biodiesel and fermentation to bioethanol, respectively, in a biorefinery.

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que a população mundial irá exceder 9 bilhões em 2050, acarretando no aumento da exploração de reservas naturais e demanda por energia, bem como na escassez de terras aráveis (DUTTA, DAVEREY e LIN, 2014). O uso massivo de combustíveis fósseis apresenta consequências como a exaustão de suas reservas, grandes flutuações de preço, impactos no meio ambiente e mudanças climáticas devido emissões de gases de efeito estufa, como o CO₂ (ADENLE, HASLAM e LEE, 2013).

Os biocombustíveis são fontes potenciais para atender a futura demanda energética. Os biocombustíveis de primeira geração já são estabelecidos, a nível comercial, nos EUA, no Brasil e na União Européia. Estes biocombustíveis são principalmente derivados de alimentos, incluindo a cana-de-açúcar, a beterraba, e matrizes oleaginosas (girassol, soja, palma e sebo bovino). Contudo, os biocombustíveis de primeira geração não são capazes de suprir toda a demanda energética e ainda podem competir por insumos e terras agricultáveis, utilizadas na produção de alimentos (ADENLE, HASLAM e LEE, 2013; BRENNAN e OWENDE, 2010). Os biocombustíveis de segunda geração são derivados de fontes de biomassa lignocelulósica e resíduos agrícolas, resíduos de colheita florestal e resíduos de processamento de madeira e componentes não comestíveis de culturas alimentares. Portanto, não competem diretamente com terras aráveis e têm um impacto ambiental menor do que a primeira geração. Contudo, biocombustíveis de segunda geração têm baixas taxas de conversão e os processos de conversão não são economicamente viáveis (ADENLE, HASLAM e LEE, 2013; MILANO et al., 2016).

A produção de microalgas é proposta como uma alternativa para a produção de biocombustíveis. O uso de microalgas possibilita a manutenção dos benefícios da produção de biocombustíveis, de primeira e segunda geração, além de não competir por alimentos e terras aráveis. As microalgas são capazes de acumular lipídeos, carboidratos e proteínas, os quais podem ser convertidos em biocombustíveis como metano, hidrogênio, bioetanol, biodiesel, entre outros (AZMAH et al., 2016).

As microalgas são as principais produtoras de oxigênio da Terra e possuem uma estrutura celular simples. Necessitam de menos água do que plantas vasculares, podendo crescer em condições extremas e assimilam de cinco a sete vezes mais CO₂. As microalgas possuem um baixo teor de hemicelulose e não possuem lignina, podendo ser consideradas uma biomassa ideal para a produção de bioetanol (AZMAH et al., 2016; RAZACK e SURENDHIRAN, 2016). Na Tabela 1 estão apresentados os rendimentos de

biodiesel e bioetanol, oriundos de diferentes matérias-primas, na qual é possível observar que as microalgas apresentam um rendimento superior às outras biomassas.

Tabela 1: Comparação de fontes de matéria-prima para produção de biodiesel e bioetanol.

Biocombustível	Matéria-prima	Rendimento (L ha⁻¹)
Bioetanol	Mandioca	6000
	Milho	3571
	Batata	4167
	Cana-de-açúcar	5882
	Beterraba	5000
	Sorgo sacarino	1235
Biodiesel	Soja	446
	Milho	172
	Jatropha	1892
	Coco	2689
	Palma	5950
	Microalga	136900

Fonte: adaptado de Razack e Surendhiran (2016) e Faried et al. (2017).

Apesar da grande produtividade em óleo de algumas espécies, ainda é pouco provável que o cultivo de microalgas, dedicado exclusivamente para a produção de lipídeos, seja comercialmente competitivo em relação aos combustíveis fósseis. Diminuir custos de cultivo e colheita pode resultar em uma redução dos custos de produção, porém é possível reduzi-los ainda mais por meio da utilização e valorização mais completa de todos os componentes celulares (carboidratos, proteínas e lipídeos) das microalgas (FOLEY, BEACH e ZIMMERMAN, 2011; LAURENS et al., 2015).

A extração e fracionamento dos componentes celulares de microalgas, preservando suas propriedades bioquímicas, é o principal gargalo em processos de biorrefinaria (CHEW et al, 2017). Portanto, para promover a sustentabilidade deste processo, o presente trabalho tem por objetivo a implementação de uma estrutura de biorrefinaria, para a extração integrada de carboidratos e lipídeos e posterior produção de bioetanol e biodiesel, principais combustíveis de interesse.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Microalgas

Algas são organismos fotossintéticos e podem ser tanto unicelular (microalgas) ou multicelular (macroalgas). Microalgas são seres microscópicos, com células medindo entre 2 e 200 μm , possuem estrutura simples e podem ser encontradas tanto em ambientes marinhos como em água doce ou residuária. Devido ao alto teor de lipídeos, microalgas comumente flutuam na coluna de água, enquanto macroalgas encontram-se ligadas a rochas ou outras estruturas aquáticas (MENETREZ, 2012). Por meio da fotossíntese, as microalgas utilizam energia solar juntamente com outros fatores como nutrientes e CO_2 para produção de lipídeos e carboidratos de maneira mais eficiente que plantas vasculares (BRENNAN e OWENDE, 2010; HANNON et al., 2010; MUTANDA et al., 2011).

Durante a fotossíntese, as microalgas produzem o monossacarídeo glicose, que é utilizado como fonte de energia, e carbono, para a produção de proteínas, lipídeos e outros carboidratos. Neste processo, quando a irradiância é muito elevada ou quando fontes inorgânicas são limitadas (*e. g.* condições de estresse de nitrogênio), a taxa de produção de glicose pode exceder a taxa de consumo pela célula, ocasionando em um excesso de glicose intracelular, que não pode ser armazenado, causando distúrbios no balanço osmótico da célula. Desta forma, a glicose pode ser convertida em polissacarídeos e em lipídeos. A conversão em polissacarídeos ocorre em taxas mais rápidas do que a conversão em lipídeos, portanto, microalgas tendem a acumular primeiro carboidratos e posteriormente lipídeos (HO; CHEN; CHANG, 2012; MARTÍN-JUÁREZ et al., 2017). A Figura 1 resume as rotas de armazenamento de carbono e energia em células de microalgas.

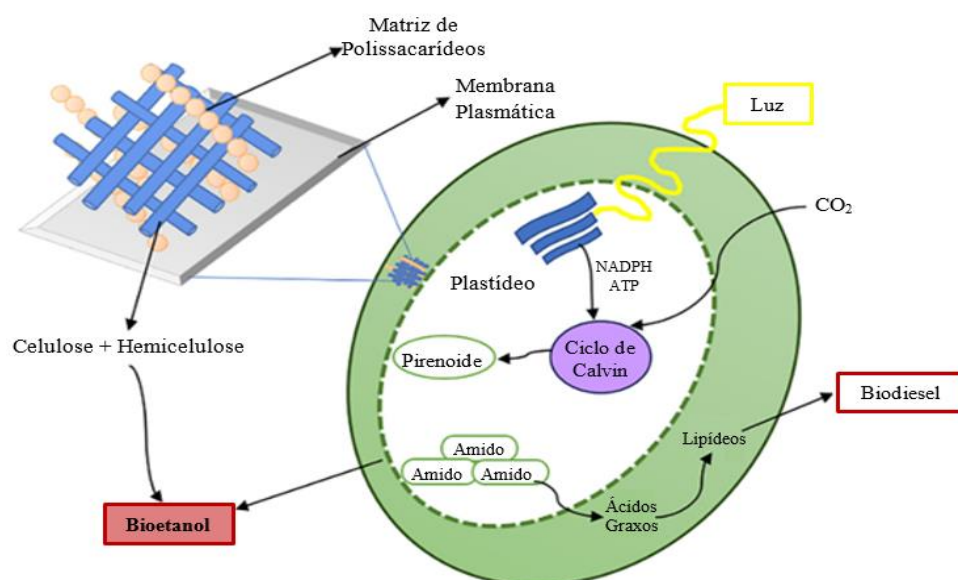


Figura 1: Rotas de armazenamento de carbono e energia em células de microalgas e potencial produção de biocombustíveis. Fonte: adaptado de Martín-Juárez et al. (2017).

Observa-se um crescimento substancial de pesquisas utilizando microalgas como fonte de matéria-prima energética, para a produção de bioetanol e biodiesel. Microalgas do filo *Chlorophyta* são conhecidas por apresentarem as maiores taxas de crescimento dentre as demais microalgas. Neste filo, as espécies dos gêneros *Chlorella*, *Desmodesmus* e *Scenedesmus* têm sido exploradas como fontes potenciais para a produção de lipídeos (MATA et al., 2010). Os gêneros *Chlorella* sp., *Dunaliella* sp., *Chlamydomonas* sp. e *Scenedesmus* sp. são comumente selecionadas para a produção de bioetanol, devido ao alto teor de carboidratos (RAZACK e SURENDHIRAN, 2016). A Tabela 2 apresenta a composição de diferentes espécies de microalgas potenciais para aplicações biotecnológicas.

Tabela 2: Composição de diferentes espécies de microalgas em base de massa seca.

Espécie	Composição (% m m ⁻¹)		
	Proteína	Carboidrato	Lipídeo
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	41-58	12-17	10-22
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Prymnesium parvum</i>	28-45	25-33	22-39
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14

Fonte: Azmah et al. (2016)

O potencial para a produção de outros produtos além de biocombustíveis vem sendo amplamente explorado. Microalgas podem acumular quantidades significativas de macro e micronutrientes, e produzir proteínas, pigmentos, antioxidantes, vitaminas, sais-minerais, carotenoides, *PUFAs* (do inglês *polyunsaturated fatty acids* ou *PUFAs*), esteróis e polissacarídeos, a depender do gênero e das condições de cultivo. O aumento da população mundial é proporcional à demanda por proteína. Microalgas podem ser alternativas para fontes de proteínas para alimentação no futuro, uma vez que avaliações nutricionais e toxicológicas já demonstraram que a biomassa de algas se adequa como um suplemento alimentar ou substituto de fontes proteicas convencionais como farelo de soja, farinha de peixe, farelo de arroz, etc. (BECKER, 2007; VIGANI et al., 2015; SUGANYA et al., 2016b; GROSSMANN et al., 2018).

O gênero *Chlorella* sp., especificadamente, vem sendo explorado comercialmente como fonte de lipídeos insaturados, sendo um produto nutracêutico aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária no Brasil e pela *Food and Drug Administration* nos Estados Unidos. Adicionalmente, esta microalga é vendida como alimento saudável ou suplemento dietético, sendo eficaz no tratamento de úlceras gástricas e feridas, além de possuir ação preventiva contra o colesterol elevado e apresentar atividade antitumoral (SUGANYA et al., 2016b). Destaca-se que este gênero de microalgas é o mais consumido e cultivado, e apresenta grande potencial de mercado para a produção de alimentos com alta carga proteica (BECKER, 2007; VIGANI et al., 2015).

2.2. Composição de carboidratos em microalgas

Os carboidratos estão presentes nas células de microalgas desempenhando diversas funções. Pode-se destacar a função estrutural, na parede celular, e também de reserva, na forma de amido (Figura 1). A composição da parede celular externa das microalgas varia entre espécies, contendo geralmente polissacarídeos específicos, como pectina, ágar e alginatos. Por sua vez, a parede celular interna é composta principalmente por celulose e outros compostos, como hemicelulose e glicoproteínas. O amido é o principal polissacarídeo de reserva e, juntamente com os carboidratos da parede celular, podem ser hidrolisados a monossacarídeos para subsequente fermentação (CHEN et al., 2013; MARTÍN-JUÁREZ et al., 2017). A Tabela 3 apresenta o conteúdo de carboidratos de diferentes espécies de microalgas. Observa-se que os gêneros *Chlorella* e *Scenedesmus* possuem maiores concentrações de carboidratos, apresentando grande potencial para a produção de bioetanol.

Tabela 3: Conteúdo de carboidratos em diferentes espécies de microalgas.

Microalga	Conteúdo de carboidratos (% m m ⁻¹)
<i>Chlorella vulgaris</i>	21
<i>Chlorella</i> sp.	19,5
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	17
<i>Scenedesmus obliquus</i>	10-17
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	21-52
<i>Euglena gracilis</i>	14-18
<i>Tetraselmis</i> sp.	15-24

Fonte: adaptado de Phwan et al. (2018)

O amido, armazenado por algas verdes, consiste em um polímero insolúvel e de cadeia longa, apresentando entre 10⁵ e 10⁶ unidades de glicose, as quais compõem os polissacarídeos amilose e amilopectina. A amilose consiste em uma cadeia reta, não ramificada, em que moléculas de glicose estão unidas por ligações α -1,4-glicosídicas. A amilopectina, por sua vez, contém ramificações, sendo menos hidrossolúvel que a amilose, e é constituída de unidades de glicose unidas por ligações α -1,4 e α -1,6-glicosídicas. Estes polímeros de glicose formam hélices, que se alinham e formam estruturas semicristalinas (MARTÍN-JUÁREZ et al., 2017).

A glicose também pode ser encontrada na parede celular da maioria das microalgas, compondo os polissacarídeos celulose e hemicelulose. A celulose é composta por unidades de glicose unidas por meio de ligações β -1,4-glicosídicas, formando múltiplas cadeias de celulose, que são ligadas por ligações de hidrogênio, formando uma estrutura cristalina, complexa e resistente à degradação enzimática. A hemicelulose, também presente na parede celular interna, é um polissacarídeo composto por diferentes monossacarídeos, tais como manose, xilose, galactose, ramnose e arabinose. Estes monossacarídeos estão unidos por ligações β -1,4-glicosídicas e, ocasionalmente, por ligações β -1,3-glicosídicas. Adicionalmente, a parede celular também apresenta uma matriz de polissacarídeos que inclui polissacarídeos sulfatados em algas vermelhas (ágar e carragenina), polissacarídeos contendo ácidos urônicos em algas pardas (alginato) e aminoaçúcares (TEMPLETON et al., 2012; CHENG; LABAVITCH; VANDERGHEYNST, 2015; ORTIZ-TENA et al., 2016).

A parede celular das microalgas pode exibir alta complexidade de cristalinidade, contendo polímeros não polissacarídicos, como o algenano que é um composto semelhante a cutina. Essa complexidade torna a parede celular das microalgas recalcitrante. A lignina, presente em plantas vasculares, é um polímero hidrofóbico e heterogêneo e a sua despolimerização resulta na produção de inibidores de fermentação.

Entretanto, a ausência de lignina em microalgas, torna o processo de lise celular menos complexo que em células vegetais, e portanto, mais rentável (MARTÍN-JUÁREZ et al., 2017).

2.3. Composição de lipídeos em microalgas

Lipídeos podem ser definidos como qualquer molécula biológica solúvel em solvente orgânico, constituídos de ácidos graxos saturados ou insaturados. Os lipídeos produzidos por microalgas geralmente incluem lipídeos neutros e polares, ceras, esteróis e hidrocarbonetos, além de outras moléculas, como tocoferóis, carotenóides, terpenos, quininos e clorofilas. Os lipídeos são agrupados em duas categorias: lipídeos de reserva (neutros) e lipídeos estruturais (polares) (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012; SHARMA; SCHUHMANN; SCHENK, 2012).

Lipídeos de reserva ou neutros são ácidos graxos majoritariamente presentes na forma de triacilgliceróis (TAGs). Os TAGs são compostos, predominantemente, por ácidos graxos saturados e, em menor parte, por ácidos graxos insaturados e ambos podem ser transesterificados à biodiesel. Alguns lipídeos neutros, como hidrocarbonetos, esteróis, cetonas e pigmentos (carotenoides e clorofila), não contêm ácidos graxos. Apesar destas frações lipídicas serem solúveis em solvente orgânico, as mesmas não podem ser convertidas em biodiesel (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012; SHARMA; SCHUHMANN; SCHENK, 2012).

Lipídeos estruturais ou polares geralmente apresentam um alto teor de ácidos graxos poli-insaturados (*PUFAs*, do inglês *polyunsaturated fatty acids*) e são constituídos de fosfolipídeos, glicolipídeos e esteróis. Os lipídeos estruturais são importantes componentes da membrana celular e atuam como uma barreira de permeabilidade seletiva para células e organelas (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012; SHARMA; SCHUHMANN; SCHENK, 2012).

A composição dos ácidos graxos em microalgas é diferente da composição dos mesmos em plantas vasculares, e varia de acordo com a espécie e condições de cultivo, como composição do meio, temperatura, intensidade de iluminação, ciclo claro/escuro e taxa de aeração (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012). Em especial, o óleo de microalgas contém um elevado teor de ácidos graxos insaturados, com quatro ou mais ligações duplas (MUTANDA et al., 2011). A composição de ácidos graxos desempenha papel importante na qualidade do biodiesel. Portanto, a caracterização dos lipídeos em microalgas é essencial para assegurar que o biodiesel estará em conformidade com as

especificações das agências reguladoras de biocombustíveis.

2.4. Extração de lipídeos para produção de biodiesel

Microalgas podem ser usadas como matéria-prima para a produção de biodiesel, pois podem fornecer alta fração de lipídios neutros, com menor grau de insaturação. Isso faz com que os lipídeos microalgais sejam um potencial substituto para o diesel ou para biodiesel de primeira geração (HARUN et al., 2010).

Previamente à transesterificação para produção de biodiesel, a extração e refino do óleo deve ser realizada. Para extrair os lipídeos de microalgas, após a colheita e separação, a biomassa úmida deve ser seca e, em seguida, pré-tratada. O pré-tratamento aumenta a eficiência da extração ao romper as células e liberando os lipídeos, fato que aumenta o rendimento total (BAHADAR e KHAN, 2013). Diferentes técnicas de extração têm sido usadas em microalgas, como prensagem, extração líquido-líquido (extração com solvente), extração de fluido supercrítico e extração ultrassônica assistida (HARUN et al., 2010). A extração líquido-líquido é uma das operações unitárias mais utilizadas para a extração de lipídeos da biomassa algal devido à alta seletividade e solubilidade dos solventes em relação aos lipídeos, de modo que os lipídeos contidos no citoplasma são extraídos por difusão através da parede celular (RANJAN, PATIL e MOHOLKAR, 2010).

O mecanismo da extração por solvente pode ser dividida em quatro etapas: (1) microalgas são expostas aos solventes, que penetram na membrana celular até o citoplasma; (2) solventes interagem com lipídeos neutros via forças de Van de Waals formando um agregado solvente-lipídeo; (3) este agregado atravessa a membrana celular por difusão, de modo que lipídeos neutros ficam na fase orgânica enquanto água e demais metabólitos (carboidratos e proteínas) ficam na fase aquosa; (4) a fase orgânica é então separada e os lipídeos são transesterificados para produzir biodiesel (HALIM, DANQUAH e WEBLEY, 2012).

Para que a extração seja eficiente, deve-se selecionar um solvente adequado para a obtenção dos componentes de interesse. O mesmo deve ser preferencialmente estável, não tóxico, de baixo custo e de fácil recuperação (MOLINA GRIMA, GONZÁLEZ e GIMÉNEZ, 2013). Os solventes comumente usados na extração de lipídeos de microalgas são hexano, metanol, etanol, acetona e uma mistura de metanol-clorofórmio (2:1 v v⁻¹). O uso de metanol e clorofórmio foi proposto por Bligh e Dyer (1959), sendo considerado o método de extração de lipídeos mais eficiente para diferentes espécies de microalgas

dos gêneros *Scenedesmus*, *Chlorella* e *Botryococcus* (HARUN et al., 2010; LAM e LEE, 2012).

O uso de solventes requer baixa utilização de energia e apresenta elevado potencial de aplicação em indústria, entretanto, este método de extração apresenta algumas desvantagens como toxicidade humana e ambiental, alta inflamabilidade dos compostos envolvidos e degradação dos lipídeos (CHEW et al., 2017). Solventes como clorofórmio e metanol afetam a qualidade do produto ao dissolver compostos indesejados (e. g. clorofila) durante o processo de extração. Consequentemente, os lipídeos extraídos se deterioram, comprometendo a qualidade do óleo, o que impede a eficiência do processo em termos de custo em uma biorrefinaria. Assim, sistemas de solventes que sejam sustentáveis, não tóxicos e produzam maior conteúdo lipídico sem interferência de compostos não lipídicos devem ser considerados (JEEVAN KUMAR et al., 2017). Neste contexto, o etanol emergiu como um solvente sustentável derivado de fontes renováveis de primeira e segunda geração. No entanto, seu uso para extração de lipídeos apresenta baixa eficiência, principalmente porque etanol forma uma mistura azeotrópica (com 5 % de água) e a presença de água no processo possivelmente limita o rendimento da extração (LAM e LEE, 2012). Santos et al., (2015), porém, destacam que, em sua forma anidra, o etanol é capaz de extrair lipídeos de pinhão manso (*Jatropha curcas*), desde que isenta de umidade.

2.5. Síntese e qualidade do biodiesel

O biodiesel é produzido a partir da transesterificação de triglicerídeos, com metanol em excesso, em catálise alcalina. Essa reação produz ésteres metílicos de ácidos graxos (*FAMES*, do inglês *fatty acid methyl esters*) e glicerol. Geralmente, catalisadores alcalinos, como hidróxidos de sódio e potássio, são empregados para aumentar a conversão e reduzir o tempo de reação. Entretanto, a presença de ácidos graxos livres inibe a reação, já que estes reagem com os catalisadores alcalinos e os saponificam, impedindo a separação do biodiesel e glicerol (BAICHA et al., 2016). Em escala comercial, este é o método predominante para a produção de biodiesel (SUGANYA et al., 2016b). A reação geral de transesterificação está apresentada na Figura 2.

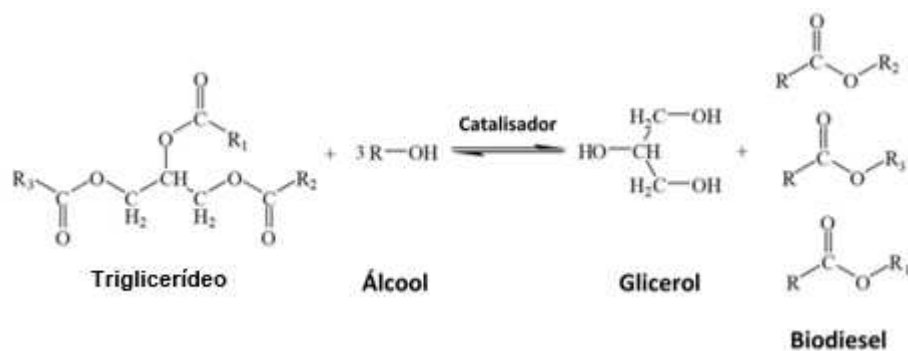


Figura 2: Reação geral de transesterificação de triglicerídeos a biodiesel (SUGANYA et al., 2016).

Os parâmetros mais importantes para garantir o potencial do biodiesel como substituto do diesel são a viscosidade, estabilidade oxidativa, número de cetano (indicador de qualidade de ignição), propriedade de fluxo a frio, ponto de fulgor, valor calorífico, densidade do biodiesel, e índices de acidez e de saponificação (ASHOKKUMAR et al., 2015; CHEN et al., 2018). O índice de saponificação representa a quantidade de material graxo, o índice de iodo representa o grau de insaturação nos *FAMES*, e altos valores do número de cetano indicam melhores propriedades de ignição do combustível. Quanto maior for a cadeia do ácido graxo e quanto mais saturado, maior será o número de cetano (RAMOS et al., 2009). *FAMES* com alto grau de insaturação não são desejáveis para o biodiesel, pois um combustível com um alto grau de saturação é mais resistente a oxidação e mais estável na presença de luz, oxigênio, altas temperaturas e degradação na presença de metais (MUTANDA et al., 2011; ASHOKKUMAR et al., 2015). Especificamente no Brasil, a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) preconiza ainda que o combustível denominado biodiesel deve ser composto de alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, produzido a partir da transesterificação e/ou esterificação de materiais graxos, de origem vegetal ou animal, e que atenda a especificação contida no Regulamento Técnico nº 3/2014, parte integrante da Resolução ANP nº 45 de 25 de agosto de 2014 (ANP, 2014).

2.6. Processo de produção de bioetanol a partir de microalgas

O processo de produção de bioetanol a partir de microalgas compreende as etapas de pré-tratamento, hidrólise e fermentação. A etapa de extração de carboidratos da biomassa de microalgas geralmente é chamada de pré-tratamento ou hidrólise (HARUN et al., 2011; HERNÁNDEZ et al., 2015; RAZACK e SURENDHIRAN, 2016; PHWAN et al., 2018).

2.6.1. Hidrólise química e enzimática de microalgas

A extração de carboidratos da biomassa de microalgas consiste na ruptura da parede celular, liberação dos componentes intracelulares, e despolimerização da parede celular via hidrólise química ou enzimática. Essa etapa é crucial, pois os carboidratos estão em sua maioria compondo a parede celular (celulose e hemicelulose) ou como reserva energética intracelular (amido)(RAZACK e SURENDHIRAN, 2016).

O pré-tratamento da biomassa é a etapa limitante e de maior custo do processo devido à composição da parede celular, porém é um estágio necessário para minimizar o grau de cristalinidade da matriz de celulose, aumentar a área de superfície, aumentar a solubilidade dos açúcares e melhorar a digestibilidade do substrato (HARUN et al., 2011; HERNÁNDEZ et al., 2015; PHWAN et al., 2018). Durante o pré-tratamento ácido, os polissacarídeos da biomassa de microalgas são hidrolisados a monômeros, como pentoses e hexoses, que são então fermentados utilizando microrganismos etanologênicos (AZMAH et al., 2016). Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos eficientes para a quebra das ligações β -1,4-glicosídicas da celulose, e as ligações α -1,4 e α -1,6-glicosídicas do amido. O processo de hidrólise em microalgas é semelhante aos de materiais lignocelulósicos, entretanto, a ausência de lignina em sua estrutura simplifica o pré-tratamento (HARUN, DANQUAH e FORDE, 2010; CHEN et al., 2013).

Diferentes métodos para a ruptura da parede celular de microalgas têm sido estudados e eles podem ser divididos em dois grupos: mecânicos e não mecânicos. Dentre os tratamentos mecânicos testados na literatura pode-se citar moagem, homogeneização de alta pressão, homogeneização de alta velocidade, ultrassom e micro-ondas. Já os não-mecânicos dividem-se em enzimáticos e químicos (ácido ou básico). A escolha do método adequado varia em função da finalidade do processo (GÜNERKEN et al., 2015; HERNÁNDEZ et al., 2015.).

A hidrólise química é altamente recorrente na literatura, justificado pelas baixas concentrações de ácidos empregadas e alta eficiência na ruptura e despolimerização da parede celular microalgal e dos polissacarídeos de reserva (HO et al., 2013a; AZMAH et al., 2016). A hidrólise enzimática é uma opção sustentável, que não faz uso de elementos químicos e portanto dispensa o tratamento posterior dos resíduos gerados e que resulta em um bom rendimento de polissacarídeos hidrolisados sem compostos inibitórios (RAZACK e SURENDHIRAN, 2016). Porém a elevada especificidade do mecanismo de despolimerização da parede celular, juntamente com o elevado custo de enzimas e o tempo de reação, tornam esta alternativa dispendiosa em relação à hidrólise química,

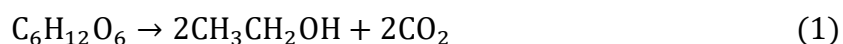
diminuindo assim a capacidade de produção (GÜNERKEN et al., 2015; PHWAN et al., 2018).

Ho et al. (2013a) compararam o rendimento de hidrólise ácida e enzimática na microalga *C. vulgaris*. Esses autores concluíram que hidrólise com solução a 1 % (v v⁻¹) de ácido sulfúrico a 121°C por 20 minutos e uma concentração de biomassa de 1 % (m v⁻¹) foi mais efetivo, com uma conversão de aproximadamente 96 % dos polissacarídeos em monossacarídeos. Sanchez Rizza et al. (2017) investigaram o efeito da variação da concentração de biomassa, temperatura, concentração de ácido e tempo de incubação de hidrólise e concluíram que as condições mais brandas para a conversão de até 95 % dos açúcares a monossacarídeos foram uma carga de biomassa de 10 % (m v⁻¹), solução a 2 % (v v⁻¹) de H₂SO₄, 120° C por 30 minutos.

Apesar da hidrólise ácida ser mais rápida e barata quando comparada a hidrólise enzimática, em condições severas, os açúcares redutores podem ser degradados formando potenciais inibidores de fermentação. Alguns dos inibidores de fermentação mais comuns em hidrolisados lignocelulósicos são o furfural, 5-hidroximetil-2-furaldeído, ácido propiônico, ácido acético, ácido fórmico, e ácido láctico (HARUN, DANQUAH e FORDE, 2010; HERNÁNDEZ et al., 2015; PHWAN et al., 2018). De acordo com Miranda, Passarinho, e Gouveia (2012), todavia, a degradação dos açúcares redutores acontece somente em concentrações elevadas de ácido, acima de 2 N (1 mol L⁻¹). Portanto, a hidrólise ácida é indicada para a despolimerização dos carboidratos estruturais e de reserva de microalgas devido à eficiência de conversão em baixas concentrações e, nestas condições, espera-se uma baixa concentração de possíveis inibidores de fermentação (MIRANDA; PASSARINHO; GOUVEIA, 2012; PHWAN et al., 2018).

2.6.2. Fermentação

Fermentação etanólica é a conversão metabólica que ocorre na presença de microrganismos, que, em condições ótimas de temperatura e pH, são capazes de catabolizar monossacarídeos a bioetanol e outros coprodutos, como água e dióxido de carbono. A reação pode ser representada pela Equação 1 (PHWAN et al., 2018; MOHD AZHAR et al., 2017; RAZACK e SURENDHIRAN, 2016).



A produção de bioetanol a partir de microalgas consiste em dois métodos: hidrólise e fermentação separadas (do inglês *Separated Hydrolysis and Fermentation*, ou *SHF*) ou sacarificação simultânea à fermentação (SSF). No processo de *SHF*, a biomassa

é primeiramente hidrolisada em açúcares monoméricos que em seguida são fermentados a bioetanol. Por sua vez, na SSF, a fermentação e a hidrólise da biomassa são realizadas simultaneamente. A vantagem da SHF é a possibilidade de ambos os processos ocorrerem em suas condições ótimas, ao passo que na SSF, o uso de apenas um equipamento diminui os custos de operação e possíveis contaminações, pois os carboidratos são imediatamente consumidos pelo microrganismo (RAZACK e SURENDHIRAN, 2016; AZMAH et al., 2016).

Microrganismos, como bactérias, leveduras e fungos são empregados na fermentação. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a bactéria *Zymomonas mobilis* são citadas como microrganismos promissores no processo de fermentação a partir de microalgas (AZMAH et al., 2016; SANCHEZ RIZZA et al., 2017). Dentre elas, *S. cerevisiae* é a levedura mais comumente empregada devido a características relevantes como baixa produção de coprodutos, alto rendimento em etanol, alta taxa de fermentação e alta tolerância a etanol e variações de pH. Entretanto, *S. cerevisiae* é capaz de fermentar apenas hexoses. O uso de microrganismos que fermentam hexoses e pentoses, como a levedura *Kluyveromyces marxianus*, pode aumentar a eficiência de produção de bioetanol em escala industrial (MOHD AZHAR et al., 2017). *K. marxianus* destaca-se pelo atributos desejáveis para processos de fermentação industrial, como termo tolerância, alta taxa de crescimento e capacidade de metabolização, e frequentemente fermenta uma ampla variedade de carboidratos, como pentoses, hexoses e dissacarídeos (DINIZ et al., 2014).

A fermentação utilizando levedura, entretanto, apresenta adversidades como inibição pelo aumento da temperatura e concentração de etanol, fato que pode comprometer o rendimento do processo. A inibição também pode ocorrer por compostos gerados em processos de pré-tratamento (ácidos orgânicos e furanos).

2.7. Produção integrada de biodiesel e bioetanol a partir de microalgas

Biorrefinaria é o processo de obtenção de biocombustíveis, energia e produtos de alto valor agregado por meio da transformação da biomassa, utilizando operações unitárias adequadas, a fim de garantir a economia do processo, demandando o menor consumo energético possível (CHEW et al. 2017). As perspectivas do uso de microalgas como matéria-prima para a produção biocombustíveis líquidos não podem ser restritas apenas pelo processo de fermentação alcoólica, uma vez que este processo pode ser dispendioso e requer alta energia, contribuindo assim para o custo total da produção (CHNG, CHAN e LEE, 2016). Sendo assim, com o objetivo de valorizar os coprodutos, como lipídeos e carboidratos, as microalgas têm sido matéria-prima para a produção simultânea de biodiesel e bioetanol. A Tabela 4 sumariza alguns trabalhos, os quais tiveram início em 2010 com o estudo de Harun, Danquah e Forde (2010).

O presente trabalho baseia-se na necessidade de se valorizar um solvente polar (etanol) para a extração de lipídeos e que pode ser um insumo produzido no próprio processo de extração de carboidratos, seguido de fermentação. Para tanto, estratégias de extração concomitante de carboidratos e lipídeos foram avaliadas.

Tabela 4: Comparação de métodos de extração integrada de lipídeos e carboidratos e respectivo rendimento em bioetanol.

Microalga	Extração de lipídeos	Rendimento de lipídeos (% m m ⁻¹ de biomassa)	Hidrólise	Concentração de biomassa (g L ⁻¹)	Rendimento de açúcares (% m m _{carboidratos} ⁻¹)	Microrganismo fermentador	Etanol (g g _{biomassa} ⁻¹)	Referência
<i>Chlorococum</i> sp.	Supercrítica CO ₂	NI	NI	10	NI	<i>S. bayanus</i>	0,38	Harun, Danquah e Forde (2010)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Clorofórmio-metanol (1:2)	20,6	HCl 0,5 mol L ⁻¹ 121 °C -15 min	50	57,1 (após extração) 37,8 (intacta)	<i>S. cerevisiae</i>	0,14	Lee et al. (2013)
<i>Tribonema</i> sp.	Etanol-hexano (1:3)	25,8 ^a 79,6 ^b	H ₂ SO ₄ 3,0 % (v v ⁻¹) 121 °C - 30 min	50	81,5	<i>S. cerevisiae</i>	0,42	Wang et al. (2014)
<i>Chlorella</i> sp. KR-1	Dimetilcarbonato - metanol (7:3)	38	HCl 2,5% (v v ⁻¹) 121 °C - 15 min	50	98,2 (após extração) 93,3 (intacta)	<i>S. cerevisiae</i>	0,16	Lee, Oh e Lee (2015)
<i>S. dimorphus</i>	Clorofórmio-metanol (1:2)	14	Enzimática	25	54 ^d	<i>S. cerevisiae</i>	0,26	Chng, Chan e Lee (2016)
<i>Scenedesmus</i> sp.	Dimetilcarbonato	92 ^c	H ₂ SO ₄ 0,3 N 121°C – 15 min	50	92	<i>S. cerevisiae</i>	0,09	Sivaramakrishnan e Incharoensakdi (2018)

^aanterior à hidrólise.; ^bposterior à hidrólise; ^cFAMES; ^dAmido (% m_{glicose} m_{biomassa}⁻¹); NI: não informado.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O presente estudo tem por objetivo avaliar o processo de extração integrada de carboidratos e lipídeos da biomassa de microalgas, para posterior produção de bioetanol e biodiesel em uma biorrefinaria.

3.2. Objetivos Específicos

São objetivos específicos deste trabalho:

- selecionar *S. obliquus* BR003 ou *Chlorella* sp. segundo o potencial de utilização de lipídeos e carboidratos como matérias-primas para a produção de biodiesel e bioetanol, respectivamente;
 - avaliar o efeito da concentração de biomassa na hidrólise ácida;
 - avaliar o conteúdo de amido;
 - avaliar o número mínimo de estágios de extração de lipídeos e proporção de solventes hexano:etanol necessários para desenvolver um processo eficiente;
 - avaliar conteúdo de lipídeos e perfil de ácidos graxos;
- caracterizar a biomassa da linhagem selecionada por meio da determinação do teor de massa seca livre de cinzas, lipídeos, carboidratos neutros totais, proteínas e umidade;
- avaliar condições ótimas de hidrólise ácida, na linhagem selecionada, variando condições de tempo, temperatura, concentração de ácido e concentração de biomassa;
- avaliar duas rotas distintas de extração integrada de carboidratos e lipídeos da biomassa da linhagem selecionada;
 - analisar variações no rendimento de lipídeos e carboidratos extraídos;
 - analisar as mudanças no perfil de ácidos graxos nas duas rotas de extração integrada de carboidratos e lipídeos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biocombustíveis do Departamento de Engenharia Agrícola (DEA) na Universidade Federal de Viçosa (UFV), localizada no município de Viçosa, MG.

Inicialmente, foram selecionados gêneros de microalgas com potencial para a produção de etanol e lipídeos. Após a caracterização da biomassa, quanto aos teores de carboidratos e lipídeos, a cepa com maior potencial foi selecionada para ser utilizada na otimização do processo de hidrólise ácida. Definida as condições ótimas de hidrólise ácida, procedeu-se o estudo de duas rotas distintas de extração de carboidratos e lipídeos, sumarizadas na Figura 3.

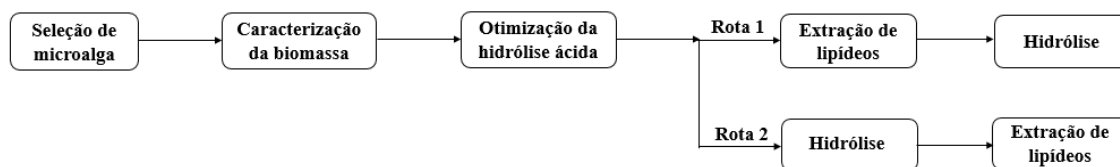


Figura 3: Esquema geral das rotas utilizadas para a extração integrada de lipídeos e carboidratos a partir da biomassa de microalgas.

4.1. Seleção de microalgas

Duas microalgas do gênero *Chlorophyceae* foram selecionadas para este estudo. A espécie *S. obliquus* BR003 foi escolhida por ser robusta para cultivos externos em grande escala e por apresentar alta produtividade em biomassa e lipídeos (ROCHA et al., 2017; SOARES et al., 2017; FENG et al., 2014; ÁLVAREZ-DÍAZ et al., 2017). Um segundo gênero, *Chlorella* sp., foi selecionado em função de seu grande potencial biotecnológico, sendo explorado em escala comercial como alimento e nutracêutico (SUGANYA et al., 2016). A biomassa de *S. obliquus* BR003 foi obtida junto ao Banco de Microalgas do Laboratório de Biocombustíveis do DEA/UFV e a biomassa de *Chlorella* sp. foi adquirida em comércio local na cidade de Viçosa, Minas Gerais.

Os cultivos de *S. obliquus* BR003 foram conduzidos e aclimatados em laboratório em frascos do tipo *Erlenmeyer*. O inóculo foi produzido até atingir o volume necessário (15 a 25 %) para a transferência para o tanque do tipo *raceway* de 4 m³. Para a obtenção da biomassa, realizou-se cultivo em tanque do tipo *raceway* na planta piloto de produção de microalgas do Laboratório de Biocombustíveis do DEA/UFV. O tanque possui área superficial de 20 m² e volume de 4 m³ (altura da lâmina de cultivo de 20 cm). A agitação

do cultivo foi realizada por meio da injeção de ar produzido por compressor. A cepa *S. obliquus* BR003 foi cultivada em meio L4 modificado, formulado à base de fertilizantes agrícolas e micronutrientes provenientes de reagentes analíticos. A composição do meio está descrita na Tabela 5.

Tabela 5: Formulação do meio de cultura L4 modificado.

Componentes		Concentração (mg L ⁻¹)
Macronutrientes (Fertilizantes)	Uréia	180,0
	Cloreto de Potássio	173,9
	Super Fosfato Simples	114,3
	Sulfato de Magnésio Heptahidratado	71,0
	Sulfato de Ferro Monohidratado	13,3
Micronutrientes	H ₃ BO ₃	2,86
	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08
	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,02

O cultivo foi conduzido com fotoperíodo natural, pH entre 6,5-7,5, e temperatura média de 27 °C. Carbono foi disponibilizado aos cultivos por meio de gases de combustão de biomassa na concentração de aproximadamente 12 % de CO₂. Utilizou-se gás ozônio para a esterilização prévia de todas as unidades de cultivo, separação e processamento de biomassa, o qual foi borbulhado juntamente com água da rede de distribuição pública. A biomassa produzida foi então coletada e concentrada em sedimentadores por autofloculação, controlada por meio do ajuste de pH com solução de 0,15 g L⁻¹ de NaOH.

A biomassa úmida foi submetida a tratamento térmico por 30 minutos a 80 °C em banho ultratermostático (Q214M2, Quimis, Brasil) a fim de conservar os metabólitos de interesse. Em seguida o pH foi ajustado entre 6 e 7 e a biomassa foi seca em estufa a 65 °C até que a massa estivesse constante. As biomassas secas de *S. obliquus* BR003 e *Chlorella* sp., foram então submetidas a um pré-tratamento mecânico de maceração em gral pistilo por 15 minutos, e posteriormente classificadas em peneira (mesh 100). As biomassas de *S. obliquus* BR003 e *Chlorella* sp. foram armazenadas em freezer a -20 °C (406 L Metalfrio, Brasil) até o momento da utilização nos experimentos.

4.2. Métodos analíticos

4.2.1. Determinação do teor de biomassa seca livre de cinzas

A massa seca livre de cinzas (m_{MSLC}) das microalgas foi determinada por gravimetria e descontada das cinzas após calcinação. Para obtenção da massa seca livre de cinzas, a massa seca das microalgas foi previamente pesada e acondicionada em cadinhos de porcelana já calcinados, sendo mantidos em forno tipo mufla a 575 °C por 10 h. Após nova calcinação e subsequente resfriamento, o cadinho contendo as cinzas foi disposto em dessecador. O conjunto foi então pesado e determinou-se a massa seca livre de cinzas pela subtração da massa seca da massa de cinzas após a calcinação.

4.2.2. Quantificação de lipídeos totais

A quantificação de lipídeos totais foi determinada pelo método Schmid-, Bondzynski-Ratzlaff (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1986), e pelo método Bligh & Dyer (1959).

No método de Schmid-Bondzynski-Ratzlaff, pesou-se 1 g de biomassa seca em tubos de 50 mL. Em seguida, foram adicionados 5 mL de HCl 8 mol L⁻¹ e levados ao banho ultratermostático (Q214M2, Quimis, Brasil) a 70 °C durante 30 minutos. Após o procedimento, adicionou-se 5 mL de etanol absoluto, 15 mL de éter etílico e 15 mL de éter de petróleo. O material foi agitado a 200 rpm por 1 hora. Ao término da extração, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 5000 g e a fase superior (apolar) foi retirada e transferida para *Erlenmeyers* de 50 mL, secos e de massa conhecida.

No método Bligh & Dyer, pesou-se 1 g de biomassa seca em tubos de 50 mL e em seguida, adicionou-se 5 mL de clorofórmio e 10 mL de metanol. O material foi agitado a 25 °C, por 1 h a 200 rpm. Em seguida, adicionou-se 5 mL de clorofórmio e 9 mL de água e os tubos foram agitados novamente, nas mesmas condições anteriores. Após extração, o material foi centrifugado a 5000 g por 10 minutos e a fase inferior (apolar) foi filtrada, em papel filtro *Whatman* nº 1, em *Erlenmeyers* de 50 mL, previamente secos em estufa, identificados e pesados.

Ambos os métodos foram realizados com 4 estágios de extração e após a evaporação dos solventes, o cálculo dos lipídeos totais foi realizado por diferença de massa.

4.2.3. Caracterização de lipídeos

Os perfis de ácidos graxos dos lipídeos extraídos das microalgas foram obtidos pela derivatização e conversão dos óleos a ésteres metílicos de ácidos graxos, seguindo metodologia proposta por Ichihara e Fukubayashi (2010). As amostras derivatizadas foram quantificadas quanto ao perfil graxo e teor de ésteres, em cromatógrafo a gás (CG 2010, Shimatzu, Japão), nas seguintes condições: injeção direta de 1 μL da amostra, rampa de aquecimento linear de 60 °C para 330 °C a 20 °C min^{-1} , e alta velocidade linear para melhor resolução dos picos.

4.2.4. Determinação do teor de lipídeos neutros por espectrofluorescência

Após hidrólise da biomassa, foi feita uma extração dos compostos apolares, tanto do sobrenadante quanto da biomassa residual, utilizando metodologia de Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1986). Em seguida, os extratos foram secos em estufa a 65 °C até massa constante e foram quantificados quanto ao teor de lipídeos neutros em um fluorímetro/leitor de microplacas utilizando o corante vermelho do Nilo conforme metodologia proposta por De La Hoz Siegler et al. (2012), com adaptações.

Solução de isopropanol:clorofórmio (19:1) foi adicionada aos extratos lipídicos até se obter concentração final de sólidos de 1 mg mL^{-1} , conforme metodologia utilizada por Alonzo e Mayzaud (1999). Em seguida, em microtubos de 2 mL, adicionou-se 40 μL da solução lipídica e 1960 μL de solução a 30 % (v v⁻¹) de etanol. Paralelamente, uma curva-padrão, com concentração entre 0 e 20 mg L^{-1} de trioleína (Glyceryl trioleate, Sigma-Aldrich, EUA), foi utilizada para a determinação de lipídeos neutros totais.

Pipetou-se 200 μL de amostra ou padrão em microplaca de 96 poços de fundo preto e adicionou-se 4 μL de solução etanólica de vermelho do Nilo a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A microplaca foi incubada por 10 minutos a 40 °C e agitação de 400 rpm. A intensidade de fluorescência do corante foi medida em fluorímetro (Victor X5, Perkin Elmer, EUA), utilizando filtros de 485 nm para excitação e 595 nm para emissão. O fluorímetro utilizado pertence a Unidade de Crescimento de Plantas da UFV. A análise foi realizada em triplicata.

4.2.5. Determinação do perfil de monossacarídeos

A composição dos monossacarídeos foi determinada de acordo com o método estabelecido pelo *National Renewable Energy Laboratory* (WYCHEN; LAURENS, 2013), adaptado por Lee, Oh e Lee, 2015.

Em tubos de 15 mL pesou-se 50 mg de biomassa seca e adicionou-se 0,5 mL de ácido sulfúrico 72 % (m mL^{-1}). A mistura foi hidrolisada primeiramente a 30 °C durante 30 minutos. Em seguida, adicionou-se água deionizada para se obter uma concentração final de 4 % (m mL^{-1}) de ácido sulfúrico e, então, a mistura foi incubada a 121 °C por 20 minutos em autoclave. O sobrenadante foi separado e neutralizado com CaCO_3 e analisado por cromatografia líquida de alta performance. Os padrões utilizados foram: D-ribose, D-xilose, L-arabinose, D-frutose, D-glicose e D-galactose (Sigma-Aldrich, EUA). As curvas-padrão compreenderam concentrações entre 70 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 420 $\mu\text{g mL}^{-1}$. No Anexo I encontram-se as condições de análise e respectivo cromatograma.

4.2.6. Determinação de carboidratos neutros totais

O método fenol-ácido sulfúrico adaptado para microplacas de 96 poços foi utilizado para determinação de carboidratos neutros totais das microalgas (MASUKO et al., 2005). A quantificação de carboidratos neutros compreende as etapas de extração de carboidratos intracelulares seguido de método colorimétrico. Após etapa de hidrólise e centrifugação, em microtubos de 2 mL, pipetou-se 200 μL do sobrenadante, 600 μL de H_2SO_4 concentrado e 120 μL de solução 50 g L^{-1} de fenol. Após homogeneização em vortex, as amostras foram dispostas em banho termostatzado a 90 °C por 5 minutos. Aliquotas de 200 μL de cada amostra foram utilizadas para leitura em espectrofotômetro (Multiskan GO, Thermo Scientific, Finlândia) a 490 nm. Em paralelo, uma curva-padrão foi preparada, utilizando concentrações de glicose na faixa de 0 a 300 mg L^{-1} . A validação do método encontra-se no Anexo II.

4.2.7. Extração e quantificação de amido

A extração e quantificação de amido seguiu a metodologia descrita por Fernie et al. (2001), em que glicose é caracterizada indiretamente pela formação de NADPH no comprimento de onda de 340 nm. A etapa de extração consistiu na adição de 1 mL de metanol a 10 mg de biomassa seca. A mistura foi agitada a 500 rpm, 80 °C por 20 minutos

e em seguida, centrifugada a 4 °C, 10000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 400 µL de solução 0,1 mol L⁻¹ de NaOH. A mistura foi agitada a 500 rpm, 95 °C por 1 hora e posteriormente, o meio foi neutralizado com ácido acético. 10 µL do sobrenadante foi digerido com as enzimas α-amilase e amiloglicosidade a 400 rpm, 37 °C durante 12 horas. A glicose é quantificada indiretamente pelo monitoramento da formação de NADPH ao se adicionar ao extrato digerido, solução contendo glicose-6-fosfato desidrogenase, ATP, NADP⁺ e hexoquinase.

4.2.8. Determinação de proteínas solúveis totais

A determinação de proteínas solúveis totais foi realizada segundo metodologia descrita por Bradford (1976). A etapa de extração foi realizada pesando-se 5 mg de biomassa liofilizada, a qual foi submetida a hidrólise alcalina com 800 µL de NaOH 0,1 mol L⁻¹ a 95 °C em banho termostatizado por 30 minutos. A amostra foi resfriada em banho de gelo e neutralizada com 200 µL de solução 0,4 mol L⁻¹ de HCl e, em seguida, centrifugada a 10000 g por 5 minutos.

A quantificação das proteínas celulares foi feita utilizando-se o reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 (BRADFORD, 1976). O reagente de Bradford foi preparado dissolvendo-se 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50 mL de solução de etanol a 95 % e, em seguida, foram adicionados 100 mL de solução de ácido fosfórico a 85 %. A solução obtida foi avolumada para 1,0 L com água deionizada. Após filtração em papel de filtro quantitativo (*Whatman* n°1), a solução foi mantida em geladeira.

Em microtubos de 2 mL, pipetou-se 100 µL da amostra e 1 mL do reagente de Bradford, com posterior agitação por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, 200 µL desta solução foram adicionados na microplaca. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro para microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific, Finlândia). Paralelamente, a curva-padrão foi preparada, utilizando concentrações de Albumina de Soro Bovino na faixa de 0 a 400 µg mL⁻¹.

4.3. Extração de lipídeos totais

Diferentes métodos para extração de lipídeos podem ser encontrados na literatura, porém não há um método padrão para a determinação de lipídeos de microalgas. Portanto, foram avaliados três sistemas de extração de lipídeos totais utilizando a biomassa de *S.*

obliquus BR003. Foram utilizados os solventes orgânicos etanol e hexano nas proporções descritas na Tabela 6.

Tabela 6: Sistemas de extração de lipídeos totais de *S. obliquus* BR003.

Sistema de extração	Razão
Etanol : hexano	1:4
Etanol : hexano	1:3
Etanol :hexano	1:2

Foi adicionado 1 g de biomassa seca e macerada de *S. obliquus* BR003 em tubos de 50 mL, em seguida adicionou-se etanol e hexano nas proporções descritas na Tabela 4 até se obter uma relação de 5 % (m v⁻¹) de sólidos totais. Os tubos foram incubados e mantidos sob agitação constante de 200 rpm a 50 °C por 2 h, e depois centrifugados a 5000 g por 10 minutos. A fase superior, contendo hexano, foi separada e filtrada em papel filtro *Whatman* nº1. A massa de óleo extraída foi determinada em balança analítica, após evaporação do solvente em estufa, a 65 °C. O teor de lipídeos extraídos foi calculado segundo a Equação 2, proposta por Sivaramakrishnan e Incharoensakdi (2018), em que a massa a de biomassa algal é seca e livre de cinzas (m_{MSLC}).

$$\text{Teor de lipídeos (\%)} = \frac{\text{massa do óleo extraído (g)}}{\text{massa de biomassa algal (g)}} \times 100 \quad (2)$$

Ao final de cada extração, adicionou-se a mesma quantidade de solventes à biomassa residual, a fim de se extrair lipídeos remanescentes. Este procedimento de lavagem foi repetido por 6 vezes e o número de lavagens, ou estágios de extração, necessários para se obter um rendimento constante de lipídeos extraídos foi avaliado.

4.4. Hidrólise da biomassa algal

As biomassas de *S. obliquus* BR003 e *Chlorella* sp. foram hidrolisadas segundo método proposto por Borowitzka e Moheimani (2013) para determinação do teor de carboidratos totais. Em microtubos de 2 mL, pesou-se certa quantidade de biomassa seca e macerada e completou-se com solução 1 mol L⁻¹ de H₂SO₄ para se obter as concentrações desejadas de biomassa de 1, 5, 10, 25 e 50 g L⁻¹. A mistura foi então mantida a 100 °C em banho seco por 1 h. Ao término da hidrólise, os tubos foram

centrifugados a 10000 g por 10 minutos e o sobrenadante coletado para análise de carboidratos neutros totais (seção 4.2.6). O teor de carboidratos foi calculado em relação a biomassa seca livre de cinzas total (Equação 3).

$$\text{Teor de carboidratos (\%)} = \frac{\text{massa de carboidratos solúveis (g)}}{\text{massa de biomassa algal (g)}} \times 100 \quad (3)$$

4.5. Otimização da hidrólise ácida

Um delineamento composto central (DCC) foi empregado para estudar os efeitos da temperatura, tempo de hidrólise, concentração de ácido sulfúrico e concentração de biomassa algal no rendimento de carboidratos neutros totais durante a hidrólise ácida da biomassa de *Chlorella* sp. O DCC consistiu em um planejamento fatorial completo 2^4 , com 8 pontos axiais e 4 repetições no ponto central, totalizando 28 ensaios. A qualidade do modelo gerado foi avaliada por meio do coeficiente de determinação (R^2).

A faixa de valores para os parâmetros selecionados foi definida a partir de estudos prévios (LEE et al., 2013; WANG et al., 2014; HERNÁNDEZ et al., 2015; LEE; OH; LEE, 2015; SANCHEZ RIZZA et al., 2017), nos quais a temperatura, tempo, concentração de ácido sulfúrico e concentração de biomassa variaram entre 60 °C e 120 °C, 0 e 120 minutos, 0 % e 17 % (v v⁻¹), e 10 g L⁻¹ e 100 g L⁻¹, respectivamente. A faixa de valores escolhida para este trabalho se encontra na Tabela 7.

Tabela 7: Delineamento composto central para a análise do rendimento de carboidratos neutros totais na hidrólise de *Chlorella* sp.

Variáveis	Níveis				
	- α	-1	0	1	+ α
Temperatura (°C)	40	60	80	100	120
Tempo (min)	10	30	50	70	90
H ₂ SO ₄ (% v v ⁻¹)	0,5	3	5,5	8	10,5
Concentração de biomassa (g L ⁻¹)	10	20	30	40	50

A biomassa seca foi adicionada em quantidades conhecidas em tubos de 15 mL, e foram adicionados 10 mL de solução de ácido sulfúrico, conforme a Tabela 7. A mistura de biomassa e ácido foi incubada em banho ultra termostático (Q214M2, Quimis, Brasil) a uma temperatura e tempo definidos no DCC. Em seguida, as amostras foram resfriadas

em temperatura ambiente, centrifugadas a 10000 g por 10 minutos, e o sobrenadante foi coletado para análise de carboidratos neutros totais (MASUKO et al., 2005). O rendimento em carboidratos neutros totais foi calculado conforme Equação 4, sugerida por Sivaramakrishnan e Incharoensakdi (2018) , em que se considerou o teor de carboidratos neutros totais de *Chlorella* sp. no tratamento *i* sobre a massa total de carboidratos.

$$\text{Rendimento de carboidratos (\%)} = \frac{\text{massa de carboidratos neutros totais}_i \text{ (g)}}{\text{massa total de carboidratos (g)}} \times 100 \quad (4)$$

4.6. Extração integrada de carboidratos e lipídeos de *Chlorella* sp.

O estudo da extração integrada de carboidratos e lipídeos, visando a produção de bioetanol e biodiesel, ocorreu segundo esquema de metodologia da Figura 3. Em tubos de 50 mL, pesou-se 1 g de biomassa seca e macerada de *Chlorella* sp. A estes frascos, foram adicionados solventes etanol e hexano ou solução de H₂SO₄ de acordo com as etapas de otimização deste trabalho. Em seguida, retirou-se uma alíquota de 20 µL do hidrolisado para quantificação de carboidratos neutros totais e os lipídeos extraídos foram quantificados por gravimetria.

4.7. Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como a média dos valores $\pm$ desvio padrão. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Para a confecção dos gráficos foi utilizado o *software* SigmaPlot (versão 11.0, Systat Software).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção de microalgas

S. obliquus BR003 e *Chlorella* sp. foram selecionadas e avaliadas quanto ao potencial de produção de bioetanol e biodiesel, empregando-se duas rotas distintas de extração de carboidratos e lipídeos. A partir do conteúdo encontrado para ambos os componentes, selecionou-se a cepa que melhor se adequou para avaliação em uma biorrefinaria.

5.1.1. Hidrólise ácida de biomassa algal

Inicialmente, avaliou-se o efeito da hidrólise ácida utilizando diferentes concentrações de biomassa das linhagens *S. obliquus* BR003 e *Chlorella* sp. A hidrólise ácida é o processo mais comum para converter polissacarídeos de reserva e estruturais da biomassa microalgal em monossacarídeos que podem ser fermentados a bioetanol (PHWAN et al., 2018). A hidrólise ácida foi realizada utilizando uma solução 1 mol L⁻¹ de H₂SO₄ a 100 °C por 60 minutos (BOROWITZKA & MOHEIMANI, 2013).

A concentração de biomassa afetou significativamente o teor de hidrolisados de *Chlorella* sp., quantificados como carboidratos neutros totais. Entretanto, observou-se uma diferença mínima no teor de *S. obliquus* BR003 nos diferentes tratamentos (Figura 4). Os resultados sugerem que *S. obliquus* BR003 possui um baixo teor de carboidratos ($8,09 \pm 0,68$ % m m_{MSLC}⁻¹) e, mesmo utilizando condições mais favoráveis a hidrólise ácida, ou seja, diminuindo a concentração de sólidos, os teores de carboidratos neutros totais não diferiram estatisticamente.

Interessantemente, a concentração de biomassa de *Chlorella* sp. é um importante parâmetro na hidrólise ácida. Observa-se que o aumento da concentração de biomassa reduziu significativamente a eficiência do processo. O uso de uma razão de sólido-líquido de 1 g L⁻¹ de biomassa resultou em uma extração de carboidratos neutros totais 65 % superior à razão de sólido-líquido de 50 g L⁻¹. Maiores teores de carboidratos foram observados quando se utilizou as concentrações de sólidos de 1 e 5 g L⁻¹, sendo extraídos $15,4 \pm 0,75$ % (m m_{MSLC}⁻¹) e $10,8 \pm 0,68$ % (m m_{MSLC}⁻¹) de carboidratos neutros totais, respectivamente.

Uma maior concentração de biomassa reduz a eficiência de hidrólise, provavelmente, devido ao contato insuficiente entre as células e o ácido, limitando,

portanto, a transferência de massa ou devido à baixa concentração de ácido, o que afeta a cinética de reação. Dessa forma, ambas as condições possuem efeito negativo na eficiência de hidrólise (HO et al., 2013b).

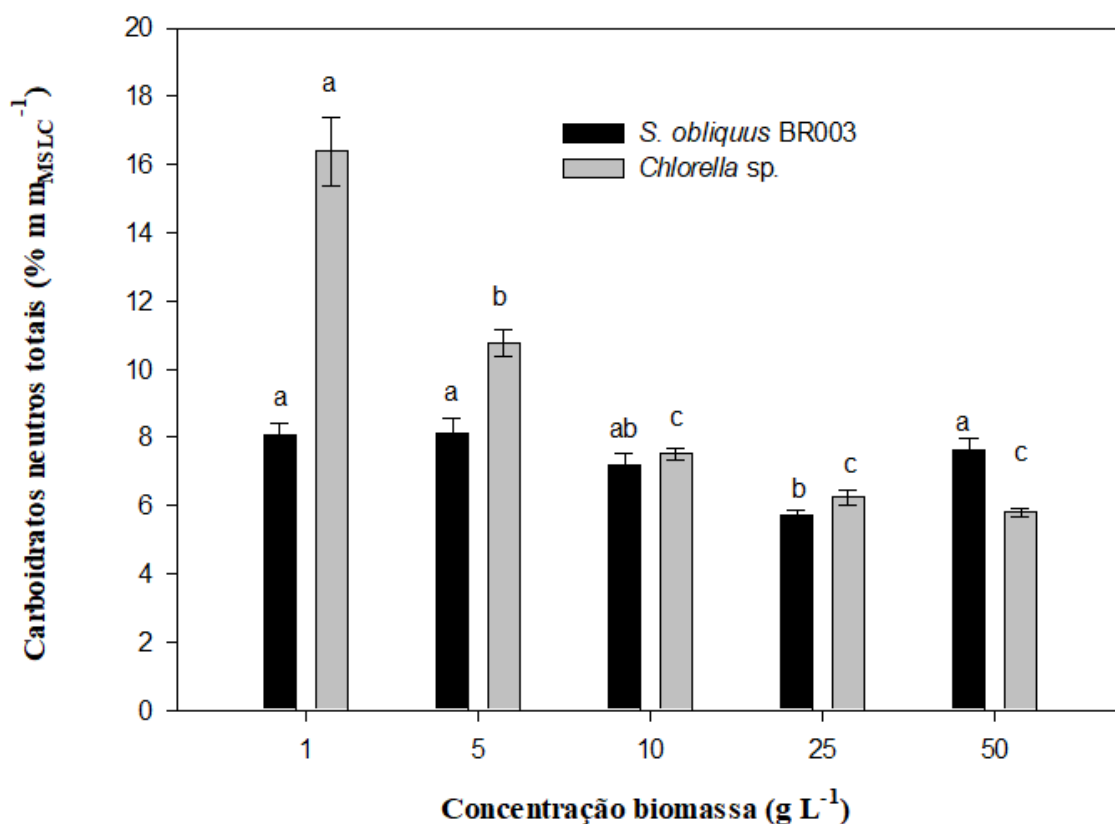


Figura 4: Efeito da concentração de sólidos na hidrólise ácida de *S. obliquus* BR003 e *Chlorella* sp. Condições: H₂SO₄ 1 mol L⁻¹, 60 minutos e 100 °C. Valores seguidos pela mesma letra, para a mesma linhagem, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a um nível de 5 % de significância.

5.1.2. Conteúdo de amido de *Chlorella* sp. e *S. obliquus* BR003

As biomassas secas de *Chlorella* sp. e *S. obliquus* BR003 foram submetidas à extração e quantificação de amido (FERNIE et al., 2001). Verificou-se que *Chlorella* sp. apresentou um conteúdo de amido de $3,57 \pm 0,46$ % (m_{glicose} m_{MSLC}⁻¹) enquanto *S. obliquus* BR003 apresentou apenas $0,66 \pm 0,02$ % (m_{glicose} m_{MSLC}⁻¹) (Figura 5). Rocha et al. (2017) encontraram teores de amido de 3,4 e 3,8 % (m_{glicose} m⁻¹) para *C. vulgaris* BR017 e *S. obliquus* BR003, respectivamente. O tratamento térmico, realizado em banho ultratermostático, a 80 °C durante 30 minutos, aplicado à cepa *S. obliquus* BR003 após

colheita, possivelmente não inibiu o catabolismo do amido intracelular. Adicionalmente, o tempo de armazenamento a -20 °C também pode ter afetado a composição bioquímica de *S. Obliquus* BR003, degradando os açúcares de reserva.

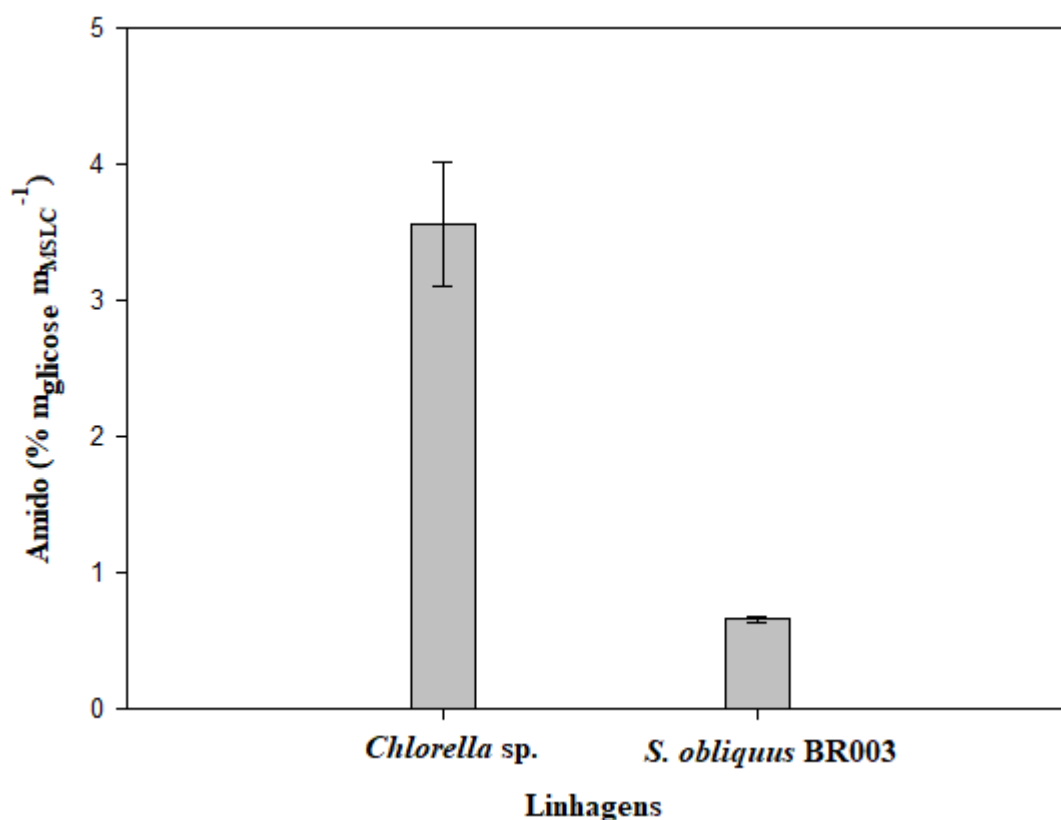


Figura 5: Conteúdo de amido de *Chlorella* sp. e *S. obliquus* BR003.

O acúmulo de carboidratos nas microalgas ocorre devido a fixação de CO₂ durante a fotossíntese, processo no qual a célula utiliza ATP/NADPH para fixar e converter CO₂ para produzir glicose e outros açúcares no Ciclo de Calvin. A rota metabólica de moléculas de carboidratos e lipídeos é interligada, isto é, o precursor da síntese de TAGs, glicerol-3-fosfato, é produzido via catabolismo da glicose. Portanto, visando a produção de biocombustíveis de microalgas, é preciso entender os metabolismos relacionados às macromoléculas de interesse (CHEN et al., 2013).

Rocha et al. (2017) estudaram dez linhagens de microalgas com o objetivo de identificar as que se destacam quanto ao potencial de produtividade de biomassa e lipídeos para produção de biodiesel, fornecendo assim, informações de suporte biotecnológico para utilização desse metabólito. Esses autores identificaram uma correlação negativa entre os metabólitos de reserva, lipídeos e carboidratos, em que as linhagens apresentam um acúmulo preferencial de amido ou ácidos graxos.

Para aumentar o acúmulo de carboidratos em microalgas, estratégias de aumento da reserva de glucanos e diminuição da degradação de amido devem ser adotadas (CHEN et al., 2013; MARTÍN-JUÁREZ et al., 2017). Porém, estudos de regulação para evitar a degradação de metabólitos de interesse ainda são escassos na literatura. No presente estudo, o amido corresponde a aproximadamente 25 % dos carboidratos totais de *Chlorella* sp., sendo, portanto, uma fração considerável de carboidratos que podem ser hidrolisados e fermentados a bioetanol.

5.1.3. Extração de lipídeos

5.1.3.1. Efeito do número dos estágios de extração no teor de lipídeos

Uma eficiente extração de lipídeos utilizando solventes orgânicos requer múltiplos estágios de extração, no entanto, ainda não foram estabelecidas condições ótimas de extrações de lipídeos para biomassas de microalgas. O principal gargalo de uma abordagem de biorrefinaria é a separação de diferentes frações sem causar danos as mesmas ou às demais frações (CHEW et al., 2017). A fim de se garantir o maior rendimento na extração de lipídeos, geralmente, o solvente apolar é recuperado e devolvido ao sistema, para a correta extração dos lipídeos remanescentes da biomassa residual. Entretanto, alguns solventes, como clorofórmio e metanol, afetam a qualidade do óleo ao dissolver compostos indesejados, dificultando o refino do mesmo, e consequentemente, elevam os custos de produção. Os solventes etanol e hexano são uma alternativa menos tóxica e menos agressiva ao demais componentes, não lipídicos, da biomassa (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012; JEEVAN KUMAR et al., 2017).

Portanto, mediante a diversidade de fatores que afetam a extração de lipídeos, tais como temperatura, intensidade de agitação, carga de solvente e teor de sólidos, realizou-se um estudo de otimização em que se avaliou o número mínimo de estágios necessários para se extrair com eficiência os lipídeos totais de *Chlorella* sp. e *S. obliquus* BR003, utilizando etanol e hexano como solventes.

Devido aos maiores rendimentos em biomassa e lipídeos, a linhagem *S. obliquus* BR003 foi escolhida para o estudo preliminar de extração de lipídeos (ROCHA et al., 2017; FENG et al., 2014; ÁLVAREZ-DÍAZ et al., 2017). A biomassa de *S. obliquus* BR003 seca e macerada foi submetida ao processo de extração de lipídeos utilizando diferentes razões dos solventes orgânicos etanol e hexano (Tabela 8). A extração de lipídeos de *S. obliquus* BR003 foi realizada com até seis estágios de extração, e desta

forma assegurou-se que a maior parte dos lipídeos fossem extraídos.

Os teores de lipídeos totais para cada sistema de extração são apresentados na Tabela 8, e os teores individuais de cada estágio de extração estão descritos na Figura 6. O sistema de extração etanol e hexano na razão de 1:2 apresentou maior rendimento em lipídeos neutros totais e os sistemas de razão 1:4 e 1:3 não apresentaram diferença estatística entre si. A eficiência de extração de lipídeos é diretamente relacionada à polaridade dos solventes orgânicos envolvidos. Em geral, misturas contendo solvente polar e apolar são mais eficientes do que o uso de apenas uma classe de solvente. Solventes polares, como o etanol, extraem lipídeos insaponificáveis, pigmentos, carboidratos e algenanos, entretanto, a presença destes facilita a penetração na membrana celular da microalga, fazendo com que os TAGs e lipídeos neutros fiquem suscetíveis ao carregamento por uma fase apolar (hexano) (LI et al., 2014, LÓPEZ et al., 2016).

Tabela 8: Teor de lipídeos totais extraídos de *S. obliquus* BR003 utilizando etanol e hexano.

Razão etanol : hexano	Teor de lipídeos totais de <i>S. obliquus</i> BR003 (% m m_{MSLC}⁻¹)
1:4	13,1 ± 0,26 ^a
1:3	11,5 ± 0,77 ^a
1:2	16,8 ± 1,5 ^b

Letras iguais, entre os teores de lipídeos totais, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a um nível 5 % de significância.

As médias dos teores de lipídeos extraídos em cada estágio foram comparadas a fim de se verificar em qual estágio a extração não apresentou diferença significativa no rendimento final de lipídeos. Os sistemas etanol-hexano 1:4 e 1:3 apresentaram tendência linear a partir do quarto estágio de extração enquanto o sistema 1:2 apresentou linearidade a partir do terceiro estágio de extração (Figura 6). Verificou-se que, no quarto estágio de extração, os sistemas etanol-hexano 1:4 e 1:3 apresentaram aproximadamente 90 % de lipídeos extraídos, enquanto no sistema etanol-hexano 1:2, 94 % dos lipídeos foram extraídos no mesmo estágio. Portanto, a partir da análise de comparação das médias dos estágios de extração, para cada razão de solvente utilizada, observou-se que, são necessários 4 estágios para extrair os lipídeos com eficiência da biomassa de *Scenedesmus obliquus* BR003. Sendo assim, o sistema de extração etanol e hexano na razão de 1:2 e 4 estágios de extração foram definidos para os experimentos posteriores do presente trabalho.

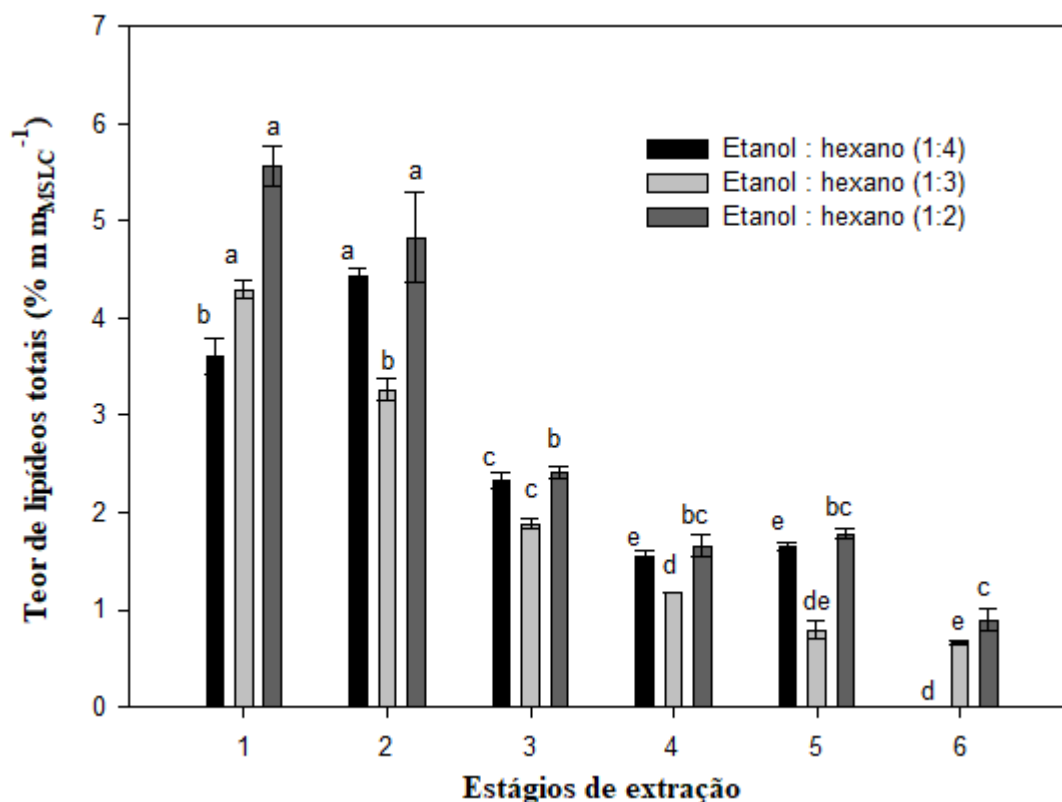


Figura 6: Teor de lipídeos totais extraídos de *S. obliquus* BR003 em diferentes estágios de extração para os sistemas etanol : hexano nas razões de 1:4, 1:3 e 1:2. Letras iguais entre os estágios de extração, para o teor de lipídeos em um mesmo sistema, não diferem estatisticamente, pelo teste Tukey a um nível 5 % de significância.

5.1.3.2. Extração de lipídeos totais de *Chlorella* sp.

A extração de lipídeos totais de *Chlorella* sp. foi avaliada utilizando o sistema etanol:hexano na razão de 1:2 em diferentes estágios de extração (entre 1 e 4). A extração de lipídeos neutros totais também foi realizada com os métodos de caracterização descritos por Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1986) e Bligh & Dyer (1959), visando obter valores de referência.

A Tabela 9 apresenta o teor de lipídeos totais nos três sistemas avaliados. Ambos os métodos de caracterização, Schmid-Bondzynski-Ratzlaff e Bligh & Dyer, não apresentaram diferença estatística a um nível de 5 % de significância. O sistema de extração etanol:hexano apresentou rendimentos de 91,7 % e 93,0 % em relação aos métodos Schmid-Bondzynski-Ratzlaff e Bligh & Dyer, respectivamente.

Tabela 9: Teor de lipídeos totais de *Chlorella* sp. em sistemas de extração contendo 4 estágios.

Sistema de extração	Teor de lipídeos totais de <i>Chlorella</i> sp. (% m m _{MSLC} ⁻¹)
Schmid-Bondzynski-Ratzlaff	13,2 ± 0,09
Bligh & Dyer	13 ± 0,59
Etanol : hexano (1:2)	12,1 ± 1,3

Os métodos de extração de lipídeos propostos por Schmid-Bondzynski- Ratzlaff e Bligh & Dyer extraíram a maior parte dos lipídeos nos estágios 1 e 2, enquanto as extrações nos estágios 3 e 4 não diferiram significativamente. O sistema de extração etanol:hexano (1:2), por sua vez, apresentou diferença significativa entre o primeiro estágio de extração e os demais (Figura 7).

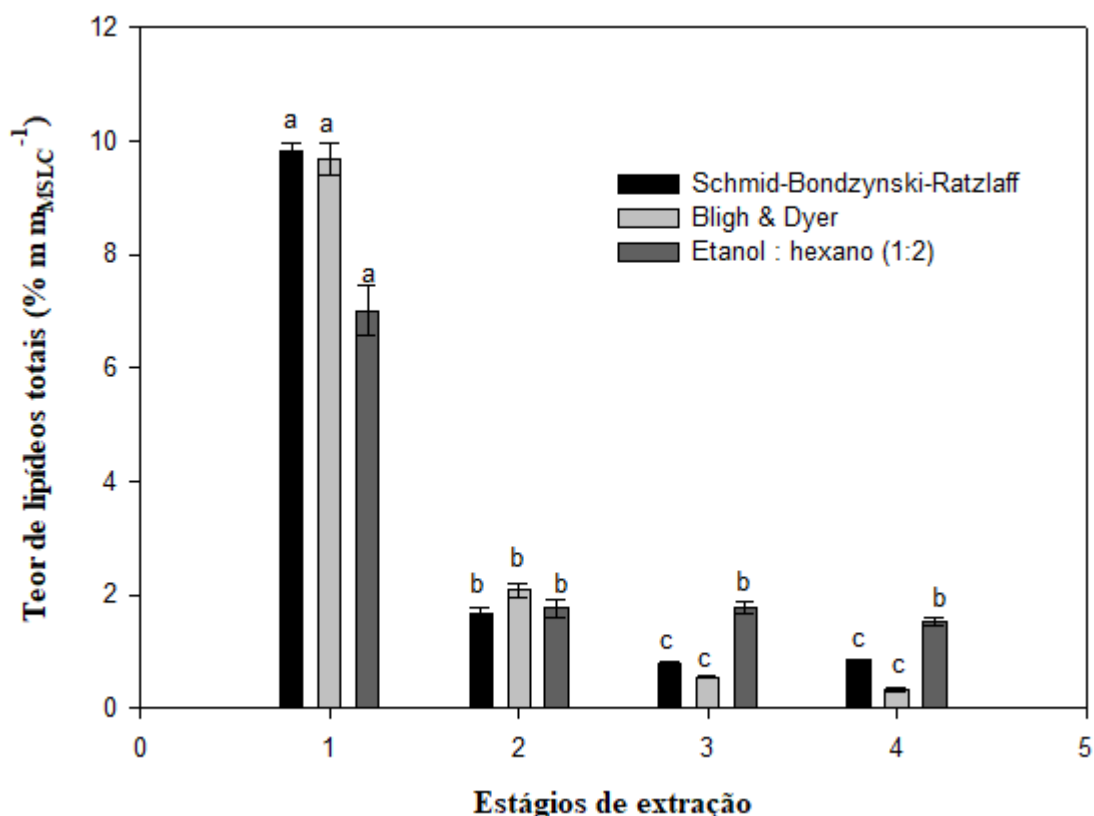


Figura 7: Teor de lipídeos totais extraídos de *Chlorella* sp. utilizando os diferentes sistema de extração: Schmid-Bondzynski-Ratzlaff, Bligh & Dyer e etanol:hexano. Letras iguais entre os estágios de extração, para o teor de lipídeos em um mesmo sistema, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey, a um nível 5 % de significância.

Na Figura 8 é possível observar a contribuição de cada estágio de extração no teor final de lipídeos em cada sistema avaliado. Em ambos os métodos Bligh & Dyer e

Schmid-Bondzynski-Ratzlaff, 75 % dos lipídeos totais de *Chlorella* sp. foram extraídos no primeiro estágio de extração ao passo que somente 58 % de lipídeos foram extraídos no primeiro estágio no sistema contendo etanol e hexano. O menor rendimento é justificado pela menor seletividade do hexano em relação aos lipídeos neutros quando comparado ao clorofórmio. Do mesmo modo, metanol possui maior polaridade do que etanol e, portanto, apresenta maior seletividade em relação aos lipídeos polares (glicolipídeos e fosfolipídeos). O uso de um cossolvente alcoólico aumenta a afinidade com complexos lipídicos associados à membrana celular devido à capacidade de formar ligações de hidrogênio (HALIM, DANQUAH e WEBLEY, 2012). Desta maneira, apesar do sistema etanol:hexano apresentar um menor rendimento inicial, foi eficiente em extrair os lipídeos contidos na microalga *Chlorella* sp. ao final de 4 estágios. Este sistema é, portanto, uma excelente alternativa aos sistemas de quantificação, uma vez que etanol apresenta menor toxicidade, quando comparado a solventes como clorofórmio e metanol, e o conteúdo lipídico extraído ultrapassa 90 % de rendimento.

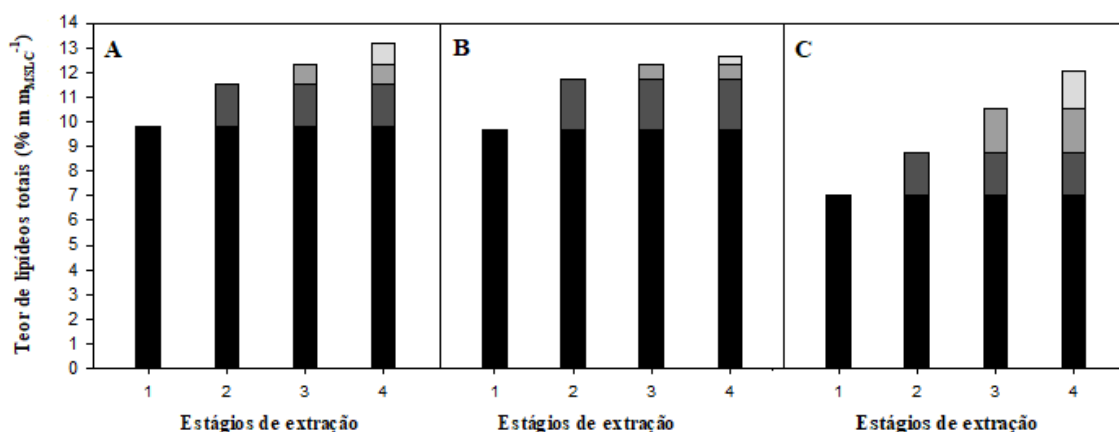


Figura 8: Teor de lipídeos totais para 4 estágios de extração para os sistemas (a) Schmid-Bondzynski-Ratzlaff, (b) Bligh & Dyer e (c) etanol:hexano (1:2) de *Chlorella* sp.

5.1.3.3. Perfil de ácidos graxos dos lipídeos de *Chlorella* sp.

Os lipídeos de *Chlorella* sp. extraídos pelos sistemas Schmid-Bondzynski-Ratzlaff, Bligh & Dyer e etanol:hexano na proporção de 1:2 foram submetidos a uma esterificação ácida. Os ésteres metílicos de ácidos graxos (*FAMES*) produzidos foram quantificados e os perfis de ácidos graxos de *Chlorella* sp. estão descritos na Tabela 10. Os cromatogramas da análise de perfil graxo de *Chlorella* sp. são apresentados no Anexo III.

Tabela 10: Perfil de ácidos graxos de *Chlorella* sp. obtidos por diferentes misturas de solventes de extração – relação de *FAMES* (%).

Ácido graxo	Mistura de solventes de extração		
	Bligh & Dyer	Schmid-Bondzynski-Ratzlaff	Etanol:hexano (1:2)
C12:0	n.d.	1,2 ± 0,1	n.d.
C16:0	15,4 ± 0,8	20,4 ± 0,6	17,2 ± 1,7
C16:1	3,6 ± 0,2	4,4 ± 0,6	2,9 ± 0,7
C18:0	1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,6 ± 0,2
C18:1	14,6 ± 1,2	10,6 ± 0,7	13,9 ± 1,4
C18:2	19,2 ± 1,1	20,9 ± 0,6	17,4 ± 0,8
C18:3	23,4 ± 1,8	22,6 ± 1,5	24,3 ± 0,5
C20:0	2,1 ± 0,5	n.d.	n.d.
AGS	19,0	23,3	18,8
MUFAs	18,2	15,0	16,8
PUFAs	42,6	43,5	41,7
Relação saturado/insaturado	0,31	0,40	0,32

AGS: ácido graxo saturado; *MUFAs*: ácidos graxos monoinsaturados; *PUFAs*: ácidos graxos poli-insaturados; n.d.: não detectado.

Os lipídeos totais extraídos por diferentes sistemas apresentaram elevados teores de ácidos palmítico (C16:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3). Em geral, ácidos graxos com 16 e 18 carbonos são considerados ideais para a produção de biodiesel, pois contribuem para a melhora de propriedades como densidade, viscosidade, ponto de fulgor e calor de combustão (FENG et al., 2014; SIVARAMAKRISHNAN;

INCHAROENSAKDI, 2018). O perfil de ácidos graxos de *Chlorella* sp. é composto majoritariamente por ácidos graxos poli-insaturados (*PUFAs*, do inglês *fatty acid methyl esters*), variando entre 41,7 e 43,5 %, a depender do método de extração de lipídeos. Não foram detectados *PUFAs* com quatro ou mais ligações duplas (C20:4). Os *PUFAs* são suscetíveis a oxidação durante armazenamento, não sendo desejáveis para a síntese de biodiesel (WANG et al., 2014). Entretanto, grande parte das matrizes oleaginosas para a produção de biodiesel (e.g. soja) apresentam elevados teores de ácidos graxos insaturados como os observados nos perfis graxos de *Chlorella* sp. (Tabela 10).

O perfil graxo afeta diretamente a qualidade do biodiesel produzido, uma vez que o comprimento da cadeia de carbono dos ácidos graxos e o número de insaturações afeta as propriedades físico-químicas do biocombustível, como número de cetano, estabilidade oxidativa e temperatura de entupimento a frio (WANG et al., 2014). Por exemplo, gorduras saturadas produzem um biodiesel com maior estabilidade oxidativa e um alto número de cetano, porém este combustível apresentará elevada temperatura de entupimento a frio, pois tendem a gelificar em temperatura ambiente. O biodiesel produzido a partir de matérias-primas ricas em óleos poli-insaturados terão menor temperatura de entupimento a frio, porém será mais suscetível a oxidação (HU et al., 2008).

A estabilidade oxidativa é uma das maiores adversidades encontradas no uso de biodiesel devido ao conteúdo elevado de *PUFAs* de diferentes matérias-primas. Ramos et al. (2009) testaram biodiesel de soja, palma, girassol e milho e todas as matérias-primas não alcançaram o mínimo de 6 horas de estabilidade oxidativa. No Brasil, a Resolução nº 45 de 25 de agosto de 2014 da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis especifica que o biodiesel deve apresentar no mínimo 8 horas de estabilidade para ser comercializado (ANP, 2014). Ramos et al. (2009) sugerem que uma solução viável para a aumentar a resistência do biodiesel a auto-oxidação é o uso de inibidores oxidativos ou antioxidantes.

A Tabela 11 apresenta a composição de ácidos graxos da soja e de *S. obliquus* e *Chlorella* sp. de diferentes autores. É possível observar que a relação de ácidos graxos saturados e insaturados se distancia de 1 em todas as matérias-primas, ou seja, a composição de ácidos graxos insaturados é superior à de ácidos graxos saturados. Portanto, faz-se necessária a adição de antioxidantes no biodiesel de soja e das microalgas *Chlorella* sp. ou *Scenedesmus* sp. para assegurar a sua estabilidade oxidativa conforme regulamentado pelas agências reguladoras de biocombustíveis. Alternativamente, pode-se recorrer à mistura de óleos de diferentes matrizes oleaginosas para se obter um óleo

misto com menor teor de ácidos graxos insaturados (GOUVEIA et al., 2017). O Anexo IV apresenta a composição de ácidos graxos provenientes de gordura animal e, semelhante à Tabela 11, a relação saturados/insaturados também se distancia de 1, exceto pelo sebo bovino, que apresenta teor semelhante de ácidos graxos saturados e insaturados.

Algumas microalgas, como *Scenedesmus obliquus*, podem apresentar maiores rendimentos em biomassa, porém o potencial de produtividade de metabólitos para fins de produção de biocombustíveis, como carboidratos e lipídeos, dependem diretamente dos seus respectivos teores (ROCHA et al., 2017). Sendo assim, *Chlorella* sp. possui maiores teores de carboidratos ($15,4 \pm 0,8 \% \text{ m m}_{\text{MSLC}}^{-1}$) do que *S. obliquus* BR003 e, adicionalmente, o perfil de ácidos graxos de *Chlorella* sp. mostrou-se adequado para a produção de biodiesel. Portanto, a cepa *Chlorella* sp. foi escolhida para a análise da extração integrada de carboidratos e lipídeos no presente trabalho.

Tabela 11: Composição de ácidos graxos do óleo de soja, *S. obliquus* e diferentes espécies de *Chlorella*.

Ácido graxo	Soja ¹	<i>S. obliquus</i> ²	<i>S. obliquus</i> ³	<i>S. obliquus</i> ⁴	<i>Chlorella</i> sp. ⁵	<i>Chlorella</i> <i>protothecoides</i> ⁶	<i>Chlorella vulgaris</i> ⁷
C14:0	n.d.	0,5	0,76	2	n.d	n.d	2
C16:0	11,3	26,1	26,5	18	26,1	14,9	20
C16:1	0,1	3,3	8,3	5	n.d	3,3	1
C18:0	3,6	5	10,7	1	5	3,9	1
C18:1	24,9	49,2	29,5	22	21,4	14,8	4
C18:2	53	5,7	16,4	15	13,6	31,5	19
C18:3	6,1	5,5	4,1	13	9	11,6	28
AGS	14,9	31,6	38	21	31,1	18,8	23
MUFAs	25	52,5	37,8	27	21,4	18,1	5
PUFAs	59,1	11,2	20,5	28	22,6	43,1	47
Relação saturado/insaturado	0,18	0,49	0,65	0,38	0,71	0,31	0,44

Fonte: ¹Ramos et al. (2009); ²Álvarez-díaz et al. (2015); ³Feng et al. (2014); ⁴Breuer et al. (2012); ⁵Ördög et al. (2016); ⁶Krzemińska et al. (2015);

⁷Breuer et al., (2012); n.d.: não detectado.

5.2. Caracterização da biomassa de *Chlorella* sp.

A microalga *Chlorella* sp. foi caracterizada segundo os conteúdos de carboidratos, lipídeos totais, proteínas totais, cinzas e umidade (Tabela 12). A composição de carboidratos em microalgas é complexa e consiste em uma mistura de açúcares neutros, aminoaçúcares e ácidos urônicos e sua composição varia de acordo com a espécie e condições de cultivo, ou seja, dependendo da espécie, são encontrados carboidratos poliméricos ou monoméricos, de reserva ou estrutural ou até mesmo frações de glicolipídeos e glicoproteínas (TEMPLETON et al., 2012). A composição dos metabólitos quantificados para *Chlorella* sp. apresentou-se dentro da faixa encontrada na literatura para esta linhagem (AZMAH et al., 2016; BECKER, 2007; SUGANYA et al., 2016a).

Carboidratos e lipídeos corresponderam a $11,6 \pm 0,2$ % (m m_{MSLC}⁻¹) e $13 \pm 0,59$ % (m m_{MSLC}⁻¹) de biomassa seca de *Chlorella* sp, respectivamente. A fração proteica foi a mais significativa ($57,9 \pm 2,4$ % m m_{MSLC}⁻¹), portanto, *Chlorella* sp. possui forte potencial biotecnológico para a valorização de todos os compostos em uma biorrefinaria.

Tabela 12: Composição centesimal de *Chlorella* sp. (% m m_{MSLC}⁻¹).

Componentes	
Carboidratos	$11,6 \pm 0,3$
Glicose	$5,1 \pm 0,2$
Galactose	$2,2 \pm 0,1$
Ribose	$2,2 \pm 0,2$
Xilose	$2,1 \pm 0,1$
Lipídeos	$13 \pm 0,6$
Proteína	$57,9 \pm 2,4$
Cinzas	$5,4 \pm 0,1$
Umidade	$6,9 \pm 0,2$
Total	$94,9$

Os monossacarídeos mais proeminentes foram D-glicose e D-galactose, correspondendo a 43,9 % e 18,9 % em massa de carboidratos totais, respectivamente. Apenas traços de frutose e arabinose foram encontrados. Portanto, biomassa de *Chlorella* sp. é adequada para fermentação de monossacarídeos a etanol pela levedura *K. marxianus*.

Templeton et al. (2012) encontraram $14,4 \pm 0,3 \%$ (m m^{-1}) de carboidratos totais para *Chlorella* sp. sendo os teores de glicose e galactose de $5,1 \pm 0,1$ e $5,7 \pm 0,2 \%$ (m m^{-1}), respectivamente. Souza et al., (2017) quantificaram os açúcares de *Chlorella* sp. comercial e obtiveram, 12,1 % em massa seca.

A baixa concentração de xilose comparada a glicose sugere que *Chlorella* sp. tenha uma pequena quantidade de hemicelulose na parede celular. Gerken, Donohoe e Knoshaug (2012) estudaram o impacto das enzimas celulase e lisozima, a qual atua na degradação de polímeros de glucosamina, no cultivo de *Chlorella vulgaris* e observaram que as células de *C. vulgaris* se tornaram mais irregulares na presença de ambas as enzimas do que na presença de cada uma delas separadamente. Estes resultados indicam que a celulose não desempenha um papel importante na integridade da parede celular de *C. vulgaris*, embora uma pequena quantidade de celulose, ou outro polissacarídeo semelhante, também hidrolisável por celulasas, possa estar presente nesta estrutura.

O teor de amido encontrado para a cepa do presente trabalho ($3,57 \pm 0,46 \%$ $\text{mglicose mMSLC}^{-1}$) sugere que 70 % de glicose é proveniente deste polissacarídeo de reserva. Ortiz-tena et al. (2016) caracterizaram *Chlorella vulgaris* e, baseado na massa de carboidratos totais, amido correspondeu a 46,9 % enquanto polissacarídeos estruturais a apenas 6 %. Takeda (1991) reportou que a parede celular de *Chlorella* sp. representa apenas 3 a 6 % do total de biomassa seca, reforçando a hipótese de que celulose contribui com uma porcentagem pequena na massa seca total de *Chlorella* sp. enquanto amido constitui a maior parte dos carboidratos totais.

5.3. Otimização da hidrólise ácida de *Chlorella* sp.

O desempenho da hidrólise ácida da biomassa de *Chlorella* sp foi investigada utilizando um delineamento composto central constituído de um planejamento fatorial completo 2^4 com 8 pontos axiais e 4 repetições no ponto central, totalizando 28 ensaios. Avaliou-se a influência da temperatura (A), tempo de residência no reator (B), concentração de ácido sulfúrico (C) e concentração de biomassa (D) no rendimento de carboidratos neutros totais durante hidrólise da biomassa de *Chlorella* sp. O planejamento decodificado e a resposta experimental observada estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13: Delineamento composto central, com valores decodificados e resposta experimental observada: rendimento de carboidratos neutros totais (RC, % m m_{carboidratos}⁻¹).

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	H ₂ SO ₄ (% v v ⁻¹)	Concentração de biomassa (g L ⁻¹)	RC (% m m _{carboidratos} ⁻¹)
1	60	30	3	20	15,0 ± 1,2
2	60	30	3	40	13,8 ± 0,6
3	60	30	8	20	18,8 ± 0,4
4	60	30	8	40	19,8 ± 0,5
5	60	70	3	20	26,1 ± 2,7
6	60	70	3	40	14,40 ± 0,7
7	60	70	8	20	27,5 ± 1,4
8	60	70	8	40	22,9 ± 1,1
9	100	30	3	20	71,3 ± 4,9
10	100	30	3	40	61,0 ± 2,4
11	100	30	8	20	81,0 ± 5,8
12	100	30	8	40	60,0 ± 2,1
13	100	70	3	20	59,9 ± 4,1
14	100	70	3	40	46,7 ± 0,1
15	100	70	8	20	65,3 ± 1,1
16	100	70	8	40	52,2 ± 3,0
17	40	50	5,5	30	13,7 ± 0,6
18	120	50	5,5	30	83,0 ± 3,5
19	80	10	5,5	30	24,7 ± 0,4
20	80	90	5,5	30	39,1 ± 1,9
21	80	50	0,5	30	13,7 ± 0,5
22	80	50	10,5	30	49,3 ± 3,6
23	80	50	5,5	10	44,5 ± 4,0
24	80	50	5,5	50	32,8 ± 1,9
25	80	50	5,5	30	32,3 ± 2,3
26	80	50	5,5	30	34,1 ± 1,6
27	80	50	5,5	30	33,5 ± 0,5
28	80	50	5,5	30	28,4 ± 1,7

De acordo com os valores observados em cada tratamento, o modelo de regressão de segunda ordem para o rendimento de carboidratos neutros totais (RC) pode ser expresso pela Equação 4.

$$RC (\%) = -27,7 + 0,096A + 0,873B + 1,05C - 0,51D + 0,012A^2 + 0,0013B^2 + 0,068C^2 + 0,022D^2 - 0,011AB + 0,00AC - 0,0128AD + 0,003BC - 0,00346BD - 0,0033CD \quad (4)$$

A análise de variância (Tabela 14) sugere um modelo quadrático com p-valor < 0,05 e elevado coeficiente de determinação ($R^2 = 94,9$ e $R^2_{\text{ajuste}}=89,5$) indicando um bom ajuste. Os coeficientes de temperatura quadrático (A^2), temperatura linear (A), concentração de ácido linear (C), concentração de biomassa linear (D) e interação entre temperatura e tempo (AB) têm efeitos significativos no rendimento de carboidratos neutros totais, confirmados pelos p-valores menores que 0,05. Dentre estes fatores, temperatura e concentração de ácido afetam positivamente a resposta, ou seja, quanto maior a temperatura e a concentração de ácido, melhor será o rendimento de hidrólise, porém quanto menor for a concentração de biomassa na mistura, maior será o rendimento.

O coeficiente de interação AB, significativo e negativo, indica que temperatura e tempo atuam de forma a equilibrar a resposta, ou seja, quanto maior for esta interação, menor será o rendimento. Portanto, espera-se que os parâmetros tempo e temperatura de hidrólise atuem juntos e de maneira inversa no processo de despolimerização dos polissacarídeos de *Chlorella* sp. (Figura 9A). A Equação 4 também permite inferir que a concentração de ácido contribui de maneira mais significativa devido ao seu coeficiente ser maior do que os demais ($C > D > A > A^2 > AB$). O efeito não significativo da falta de ajuste valida a adequação do modelo.

Tabela 14: Análise de variância do modelo quadrático.

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	14	11425,9	816,14	17,35	0,000 ^a
A: Temperatura	1	9500,1	9500,08	201,96	0,000 ^a
B: Tempo	1	0,4	0,43	0,01	0,925 ^b
C: Concentração de ácido	1	509,2	509,23	10,83	0,006 ^a
D: Concentração de biomassa	1	397,0	396,97	8,44	0,012 ^a
A ²	1	512,8	512,84	10,90	0,006 ^a
B ²	1	6,2	6,22	0,13	0,722 ^b
C ²	1	4,3	4,29	0,09	0,768 ^b
D ²	1	116,4	116,43	2,48	0,140 ^b
AB	1	328,4	328,43	6,98	0,020 ^a
AC	1	0,0	0,00	0,00	1,000 ^b
AD	1	104,7	104,69	2,23	0,160 ^b
BC	1	0,4	0,35	0,01	0,932 ^b
BD	1	7,6	7,64	0,16	0,693 ^b
CD	1	0,1	0,11	0,00	0,962 ^b
Erro	13	611,5	47,04		
Falta de ajuste	10	592,0	59,20	9,10	0,048 ^b
Erro puro	3	19,5	6,50		
Total	27	12037,4			
R ²	94,9				
R ² ajuste	89,5				

^a termo significativo ($p < 0,05$); ^b termo não significativo ($p \geq 0,05$).

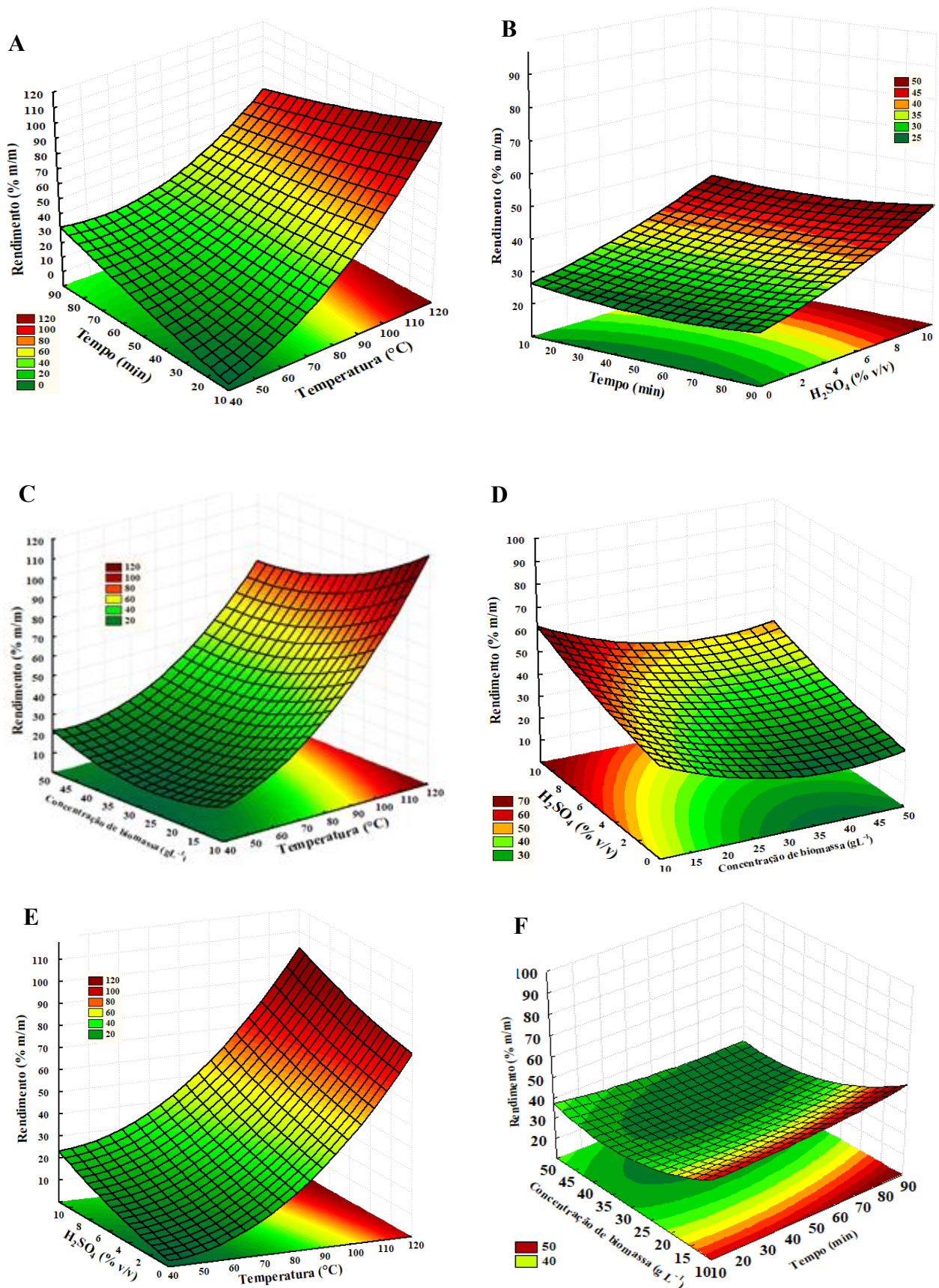


Figura 9: Superfícies de resposta para o rendimento de carboidratos neutros totais na hidrólise ácida de *Chlorella* sp. variando (a) tempo e temperatura, (b) tempo e concentração de H_2SO_4 , (c) concentração de biomassa e temperatura, (d) concentração de H_2SO_4 e biomassa, (e) concentração de H_2SO_4 e temperatura e (f) concentração de biomassa e tempo.

Uma concentração elevada de ácido, entretanto, não é desejada devido à possibilidade de formação de inibidores como 5-hidroximetil-2-furfuraldeído, furfural, ácido acético, láctico e propiônico. Miranda, Passarinho e Gouveia (2012) estudaram o efeito da concentração de ácido sulfúrico na faixa de 0,05 a 10 N (0,025 a 5 mol L⁻¹) no rendimento de açúcares na hidrólise de *Scenedesmus obliquus* e observaram um decaimento do rendimento em concentrações maiores que 2 N (1 mol L⁻¹). Os hidrolisados foram então rastreados quanto à presença de ácidos acético, fórmico, furfural e 5-hidroximetil-2-furfuraldeído. Em nenhum dos hidrolisados foi detectada a presença de furfural, provavelmente, devido a um baixo nível de hidrólise dos polímeros de hemicelulose. Entretanto, foi detectada a presença de ácidos láctico, butírico e propiônico, compostos derivados do metabolismo das algas, sendo o ácido propiônico detectado apenas em concentrações menores que 2 N. Miranda, Passarinho e Gouveia (2012) também observaram que os ácidos acético e fórmico aumentaram proporcionalmente com o aumento da concentração de ácido.

De forma semelhante, Wang et al. (2014) investigaram o efeito da variação da concentração de ácido sulfúrico entre 1-17 % (v v⁻¹) na hidrólise de 5 % (m v⁻¹) da biomassa de *Tribonema* sp. a 121 °C e 30 minutos e observaram que 81,5 % de açúcares foram hidrolisados quando se utilizou concentrações de ácido sulfúrico superiores a 3 % (v v⁻¹). Porém, o conteúdo de açúcar apresentou declínio em concentrações de ácido sulfúrico maiores que 11 % (v v⁻¹). Wang et al. (2014) sugerem que este declínio se deve à degradação de glicose e xilose a furfural e 5-hidroximetil-2-furfuraldeído, minimizando portanto, o rendimento em açúcares.

No presente estudo, a concentração de ácido contribuiu de maneira positiva para a extração de monossacarídeos. Realizou-se um teste preliminar, em que a biomassa de *Chlorella* sp. foi hidrolisada utilizando uma carga de sólidos de 50 g L⁻¹ e diferentes concentrações de H₂SO₄, em autoclave a 121°C, por 30 minutos. Observou-se que, à medida que a concentração de ácido aumenta, de fato, o rendimento aumenta proporcionalmente, não havendo declínio na faixa de concentração estudada (Figura 10). Sugere-se, portanto, que a hidrólise ácida de *Chlorella* sp. não gera inibidores em concentrações relevantes, capazes de afetar o rendimento final de hidrólise. Logo, pode-se inferir também, que os produtos de degradação de açúcares, bem como os ácidos orgânicos, não atingem concentrações tóxicas para leveduras e, provavelmente, não afetariam o desempenho da fermentação.

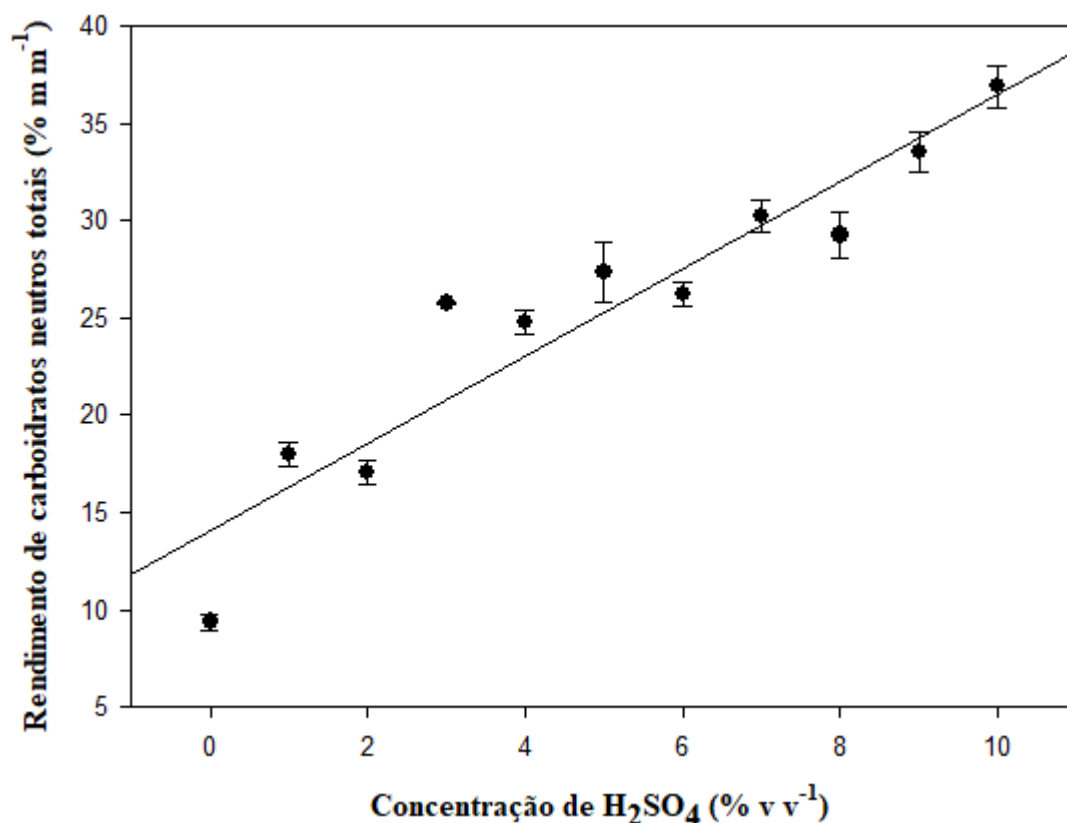


Figura 10: Efeito da concentração de H₂SO₄ na hidrólise de *Chlorella* sp. A hidrólise ácida foi realizada em autoclave a 121 °C, por 30 minutos, utilizando uma carga de sólidos de 50 g L⁻¹.

Considerando a necessidade de minimizar os custos do processo, optou-se por utilizar uma dose mínima de ácido sulfúrico e, portanto, escolheu-se o tratamento com H₂SO₄ 5 % (v v⁻¹), 120 °C, tempo de residência de 10 minutos e concentração de biomassa de 10 g L⁻¹ como a hidrólise que gerou melhor rendimento de carboidratos neutros totais. Para o estudo das rotas, entretanto, estabeleceu-se uma concentração de biomassa de 20 g L⁻¹ devido a possíveis perdas de biomassa no processo das Rotas 1 e 2 e em função das concentrações de biomassa/solvente (5 % m v⁻¹ ou 50 g L⁻¹) na etapa de extração de lipídeos.

5.4. Extração integrada de carboidratos e lipídeos de *Chlorella* sp.

Uma vez analisados os processos de extração de lipídeos e carboidratos independentemente, o processo integrado foi estudado objetivando sua utilização em uma biorrefinaria de biodiesel e bioetanol. A hidrólise ácida e extração de lipídeos com os solventes etanol e hexano foram testados de acordo com os fluxogramas apresentados na Figura 11. A biomassa seca e macerada de *Chlorella* sp. foi submetida a extração de lipídeos seguida de hidrólise ácida (Rota 1) e hidrólise ácida seguida de extração de lipídeos (Rota 2).

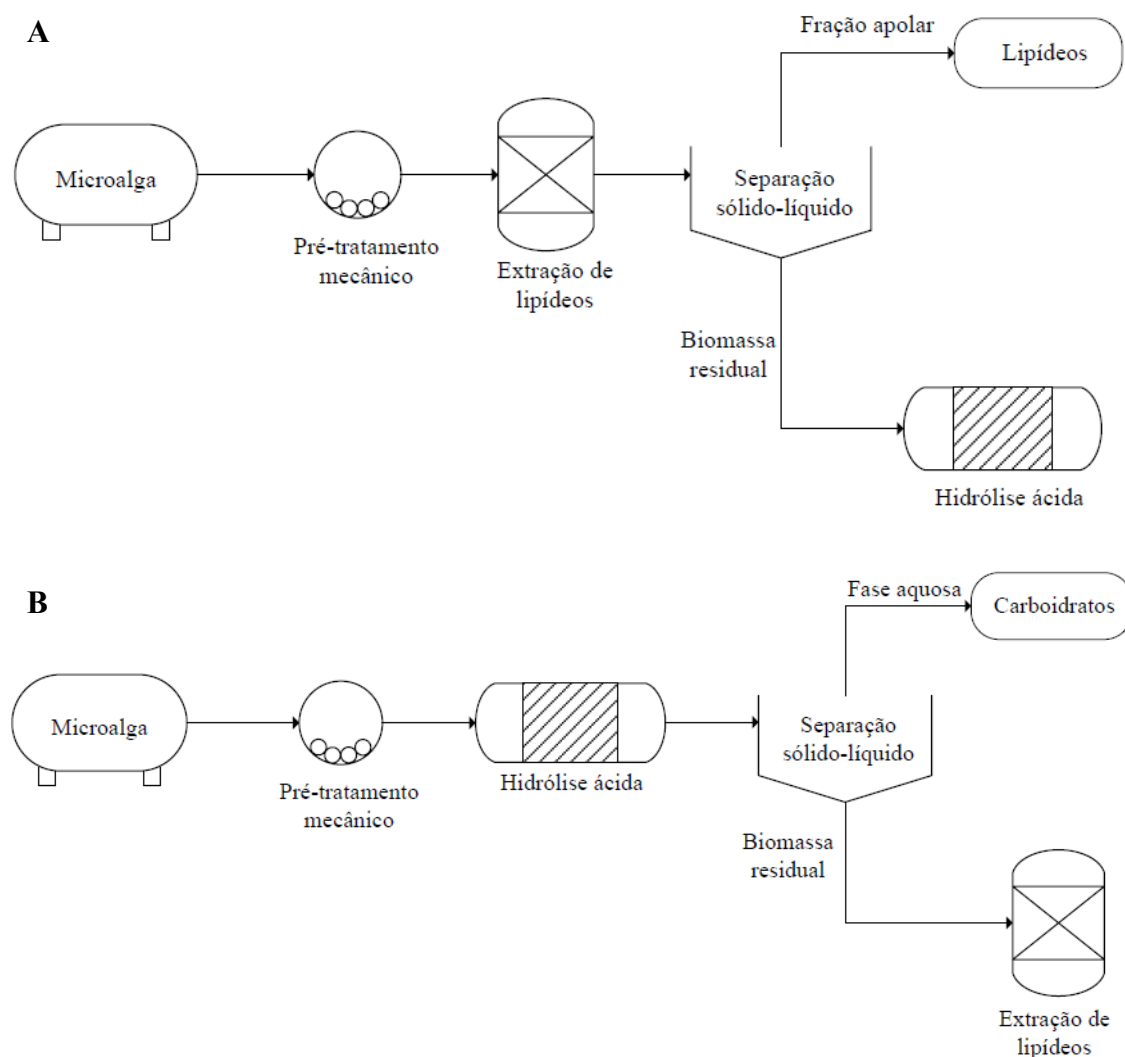


Figura 11: Fluxograma do processo de extração integrada de lipídeos e carboidratos de *Chlorella* sp. (a) Rota 1: extração de lipídeos – hidrólise ácida; (b) rota 2: hidrólise ácida – extração de lipídeos.

5.4.1. Conteúdo de lipídeos na biomassa residual e fase aquosa pós hidrólise

Primeiramente, realizou-se um estudo de verificação da possível migração de lipídeos para a fase aquosa após hidrólise ácida seguida da separação das frações mássica e líquida. Dois tratamentos foram testados visando investigar àquele que promoveu o maior rendimento de carboidratos neutros totais (Tabela 15).

Tabela 15: Hidrólise ácida de *Chlorella* sp. e rendimento carboidratos e lipídeos da fase aquosa e biomassa residual.

Tratamento	T ¹ (°C)	t ² (min)	H ₂ SO ₄ (% v v ⁻¹)	Cbio ³ (g L ⁻¹)	RC ⁴ (% m m ⁻¹)	Teor de lipídeos (% m m _{MSLC} ⁻¹)	
						Biomassa residual	Fase aquosa
1	100	40	5	10	49,1 ± 3,6	10,9 ± 0,1 ^a	17,5 ± 1,2 ^a
2	120	10	5	10	88,8 ± 4,6	12,1 ± 0,9 ^a	21,1 ± 1,1 ^b

¹T: temperatura; ²t: tempo; ³Cbio: concentração de biomassa; ⁴RC: rendimento de carboidratos.

*Letras iguais, para cada coluna dos teores de lipídeos, fase aquosa e biomassa residual, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a um nível 5 % de significância.

Após hidrólise ácida de *Chlorella* sp., a biomassa residual e a fase aquosa foram separadas e os teores de lipídeos foram quantificados de acordo com metodologia de Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1986). O teor de lipídeos da biomassa intacta, segundo mesma metodologia, foi de 13,2 ± 0,09 % (m m_{MSLC}⁻¹).

Os lipídeos corresponderam a 10,9 ± 0,1 e 12,1 ± 0,9 % (m m_{MSLC}⁻¹) da biomassa residual, para os tratamentos 1 e 2, respectivamente (Tabela 15). Observou-se que um maior rendimento de lipídeos extraídos da biomassa de *Chlorella* sp. (91,6 %) foi favorecida por condições mais severas de hidrólise ácida (i.e. tratamento 2), ao passo que o tratamento 1 resultou em um menor rendimento de extração de lipídeos (82,3 %). Da mesma maneira, o extrato rico em lipídeos da fase aquosa correspondeu a um maior teor no tratamento 2, indicando que o rompimento da biomassa foi mais efetivo neste tratamento.

Entretanto, observa-se, na Tabela 15, que o balanço material do extrato rico em lipídeo da biomassa residual e da fase aquosa excede o teor de lipídeos totais encontrado para a biomassa intacta. Portanto, investigou-se a concentração de lipídeos neutros totais presentes nos extratos utilizando espectroscopia de fluorescência (DE LA HOZ

SIEGLER et al., 2012). Observou-se um baixo teor de lipídeos neutros totais nos extratos da fase aquosa nos dois tratamentos, enquanto que, na biomassa residual, o teor de lipídeos neutros totais foi de $84,6 \pm 6,8$ e $94,8 \pm 3,8$ ($\% \text{ m}_{\text{lipídeos neutros}} \text{ m}_{\text{lipídeos totais}}^{-1}$) para os tratamentos 1 e 2, respectivamente (Tabela 16).

Tabela 16: Lipídeos neutros totais de *Chlorella* sp. quantificados por espectroscopia de fluorescência ($\% \text{ m}_{\text{lipídeos neutros}} \text{ m}_{\text{lipídeos totais}}^{-1}$).

Tratamento	Lipídeos neutros totais ($\% \text{ m}_{\text{lipídeos neutros}} \text{ m}_{\text{lipídeos totais}}^{-1}$)	
	Biomassa residual	Fase aquosa
1	$84,3 \pm 6,8^b$	$0,016 \pm 0,01^a$
2	$94,5 \pm 3,8^a$	$0,039 \pm 0,01^a$

Letras iguais, para a mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a um nível 5 % de significância.

Lipídeos neutros encontram-se no citoplasma complexados, via forças de Van der Waals, a lipídeos polares, que por sua vez, são conectados a proteínas da membrana celular por meio de ligações de hidrogênio. As interações de Van der Waals formadas entre o solvente apolar e os lipídeos neutros não são capazes de alterar o complexo entre lipídeos polares e proteínas da membrana celular. Entretanto, ao utilizar uma mistura de solventes polar e apolar, como o método Schmid-Bondzynski-Ratzlaff, o solvente polar forma ligações de hidrogênio com os lipídeos polares, rompendo a associação lipídeos polares e proteínas. A adição de um solvente polar facilita a extração de lipídeos neutros complexados à membrana celular, porém, inevitavelmente este processo também extrai lipídeos polares (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

As Tabelas 15 e 16 indicam que a hidrólise ácida favoreceu a posterior extração de lipídeos. O tratamento 2 resultou em uma elevada extração de lipídeos neutros (94,5 %) da biomassa residual de *Chlorella* sp. A extração de lipídeos da fase aquosa apresentou baixo teor de lipídeos neutros conforme análise por espectroscopia de fluorescência (Tabela 16). Estes resultados sugerem que os lipídeos observados na fração aquosa são lipídeos polares, como glicolipídeos e fosfolipídeos, que provavelmente migraram para a fase hidrofílica após a hidrólise ácida.

Diferentes monossacarídeos podem ser encontrados no hidrolisado de microalgas, assim como peptídeos, aminoácidos, glicolipídeos, pigmentos e outras moléculas da parede celular (TEMPLETON et al., 2012). Possivelmente, estes componentes migraram para o solvente polar, sendo extraídos juntamente com a fração apolar. De fato, observou-

se um rendimento de 91,6 % de lipídeos extraídos da biomassa residual após hidrólise ácida no tratamento 2, portanto, sugere-se que 8,4 % de lipídeos polares migraram para fase hidrofílica no processo de hidrólise ácida.

Logo, a fração aquosa após a hidrólise ácida não apresentou um teor significativo de lipídeos, uma vez que a biomassa hidrolisada residual concentra 95 % de lipídeos neutros e, portanto, não foi utilizada para a extração de lipídeos nas Rotas 1 e 2. Os lipídeos neutros são a principal classe de lipídeos para o processo de transesterificação de triacilgliceróis de óleos e gorduras para a produção de biodiesel, sendo amplamente utilizados em escala industrial.

5.4.2. Rotas de extração de carboidratos e lipídeos de *Chlorella* sp.

As extrações de lipídeos e carboidratos seguiram as condições estabelecidas anteriormente neste trabalho. Os lipídeos foram extraídos utilizando os solventes etanol e hexano na proporção 1:2 em 4 estágios de extração. Os carboidratos foram extraídos utilizando uma solução de ácido sulfúrico a 5 % (v v⁻¹), concentração de sólidos (biomassa) de 20 g L⁻¹ a 120 °C por 10 minutos. Os rendimentos de extração para ambas as rotas se encontram na Tabela 17.

Tabela 17: Rendimentos de carboidratos e lipídeos, de *Chlorella* sp., obtidos via Rotas 1 e 2.

	Estágio 1	Estágio 2	Produto	Teor (% m m _{MSLC} ⁻¹)	Rendimento (% m m ⁻¹)
Rota 1	Extração de lipídeos	Extração de carboidratos	Lipídeos	8,2 ± 0,2 ^b	67,9 ± 2,0 ^b
			Carboidratos	11,5 ± 0,7 ^a	79,9 ± 5,5 ^a
Rota 2	Extração de carboidratos	Extração de lipídeos	Lipídeos	18,5 ± 1,2 ^a	152,8 ± 10,0 ^a
			Carboidratos	10,5 ± 0,3 ^a	73,2 ± 1,9 ^a

Os teores e rendimentos para lipídeos e carboidratos foram comparados com um teste Tukey a um nível 5% de significância. Letras iguais para o mesmo produto, na mesma coluna, significam médias iguais.

O teor de lipídeos extraídos foi de 8,2 ± 0,2 % (m m_{MSLC}⁻¹) e 18,5 ± 1,2 % (m m_{MSLC}⁻¹), nas Rotas 1 e 2, respectivamente. Esses teores foram expressos em relação a massa seca e livre de cinzas da biomassa empregada. Portanto, sugere-se que a hidrólise ácida é eficiente como um pré-tratamento no qual a parede celular é rompida e os lipídeos intracelulares podem ser extraídos mais facilmente.

Ao extrair os lipídeos primeiramente (Rota 1), observou-se um pequeno acréscimo, ainda que não significativo, no rendimento de carboidratos. A análise de

amido para ambas as rotas também indica que a extração de lipídeos com etanol e hexano, além de remover componentes hidrofóbicos, auxilia na ruptura da parede celular, uma vez que o conteúdo de amido da biomassa intacta corresponde a $3,57 \pm 0,46$ % ($\text{mg}_{\text{glicose}} \text{m}_{\text{MSLC}}^{-1}$) e posterior à extração de lipídeos, na Rota 1, corresponde a $4,48 \pm 0,29$ % ($\text{mg}_{\text{glicose}} \text{m}_{\text{MSLC}}^{-1}$). A hidrólise ácida, nas condições estabelecidas, foi adequada para a despolimerização dos carboidratos de reserva pois observou-se um teor de amido de $0,21 \pm 0,02$ % ($\text{mg}_{\text{glicose}} \text{m}_{\text{MSLC}}^{-1}$) após a hidrólise (Figura 12). Desta forma, conclui-se que o processo de extração de lipídeos não resulta em degradação dos carboidratos de reserva (amido) e estruturais (celulose).

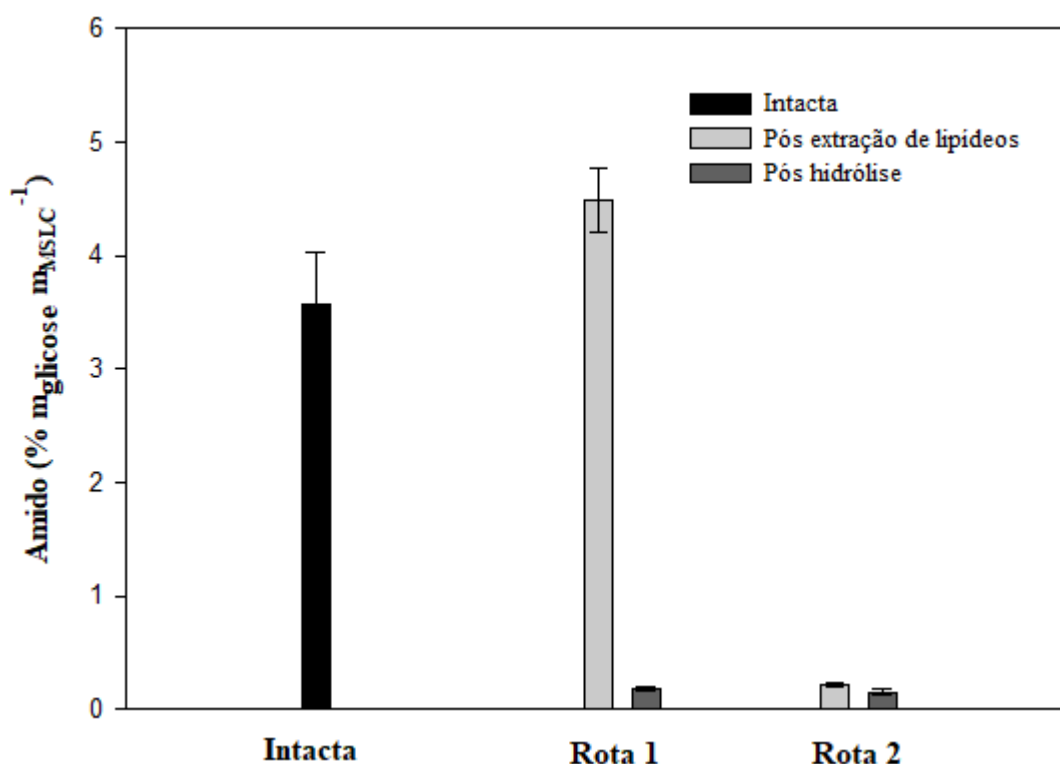


Figura 12: Conteúdo de amido da biomassa intacta e das biomassas residuais, obtidas nos processos da Rota 1 (extração de lipídeos – hidrólise ácida) e Rota 2 (hidrólise ácida – extração de lipídeos).

Wang et al. (2014) observaram que o rendimento de lipídeos neutros totais da microalga *Tribonema* sp. foi de 25,8 % (m m^{-1}), e aumentou para 79,6 % (m m^{-1}) quando a biomassa foi previamente hidrolisada utilizando ácido sulfúrico. Lee, Oh e Lee (2015) observaram que a extração de lipídeos de *Chlorella* sp. KR-1 antes da hidrólise ácida com ácido clorídrico resultou em uma extração de carboidratos mais eficiente, sendo obtidos 49,7 % (m m^{-1}) de carboidratos neutros totais ao passo que a hidrólise da biomassa intacta resultou em 36,1% (m m^{-1}). Sivaramakrishnan e Incharoensakdi (2018), identificaram que

a hidrólise de *Scenedesmus* sp. anterior à transesterificação *in situ* gerou perdas no conteúdo de *FAMES*, ao passo que a transesterificação *in situ* anterior a hidrólise não resultou em diferenças significativas no rendimento de carboidratos. A extração de lipídeos com solvente orgânico, portanto, torna a parede celular mais susceptível à hidrólise ácida, possibilitando a despolimerização de polissacarídeos estruturais em monossacarídeos sem deteriorá-los.

Os lipídeos extraídos após a hidrólise de *Chlorella* sp. apresentaram um rendimento superior (150 % m m⁻¹) em relação ao teor de lipídeos observados na biomassa intacta (Tabela 17). Halim et al. (2011) obtiveram resultado semelhante ao utilizar isopropanol e hexano na extração de lipídeos de *Chlorococcum* sp. Neste estudo, os autores observaram que, ao utilizar 1 grama de biomassa seca, 0,048 g de lipídeos foram extraídos com a mistura isopropanol e hexano. A extração de lipídeos utilizando apenas hexano resultou em apenas 0,015 g de lipídeos, ou seja, houve um rendimento de 220 % em relação a extração apenas com hexano.

Lipídeos polares, como fosfolipídeos e glicolipídeos, estão principalmente associados com proteínas presentes na membrana celular via ligações de hidrogênio. Assim, o uso de um solvente polar (*e.g.* etanol) pode romper o complexo entre lipídeos polares e proteínas antes de serem extraídos por um solvente apolar (*e.g.* hexano). Além disso, embora o hexano interaja prontamente com moléculas lipídicas neutras, os triglicerídeos geralmente formam estruturas do tipo micelar em seu estado natural, que impedem a extração quantitativa dos mesmos. Assim, solventes apolares como o hexano frequentemente requerem o uso de um álcool para a rápida dissolução das micelas e liberação de TAGs (HALIM et al., 2011; HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012). Ademais, misturas de solventes contendo álcool inativam muitas das fosfatidases e lipases degradantes de lipídeos. No entanto, os solventes alcoólicos também extraem outros compostos celulares, como açúcares, aminoácidos, sais, proteínas hidrofílicas e pigmentos. Portanto, o extrato bruto (*i.e.* fração apolar) deve ser purificado para remover esses compostos hidrofílicos com um sistema contendo por exemplo, clorofórmio, metanol e água (MEDINA et al., 1998).

Em vista do alto rendimento em lipídeos encontrado para a Rota 2, a fim de se verificar se houve migração de compostos polares para a fase lipídica, ambas as frações obtidas (*i.e.* óleo bruto) das Rotas 1 e 2 foram submetidas a uma etapa de refino por meio do procedimento de extração de lipídeos proposto por Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1986). A fase superior apolar foi utilizada para quantificação gravimétrica de lipídeos totais, e a fase inferior polar foi utilizada na

determinação de carboidratos neutros totais por espectrofotometria (MASUKO et al., 2005).

A Tabela 18 sumariza a concentração de carboidratos e lipídeos presentes nas fases polar e apolar, respectivamente, após o tratamento dos extratos lipídicos das Rotas 1 e 2, segundo metodologia de Schmid-Bondzynski-Ratzlaff. Observa-se que houve uma redução no rendimento de lipídeos em ambas as rotas, e que houve migração de carboidratos neutros totais de $4,4 \pm 0,4$ % e $0,44 \pm 0,04$ % ($m\ m_{\text{carboidratos}}^{-1}$) para a fase apolar (hexano) nas Rotas 1 e 2, respectivamente. Portanto, o elevado teor de lipídeos obtido ao se utilizar o sistema etanol:hexano 1:2 pode ser justificado, em parte, pela presença de carboidratos extraídos pela fase etanólica. Nota-se que os carboidratos contribuem em uma menor porcentagem no extrato polar da Rota 2, uma vez que na Rota 1, a extração de lipídeos ocorre anteriormente a despolimerização de carboidratos, e, portanto, a maior parte dos polissacarídeos estavam presentes na biomassa.

Tabela 18: Teores de carboidratos e lipídeos de *Chlorella* sp., nas fases polar e apolar do sistema Schmid-Bondzynski-Ratzlaff.

	Estágio 1	Estágio 2	Produto	Teor % ($m\ m_{\text{MSLC}}^{-1}$)	Rendimento % ($m\ m_{\text{metabólito}}^{-1}$)
Rota 1	Extração de lipídeos	Extração de carboidratos	Lipídeos	$6,8 \pm 0,8^b$	$49,9 \pm 5,6^b$
			Carboidratos	$0,63 \pm 0,05^a$	$4,4 \pm 0,4^a$
Rota 2	Extração de carboidratos	Extração de lipídeos	Lipídeos	$12,7 \pm 1,0^a$	$96,3 \pm 7,5^a$
			Carboidratos	$0,06 \pm 0,005^b$	$0,44 \pm 0,04^b$

Os teores e rendimentos para lipídeos e carboidratos foram comparados com um teste Tukey a um nível 5% de significância. Letras iguais para o mesmo produto, na mesma coluna, significam médias iguais.

Os resultados mostrados nas Tabelas 17 e 18 corroboram o uso do tratamento ácido para a despolimerização dos polissacarídeos da parede celular e de reserva, bem como a liberação do conteúdo citoplasmático contendo os metabolitos de interesse. A biomassa hidrolisada por via ácida, e submetida a etapa de extração de lipídeos, apresentou uma eficiência de extração de lipídeos de $96,3 \pm 7,5$ % ($m\ m_{\text{lipídeos}}^{-1}$), enquanto que a biomassa macerada (Rota 1) apresentou apenas $49,9 \pm 5,6$ % ($m\ m_{\text{lipídeos}}^{-1}$) (Tabela 18).

5.4.3. Composição de ácidos graxos de *Chlorella* sp.

Os lipídeos totais de *Chlorella* sp. extraídos nas Rotas 1 e 2 com a mistura de solventes etanol:hexano (1:2) foram submetidos à uma esterificação ácida. Os perfis de ácidos graxos de *Chlorella* sp. estão descritos na Tabela 19 e os cromatogramas estão no Anexo III.

Os perfis graxos das Rotas 1 e 2 são ricos em ácidos palmítico (C16:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3). Portanto, os lipídeos de ambas as rotas são ideais para a produção de biodiesel, pois contribuem para a melhora de propriedades como densidade, viscosidade, ponto de fulgor e poder colorífico. (FENG et al., 2014; SIVARAMAKRISHNAN; INCHAROENSAKDI, 2018).

Tabela 19: Perfil de ácidos graxos dos lipídeos de *Chlorella* sp. obtidos via Rotas 1 e 2 e respectiva conversão em *FAMES* (%).

Ácido graxo	Rota 1	Rota 2
C16:0	18,8 ± 0,02 ^a	20,9 ± 0,9 ^a
C16:1	4,6 ± 0,9 ^a	5,4 ± 0,5 ^a
C18:0	2,5 ± 0,3 ^a	2,0 ± 0,1 ^a
C18:1	19,8 ± 0,7 ^a	15,4 ± 0,9 ^b
C18:2	17,8 ± 0,9 ^b	23,8 ± 0,8 ^a
C18:3	27,5 ± 0,4 ^a	26,3 ± 0,6 ^a
C20:0	1,8 ± 0,2	n.d.
AGS	23,1 ^a	22,9 ^a
MUFAs	24,5 ^a	20,9 ^a
PUFAs	45,2 ^a	50,1 ^a
Relação saturado/insaturado	0,33	0,32
Conversão em <i>FAMES</i>	48,5 ± 2,2 ^b	55,9 ± 2,4 ^a

Os teores de ácidos graxos foram comparados com um teste Tukey a um nível 5% de significância. Letras iguais na mesma linha indicam médias iguais a 5 % de significância.

Embora o perfil seja composto majoritariamente por *PUFAs*, o teor não foi alterado no processo de hidrólise (Rota 2), visto que não houve diferença significativa no teor total de *PUFAs*. Deste modo, sugere-se que coprodutos de valor agregado, como ácidos graxos ômega-3, podem ser obtidos por meio da Rota 2. Isto é particularmente importante uma vez que várias cepas de microalgas podem acumular quantidades consideráveis de *PUFAs*, junto com os ácidos graxos destinados à produção de

biocombustíveis, e valorizá-los em uma biorrefinaria ajudaria a reduzir ainda mais o custo da produção de biocombustíveis (SUGANYA et al. 2016). Adicionalmente, o perfil graxo não apresentou diferença significativa, exceto pelos ácidos oleico (C18:1) e linoleico (C18:2). Sugere-se que os grupos de ácidos graxos C18:2 e C18:1 presentes em lipídeos polares tenham sido removidos no processo de hidrólise ácida (Rota 2), gerando ácidos graxos livres, que então, foram esterificados a *FAMES*.

Observa-se que a conversão em *FAMES* difere estatisticamente nas Rotas 1 e 2. Sugere-se que a hidrólise ácida (Rota 2) tenha contribuído para a liberação de lipídeos saponificáveis de *Chlorella* sp., o que levou a um acréscimo de 13 % na conversão em *FAMES*. Segundo Yao et. al (2015), *Chlorella* sp. apresenta aproximadamente 20 % de lipídeos insaponificáveis (hidrocarbonetos, esteróis, β -caroteno), além de frações similares de TAGs, ácidos graxos livres e lipídeos polares. A conversão em *FAMES* de $55,9 \pm 2,4$ % indica que a Rota 2 foi mais eficiente em extrair lipídeos saponificáveis quando comparada a Rota 1.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho e os objetivos propostos, conclui-se que é possível realizar a extração integrada de carboidratos e lipídeos de microalgas, em especial, a clorofícea *Chlorella* sp.

Verificou-se que a extração de lipídeos com solvente orgânico requer quatro estágios de extração para se obter um elevado rendimento de lipídeos, contribuindo para a redução dos custos de produção em uma biorrefinaria. A mistura de solventes etanol:hexano (1:2) resultou em um rendimento de 93 % de lipídeos de *Chlorella* sp., mostrando-se uma alternativa eficiente e de menor toxicidade.

A cepa de *S. obliquus* BR003 apresentou um teor de amido de $0,66 \pm 0,02$ % ($\text{m}_{\text{glicose}} \text{ m}_{\text{MSLC}}^{-1}$), sugerindo que o tratamento térmico de 80 °C durante 30 minutos empregado não interrompeu o metabolismo de degradação dos polissacarídeos de reserva. Sendo assim, *Chlorella* sp., que apresentou um teor total de monossacarídeos de aproximadamente 12 % ($\text{m m}_{\text{MSLC}}^{-1}$), foi selecionada para a análise da extração integrada de lipídeos e carboidratos em duas rotas distintas.

A otimização da hidrólise ácida de *Chlorella* sp. foi realizada variando-se temperatura, tempo, concentração de ácido sulfúrico e concentração de biomassa. Observou-se que maiores concentrações de ácido combinada a elevada temperatura, e menores concentrações de biomassa resultaram em um maior rendimento de hidrolisados. A fermentação do hidrolisado pode ser uma alternativa conjunta, porém, novos estudos devem ser realizados a fim de se verificar a produção de compostos inibidores na faixa de concentração de ácido estudada, para *Chlorella* sp.

A hidrólise ácida de *Chlorella* sp. resultou em 80 % e 73 % ($\text{m m}_{\text{carboidratos totais}}^{-1}$) nas Rotas 1 e 2, respectivamente. A extração de lipídeos anterior a hidrólise (Rota 1) não degrada os polissacarídeos, logo a biomassa residual pode ser utilizada para a extração de carboidratos. A hidrólise anterior à extração de lipídeos (Rota 2) acarretou em um aumento de 48 % de lipídeos extraídos, indicando que a hidrólise funciona como um excelente pré-tratamento para ruptura da parede celular.

O perfil graxo de *Chlorella* sp. apresentou elevados teores de ácidos palmítico (C16:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3), logo, adequado para a produção de biodiesel. O perfil se manteve semelhante nas duas rotas, porém, a conversão em *FAMES* na Rota 2 foi 13 % maior que na Rota 1, indicando mais uma vez que a extração de carboidratos rompe a parede celular, liberando maiores conteúdos dos metabólitos de interesse.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adenle, A. A., Haslam, G. E., & Lee, L. (2013). "Global assessment of research and development for algae biofuel production and its potential role for sustainable development in developing countries". *Energy Policy*, 61, 182–195. doi:10.1016/j.enpol.2013.05.088
- Agência Nacional Do Petróleo, Gás Natural E Biocombustíveis/ANP. Resolução ANP Nº 30, DE 23.06.2016 - DOU 24.06.2016. Disponível em: <www.anp.gov.br/wwwanp/?dw=81898>. Acesso em: 10 set. 2017
- Alonzo, F., & Mayzaud, P. (1999). "Spectrofluorometric quantification of neutral and polar lipids in zooplankton using Nile red". *Marine Chemistry*, 67(3-4), 289–301. doi:10.1016/s0304-4203(99)00075-4.
- Álvarez-Díaz, P. D., Ruiz, J., Arbib, Z., Barragán, J., Garrido-Pérez, M. C., & Perales, J. A. (2017). "Freshwater microalgae selection for simultaneous wastewater nutrient removal and lipid production". *Algal Research*, 24, 477–485. doi:10.1016/j.algal.2017.02.006
- Álvarez-Díaz, P. D., Ruiz, J., Arbib, Z., Barragán, J., Garrido-Pérez, M. C., & Perales, J. A. (2015). "Wastewater treatment and biodiesel production by *Scenedesmus obliquus* in a two-stage cultivation process". *Bioresource Technology*, 181, 90–96. doi:10.1016/j.biortech.2015.01.018
- Ashokkumar, V., Salam, Z., Tiwari, O. N., Chinnasamy, S., Mohammed, S., & Ani, F. N. (2015). "An integrated approach for biodiesel and bioethanol production from *Scenedesmus bijugatus* cultivated in a vertical tubular photobioreactor." *Energy Conversion and Management*, 101, 778–786. doi:10.1016/j.enconman.2015.06.006
- Azmah, S. A., Abdulla, R., Mohd Azhar, S. H., Marbawi, H., Gansau, J. A., & Ravindra, P. (2016). "A review on third generation bioethanol feedstock". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 65, 756–769. doi:10.1016/j.rser.2016.07.064
- Bahadar, A., & Bilal Khan, M. (2013). "Progress in energy from microalgae: A review".

- Baicha, Z., Salar-García, M. J., Ortiz-Martínez, V. M., Hernández-Fernández, F. J., De Los Ríos, A. P., Labjar, N., Lotfi, E., Elmahi, M. (2016). "A critical review on microalgae as an alternative source for bioenergy production: a promising low cost substrate for microbial fuel cells". *Fuel Processing Technology*, 154, 104–116. doi:10.1016/j.fuproc.2016.08.017
- Becker, E. W. 2007. "Micro-algae as a source of protein". *Biotechnology Advances* 25 (2): 207–10. doi:10.1016/j.biotechadv.2006.11.002.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). "A rapid method of total lipid extraction and purification". *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(1), 911–917. doi:10.1139/y59-099
- Borowitzka, M. A.; Moheimani, N. R. "Standard methods for measuring growth of algae and their composition". *Algae for Biofuels and Energy*, c.11, p.187-205, 2013.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). "Biofuels from microalgae - a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557–577. doi:10.1016/j.rser.2009.10.009
- Breuer, G., Packo P. L., Dirk, E. M., René B. D., E René H. W. (2012). "The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains". *Bioresource Technology* 124. Elsevier Ltd: 217–26. doi:10.1016/j.biortech.2012.08.003.
- Chen, C. Y, Zhao X. Q., Yen, H. W., Ho, S. H., Cheng, C. L., Lee, D. J., Bai, F. W. E Chang, J. S. (2013). "Microalgae-based carbohydrates for biofuel production". *Biochemical Engineering Journal* 78. Elsevier B.V.: 1–10.

doi:10.1016/j.bej.2013.03.006.

Chen, Jiaxin, Ji Li, Wenyi Dong, Xiaolei Zhang, Rajeshwar D. Tyagi, Patrick Drogui, e Rao Y. Surampalli. (2018). "The potential of microalgae in biodiesel production". *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 90 (March): 336–46. doi:10.1016/j.rser.2018.03.073.

Cheng, Y. S., J. M. Labavitch, e J. S. Vandergheynst. (2015). "Elevated CO₂ concentration impacts cell wall polysaccharide composition of green microalgae of the genus *Chlorella*". *Letters in Applied Microbiology* 60 (1): 1–7. doi:10.1111/lam.12320.

Chew, Kit Wayne, Shir Reen Chia, Pau Loke Show, Yee Jiun Yap, Tau Chuan Ling, e Jo Shu Chang. (2018). "Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: a review". *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 0. Elsevier B.V.: 1–13. doi:10.1016/j.jtice.2018.05.039.

Chew, K. W., Yap, J. Y., Show, P. L., Suan, N. H., Juan, J. C., Ling, T. C., Chang, J.-S. (2017). "Microalgae biorefinery: high value products perspectives." *Bioresource Technology*, 229, 53–62. doi:10.1016/j.biortech.2017.01.006

Chng, L. M., Chan, D. J. C., & Lee, K. T. (2016). "Sustainable production of bioethanol using lipid-extracted biomass from *Scenedesmus dimorphus*". *Journal of Cleaner Production*, 130, 68–73. doi:10.1016/j.jclepro.2016.02.016

De la Hoz Siegler, H., W. Ayidzoe, A. Ben-Zvi, R. E. Burrell, e W. C. McCaffrey. (2012). "Improving the reliability of fluorescence-based neutral lipid content measurements in microalgal cultures". *Algal Research* 1 (2). Elsevier B.V.: 176–84. doi:10.1016/j.algal.2012.07.004.

Diniz, Raphael H.S., Marina Q.R.B. Rodrigues, Luciano G. Fietto, Flávia M.L. Passos, e Wendel B. Silveira. (2014). "Optimizing and validating the production of ethanol from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3". *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 3 (2). Elsevier: 111–17.

doi:10.1016/j.bcab.2013.09.002.

Dutta, K., Daverey, A., & Lin, J.-G. (2014). "Evolution retrospective for alternative fuels: first to fourth generation". *Renewable Energy*, 69, 114–122. doi:10.1016/j.renene.2014.02.044

Echim, C., Maes, J., & Greyt, W. D. (2012). "Improvement of cold filter plugging point of biodiesel from alternative feedstocks". *Fuel*, 93, 642–648. doi:10.1016/j.fuel.2011.11.036

Faried, M., M. Samer, E. Abdelsalam, R. S. Yousef, Y. A. Attia, e A. S. Ali. (2017). "Biodiesel production from microalgae: processes, technologies and recent advancements". *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 79 (July 2016). Elsevier Ltd: 893–913. doi:10.1016/j.rser.2017.05.199.

Feng, Pingzhong, Kang Yang, Zhongbin Xu, Zhongming Wang, Lu Fan, Lei Qin, Shunni Zhu, et al. (2014). "Growth and lipid accumulation characteristics of *Scenedesmus obliquus* in semi-continuous cultivation outdoors for biodiesel feedstock production". *Bioresource Technology* 173. Elsevier Ltd: 406–14. doi:10.1016/j.biortech.2014.09.123.

Fernie, A. R., Roscher, A., Ratcliffe, R. G., & Kruger, N. J. (2001). "Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells". *Planta*, 212(2), 250–263. doi:10.1007/s004250000386

Foley, P. M., Beach, E. S., & Zimmerman, J. B. (2011). "Algae as a source of renewable chemicals: opportunities and challenges". *Green Chemistry*, 13(6), 1399. doi:10.1039/c1gc00015b

Gerken, H. G., Donohoe, B., & Knoshaug, E. P. (2012). "Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production". *Planta*, 237(1), 239–253. doi:10.1007/s00425-012-1765-0

Gouveia, L., A. C. Oliveira, R. Congestri, L. Bruno, A. T. Soares, R. S. Menezes, N. R.A.

- Filho, e I. Tzovenis. (2017). "Biodiesel from microalgae. Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products". Elsevier Ltd 235–258. doi:10.1016/B978-0-08-101023-5.00010-8.
- Grossmann, L., S. Ebert, J. Hinrichs, e J. Weiss. (2018). "Effect of precipitation, lyophilization, and organic solvent extraction on preparation of protein-rich powders from the microalgae *Chlorella protothecoides*". *Algal Research* 29 (May 2017). Elsevier: 266–76. doi:10.1016/j.algal.2017.11.019.
- Günerken, E, E D Hondt, M H M Eppink, L Garcia-gonzalez, K Elst, e R H Wijffels. 2015. "Cell disruption for microalgae biorefineries". *Biotechnology Advances* 33: 243–60. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.01.008.
- Halim, Ronald, Michael K. Danquah, e Paul A. Webley. 2012. "Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review". *Biotechnology Advances* 30 (3). Elsevier Inc.: 709–32. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.01.001.
- Halim, Ronald, Brendan Gladman, Michael K Danquah, e Paul A Webley. 2011. "Oil extraction from microalgae for biodiesel production". *Bioresource Technology* 102 (1). Elsevier Ltd: 178–85. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.136.
- Hannon, M., Gimpel, J., Tran, M., Rasala, B., & Mayfield, S. (2010). "Biofuels from algae: challenges and potential". *Biofuels*, 1(5), 763–784. doi:10.4155/bfs.10.44
- Harun, Razif, K Danquah, e Gareth M Forde. (2010). "Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production". *Journal Of Chemical Technology & Biotechnology*, September 2009: 199–203. doi:10.1002/jctb.2287.
- Harun, R., Jason, W. S. Y., Cherrington, T., & Danquah, M. K. (2011). "Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production". *Applied Energy*, 88(10), 3464–3467. doi:10.1016/j.apenergy.2010.10.048
- Hernández, D, B Riaño, M Coca, e M C García-gonzález. (2015). "Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical , chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production" *Chemical Engineering*

Journal v. 262: 939–945. doi:10.1016/j.cej.2014.10.049.

Ho, Shih-hsin, Shu-wen Huang, Chun-yen Chen, Tomohisa Hasunuma, e Akihiko Kondo. (2013a). “Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock”. **Bioresource Technology**. v. 135. Elsevier Ltd: 191–98. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.015.

Ho, Shih-hsin, Po-jen Li, Chen-chun Liu, e Jo-shu Chang. (2013b). “Bioprocess development on microalgae-based CO₂ fixation and bioethanol production using *Scenedesmus obliquus* CNW-N”. **Bioresource Technology**. v. 145, p.142-149. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.biortech.2013.02.119.

Ho, Shih Hsin, Chun Yen Chen, e Jo Shu Chang. (2012). “Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N”. **Bioresource Technology** v. 113. Elsevier Ltd: 244–52. doi:10.1016/j.biortech.2011.11.133.

Hu, Qiang, Milton Sommerfeld, Eric Jarvis, Maria Ghirardi, Matthew Posewitz, Michael Seibert, e Al Darzins. (2008). “Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances”. **Plant Journal** 54 (4): 621–39. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x.

Ichihara, K.. Fukubayashi, Y - "Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography". **Journal of Lipid Research**, 51:3, 635–640, 2010. doi:10.1194/jlr.d001065

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. 5B: 1986: cheese and processed cheese products: determination of fat content (gravimetric method) (reference method). Brussels,1986 7p.

Jeevan Kumar, S. P., Garlapati Vijay Kumar, Archana Dash, Peter Scholz, e Rintu Banerjee. (2017). “Sustainable green solvents and techniques for lipid extraction from microalgae: a review”. **Algal Research** 21. Elsevier B.V.: 138–47. doi:10.1016/j.algal.2016.11.014.

- Krzemińska, Izabela, Agata Piasecka, Artur Nosalewicz, Diana Simionato, e Jacek Wawrzykowski. (2015). "Alterations of the lipid content and fatty acid profile of *Chlorella protothecoides* under different light intensities". *Bioresource Technology* 196: 72–77. doi:10.1016/j.biortech.2015.07.043.
- Lam, M. K., & Lee, K. T. (2012). "Microalgae biofuels: a critical review of issues, problems and the way forward." *Biotechnology Advances*, 30(3), 673–690. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.11.008
- Laurens, L. M. L., Dempster, T. A., Jones, H. D. T., Wolfrum, E. J., Van Wyche, S., McAllister, J. S. P., Rencemberger, M., Parchert, K. J., Gloe, L. M. (2012). "Algal biomass constituent analysis: method uncertainties and investigation of the underlying measuring chemistries". *Analytical Chemistry*, 84(4), 1879–1887. doi:10.1021/ac202668c
- Laurens, L. M. L., Nagle, N., Davis, R., Sweeney, N., Van Wyche, S., Lowell, A., & Pienkos, P. T. (2015). "Acid-catalyzed algal biomass pretreatment for integrated lipid and carbohydrate-based biofuels production". *Green Chemistry*, 17(2), 1145–1158. doi:10.1039/c4gc01612b
- Laurens, L. M. L., Van Wyche, S., McAllister, J. P., Arrowsmith, S., Dempster, T. A., McGowan, J., & Pienkos, P. T. (2014). "Strain, biochemistry, and cultivation-dependent measurement variability of algal biomass composition." *Analytical Biochemistry*, 452, 86–95. doi:10.1016/j.ab.2014.02.009
- Lee, Ok Kyung, A. Leum Kim, Dong Ho Seong, Choul Gyun Lee, Yeon Tae Jung, Jin Won Lee, e Eun Yeol Lee. (2013). "Chemo-enzymatic saccharification and bioethanol fermentation of lipid-extracted residual biomass of the microalga, *Dunaliella tertiolecta*". *Bioresource Technology*. v. 132: 197–201. doi:10.1016/j.biortech.2013.01.007.
- Lee, Ok Kyung, You Kwan Oh, e Eun Yeol Lee. (2015). "Bioethanol production from carbohydrate-enriched residual biomass obtained after lipid extraction of *Chlorella* sp. KR-1". *Bioresource Technology* v.196. Elsevier Ltd: 22–27. doi:10.1016/j.biortech.2015.07.040.

- Li, Yan, Forough Ghasemi Naghdi, Sourabh Garg, Tania Catalina Adarme-vega, Kristofer J Thurecht, Wael Abdul Ghafor, Simon Tannock, e Peer M Schenk. (2014). "A comparative study : the impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research" *Microbial Cell Factories*, 1–9. doi:10.1186/1475-2859-13-14.
- López, Elvira Navarro, Alfonso Robles Medina, Pedro Antonio, González Moreno, e Luis Esteban Cerdán. (2016). "Extraction of microalgal lipids and the influence of polar lipids on biodiesel production by lipase-catalyzed transesterification". *Bioresource Technology* . v. 216: 904–913. doi:10.1016/j.biortech.2016.06.035.
- Martín-Juárez, J., G. Markou, K. Muylaert, A. Lorenzo-Hernando, e S. Bolado. (2017). "Breakthroughs in bioalcohol production from microalgae: solving the hurdles". *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products*, 183–207. doi:10.1016/B978-0-08-101023-5.00008-X.
- Masuko, Tatsuya, Akio Minami, Norimasa Iwasaki, Tokifumi Majima, Shin Ichiro Nishimura, e Yuan C. Lee. (2005). "Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format". *Analytical Biochemistry* v. 339 (1): 69–72. doi:10.1016/j.ab.2004.12.001.
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217–232. doi:10.1016/j.rser.2009.07.020.
- Medina, A. R., Grima, E. M., Giménez, A. G., González, M. J. I. "Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids". *Biotechnology Advances*, [s.l.], v. 16, n. 3, p.517-580, maio (1998). Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750\(97\)00083-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750(97)00083-9).
- Menetrez, M. Y. (2012). "An overview of algae biofuel production and potential environmental impact." *Environmental Science & Technology*, 46(13), 7073–7085. doi:10.1021/es300917r
- Milano, J., Ong, H. C., Masjuki, H. H., Chong, W. T., Lam, M. K., Loh, P. K., & Vellayan,

- V. (2016). "Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58, 180–197. doi:10.1016/j.rser.2015.12.150
- Miranda, J R, P C Passarinho, e L Gouveia. (2012). "Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production". *Bioresource Technology*. v.104. Elsevier Ltd: 342–48. doi:10.1016/j.biortech.2011.10.059.
- Mohd Azhar, Siti Hajar, Rahmath Abdulla, Siti Azmah Jambo, Hartinie Marbawi, Jualang Azlan Gansau, Ainol Azifa Mohd Faik, e Kenneth Francis Rodrigues. (2017). "Yeasts in sustainable bioethanol production: a review". *Biochemistry and Biophysics Reports* 10 (March): 52–61. doi:10.1016/j.bbrep.2017.03.003.
- Molina Grima, E.; González, M. J. I.; Giménez, A. G. "Solvent extraction microalgae lipids". *Algae for Biofuels*, c.11, p.187-205, (2013).
- Mutanda, T., Ramesh, D., Karthikeyan, S., Kumari, S., Anandraj, A., & Bux, F. (2011). "Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production". *Bioresource Technology*, 102(1), 57–70. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.077
- Ördög, Vince, Wendy A. Stirk, Péter Bálint, Adeyemi O. Aremu, Ambrose Okem, Csaba Lovász, Zoltán Molnár, e Johannes van Staden. (2016). "Effect of temperature and nitrogen concentration on lipid productivity and fatty acid composition in three *Chlorella* strains". *Algal Research* 16. Elsevier B.V.: 141–49. doi:10.1016/j.algal.2016.03.001.
- Ortiz-Tena, Jose G., Broder Rühmann, Doris Schieder, e Volker Sieber. (2016). "Revealing the diversity of algal monosaccharides: fast carbohydrate fingerprinting of microalgae using crude biomass and showcasing sugar distribution in *Chlorella vulgaris* by biomass fractionation". *Algal Research* 17. Elsevier B.V.: 227–35. doi:10.1016/j.algal.2016.05.008.
- Phwan, Chai Kee, Hwai Chyuan Ong, Wei Hsin Chen, Tau Chuan Ling, Eng Poh Ng, e Pau Loke Show. (2018). "Overview: comparison of pretreatment technologies and

- fermentation processes of bioethanol from microalgae". *Energy Conversion and Management* 173 (July). Elsevier: 81–94. doi:10.1016/j.enconman.2018.07.054.
- Ramos, M. J., Fernández, C. M., Casas, A., Rodríguez, L., & Pérez, Á. (2009). "Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties." *Bioresource Technology*, 100(1), 261–268. doi:10.1016/j.biortech.2008.06.039
- Ranjan, A., Patil, C., & Moholkar, V. S. (2010). "Mechanistic assessment of microalgal lipid extraction". *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49(6), 2979–2985. doi:10.1021/ie9016557
- Razack, Abdul, e Duraiarasan Surendhiran. (2016). "Algae – A quintessential and positive resource of bioethanol production : s comprehensive review". *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 66. Elsevier: 248–67. doi:10.1016/j.rser.2016.07.024.
- Rocha, Renan Paulo, Mariana Machado, Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz, Christina C. Vinson, Maurício Leite, Rafael Richard, Leonardo Brantes Bacellar Mendes, et al. (2017). "Exploring the metabolic and physiological diversity of native microalgal strains (*Chlorophyta*) isolated from tropical freshwater reservoirs". *Algal Research* 28 (October). Elsevier: 139–50. doi:10.1016/j.algal.2017.10.021.
- Sanchez Rizza, Lara, Maria Eugenia Sanz Smachetti, Mauro Do Nascimento, Graciela Lidia Salerno, e Leonardo Curatti. (2017). "Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the production of bioethanol". *Algal Research* 22. Elsevier B.V.: 140–47. doi:10.1016/j.algal.2016.12.021.
- Santos, S. B. dos, Martins, M. A., Caneschi, A. L., Aguilar, P. R. M., & Coimbra, J. S. dos R. (2015). "Kinetics and thermodynamics of oil extraction from jatropha curcas l. Using ethanol as a solvent". *International Journal of Chemical Engineering*, 2015, 1–9. doi:10.1155/2015/871236
- Shah, M., Poudel, J., Kwak, H., & Oh, S. C. (2015). "Kinetic analysis of transesterification of waste pig fat in supercritical alcohols". *Process Safety and Environmental Protection*, 98, 239–244. doi:10.1016/j.psep.2015.08.002

- Sharma, Kalpesh K., Holger Schuhmann, e Peer M. Schenk. (2012). “High lipid induction in microalgae for biodiesel production”. *Energies* 5 (5): 1532–53. doi:10.3390/en5051532.
- Sivaramakrishnan, R., e Incharoensakdi A. 2018. “Utilization of microalgae feedstock for concomitant production of bioethanol and biodiesel”. *Fuel* 217 (December 2017). Elsevier: 458–66. doi:10.1016/j.fuel.2017.12.119.
- Soares, J., Kriiger Loterio, R., Rosa, R. M., Santos, M. O., Nascimento, A. G., Santos, N. T., Rhys Williams, T. C., Nunes-Nesi, A., Arêdes Martins, M. (2017). "Scenedesmus sp. cultivation using commercial-grade ammonium sources". *Annals of Microbiology*, 68(1), 35–45. doi:10.1007/s13213-017-1315-x
- Souza, M. F. de, Pereira, D. S., Freitas, S. P., Bon, E. P. da S., & Rodrigues, M. A. (2017). "Neutral sugars determination in *Chlorella* : use of a one-step dilute sulfuric acid hydrolysis with reduced sample size followed by HPAEC analysis". *Algal Research*, 24, 130–137. doi:10.1016/j.algal.2017.03.019
- Suganya, T, M Varman, H H Masjuki, e S Renganathan. (2016a). “Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production : a biorefinery approach”. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 55. Elsevier: 909–41. doi:10.1016/j.rser.2015.11.026.
- Takeda, H. (1991). "Sugar composition of the cell wall and the taxonomy of *Chlorella* (*chlorophyceae*)". *Journal of Phycology*, 27(2), 224–232. doi:10.1111/j.0022-3646.1991.00224.x
- Templeton, David W., Matthew Quinn, Stefanie Van Wychen, Deborah Hyman, e Lieve M.L. Laurens. (2012). “Separation and quantification of microalgal carbohydrates”. *Journal of Chromatography A* 1270. Elsevier B.V.: 225–34. doi:10.1016/j.chroma.2012.10.034.
- Vigani, Mauro, Claudia Parisi, Emilio Rodríguez-Cerezo, Maria J. Barbosa, Lolke Sijsma, Matthias Ploeg, e Christien Enzing. (2015). “Food and feed products from

micro-algae: market opportunities and challenges for the EU”. *Trends in Food Science and Technology* 42 (1): 81–92. doi:10.1016/j.tifs.2014.12.004.

Wang, Hui, Chunli Ji, Shenglei Bi, Peng Zhou, Lin Chen, e Tianzhong Liu. 2014. “Joint production of biodiesel and bioethanol from filamentous oleaginous microalgae *Tribonema* sp.” *Bioresource Technology* 172. Elsevier Ltd: 169–73. doi:10.1016/j.biortech.2014.09.032.

Wycken, S Van, e L M L Laurens. 2013. “Determination of total carbohydrates in algal biomass”, Laboratory Analytical Procedure (lap). *National Renewable Energy Laboratory*. Disponível em: < <https://www.nrel.gov/docs/fy16osti/60957.pdf>>. Acesso em: 18 nov. 2018

Yao, L., Gerde, J. A., Lee, S.-L., Wang, T., & Harrata, K. A. (2015). “Microalgae Lipid Characterization”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(6), 1773–1787. doi:10.1021/

ANEXO I – Caracterização de monossacarídeos por Cromatografia Líquida de Alta Performance

Os monossacarídeos foram separados por cromatografia por interações hidrofílica e detecção por espalhamento de luz evaporativo em baixa temperatura. O sistema de cromatografia utilizado consistiu de uma bomba Shimadzu LC-20AT conectada em uma unidade degaseificadora Shimadzu DGU-20A5, um detector de espalhamento de luz evaporativo em baixa temperatura Shimadzu ELSD-LT II, um amostrador automático Shimadzu SIL-20A, um forno de coluna Shimadzu CTO-20A, e um controlador Shimadzu CBM-20A. A coluna cromatográfica utilizada foi uma Supelco Supelcosil LC-NH2 (250 × 4,6 mm) mantida a 35 °C. A fase móvel utilizada foi uma solução de 80/20 (v v⁻¹) de acetonitrila/água, e o fluxo utilizado foi de 1 mL min⁻¹. A aquisição e integração de dados foi realizada no programa Shimadzu LCsolution 1.25 SP1. Os padrões utilizados foram: D-ribose, D-xilose, L-arabinose, D-frutose, D-glicose e D-galactose. As curvas-padrão compreenderam concentrações entre 70 µg mL⁻¹ e 420 µg mL⁻¹. Utilizou-se o volume de 15 µL para as injeções de padrões e amostras. O detector de espalhamento de luz evaporativo em baixa temperatura foi mantido a 45 °C, e utilizou-se ar comprimido para a nebulização da fase móvel. Utilizou-se filtro de 0,22 µm para remoção de partículas do ar comprimido. Para melhor amplificação e resolução do sinal do detector definiu-se o ganho em 6, o que resultou em uma amplificação do sinal de 12 ×. O filtro digital de ruído do detector foi definido em 6.

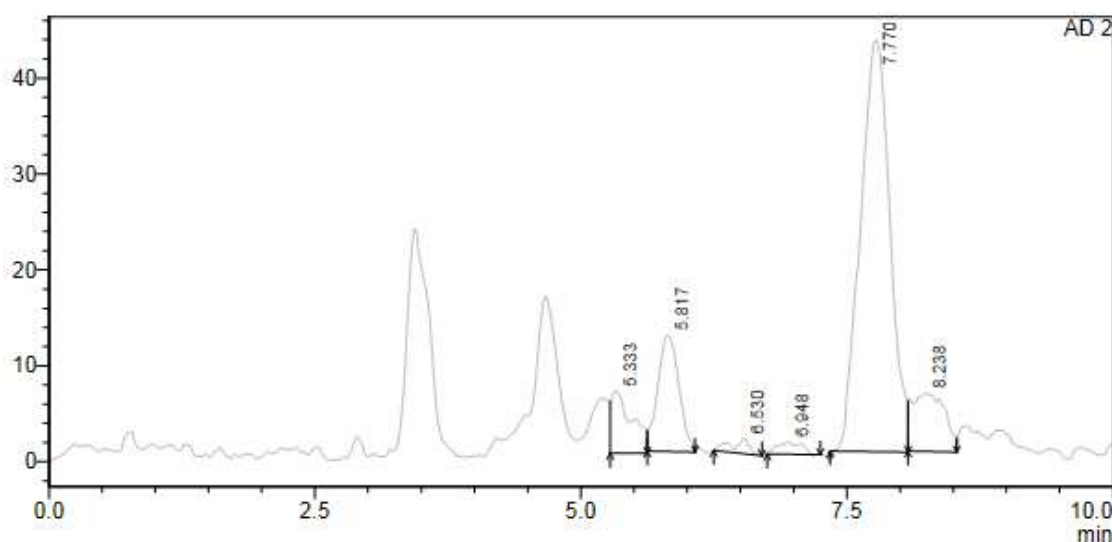


Figura 1 – Cromatograma para análise de monossacarídeos. Ribose (5,333 min); xilose (5,817 min); arabinose (6,530 min); frutose (6,948 min); glicose (7,770 min); galactose (8,238 min).

ANEXO II – Validação do método de caracterização de carboidratos neutros totais

Após a hidrólise ácida da biomassa microalgal, o teor total de carboidratos do hidrolisado pode ser determinado usando o método colorimétrico fenol - ácido sulfúrico (MASUKO et al., 2005). Neste método, os polissacarídeos são hidrolisados em monossacarídeos com ácido sulfúrico concentrado, que então desidrata os monossacarídeos (C5 e C6) para formar furfural e hidroximetilfurfural. Estes dois compostos formam um complexo aromático com fenol que produz uma mudança de cor, absorvida a 490 nm. Embora este procedimento seja rápido e relativamente simples, os produtos químicos envolvidos são perigosos. Além disso, a precisão de seus dados é altamente dependente do açúcar usado para a calibração. Nem todos os açúcares exibem uma resposta colorimétrica similar e alguns derivados de carboidratos (*e.g* glucosamina) não exibem qualquer resposta e, portanto, o conteúdo de carboidratos medido por essa técnica pode super ou subestimar o conteúdo real de carboidratos (LAURENS et al., 2014).

Alternativamente, o teor de açúcares do hidrolisado pode ser determinado com maior precisão por cromatografia líquida de alta performance (do inglês *high performance liquid chromatography* ou *HPLC*). Essa técnica analítica é mais cara e demorada, mas fornece dados sobre a composição dos açúcares monoméricos individuais do hidrolisado ácido. O método de hidrólise em duas etapas de Wychen e Laurens (2013) adaptado por Lee, Oh e Lee, 2015 foi empregado para a caracterização de *Chlorella* sp. O hidrolisado resultante foi analisado tanto por cromatografia quanto por espectrofotometria e os resultados estão na Tabela 1.

Tabela 1 – Quantificação de monossacarídeos de *Chlorella* sp. via dois métodos distintos.

Carboidratos % (m m _{MSLC} ⁻¹)	Método
11,59 ± 0,22 ^b	Cromatografia líquida de alta performance ¹
14,43 ± 1,06 ^a	Colorimétrico (fenol - ácido sulfúrico) ²

¹ Wychen e Laurens (2013); ² Masuko et al. (2005).

*Os teores de carboidratos foram comparados com um teste Tukey a um nível 5 % de significância. Letras diferentes indicam médias estatisticamente diferentes a 5 % de significância.

Os teores para ambos os métodos diferem entre si a um nível de 5 % de probabilidade. O método colorimétrico resultou em um teor maior de carboidratos, provavelmente devido aos teores elevados dos outros monossacarídeos (galactose: 2,2 %; ribose: 2,2 %; xilose: 2,1 %), uma vez que esta técnica abrange pentoses e hexoses.

Laurens et al. (2012) testaram ambos os métodos para quantificar monossacarídeos de biomassa microalgal e obtiveram 22 % e 17 % de carboidratos nos métodos fenol – ácido sulfúrico e por cromatografia, respectivamente.

O método de caracterização utilizando *HPLC* fornece resultados com maior precisão, embora seja mais trabalhoso e dispendioso. Portanto, mesmo que o método colorimétrico superestime o conteúdo de monossacarídeos de *Chlorella* sp, sua substituição pelo método de Wychen e Laurens (2013) é razoável para a determinação de carboidratos, especialmente quando se dispõe de uma grande quantidade de amostras e tempo limitado. Portanto, o método fenol - ácido sulfúrico foi escolhido, no presente trabalho, como o método para detecção de carboidratos neutros totais, exceto pela caracterização dos monossacarídeos individualmente (Seção 5.3).

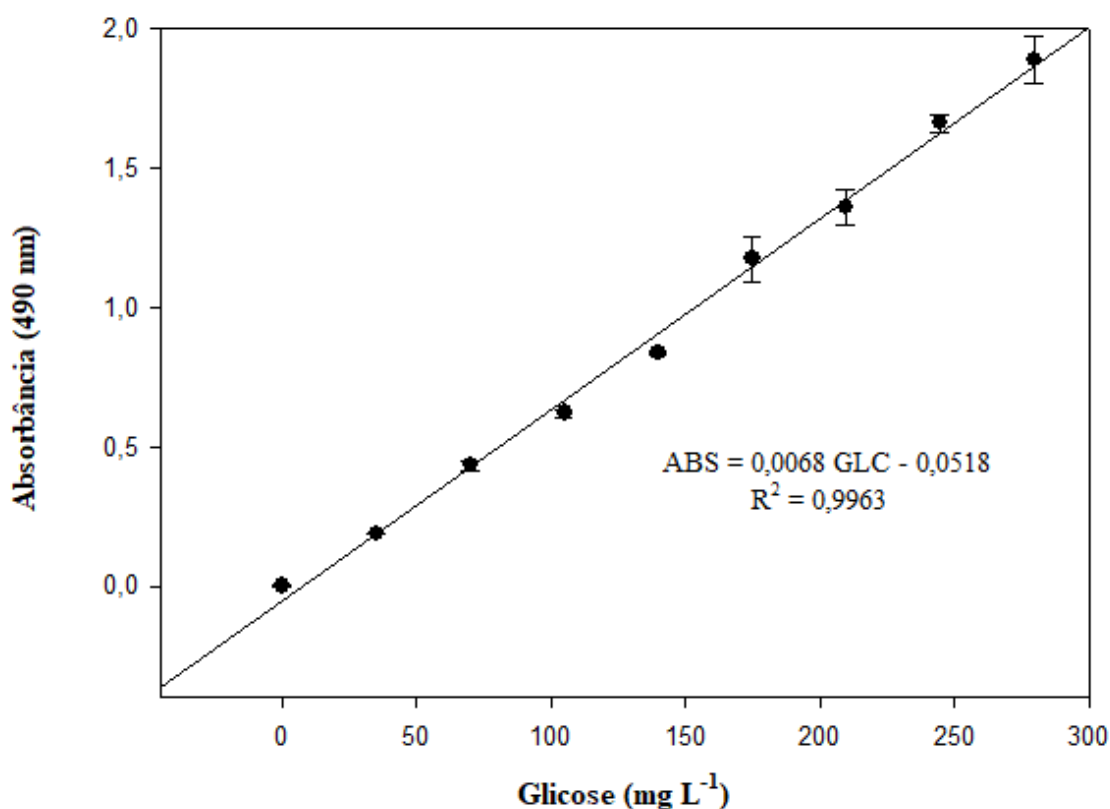


Figura 1 – Curva de calibração utilizando D-glicose como padrão analítico para o método colorimétrico.

ANEXO III – Cromatogramas

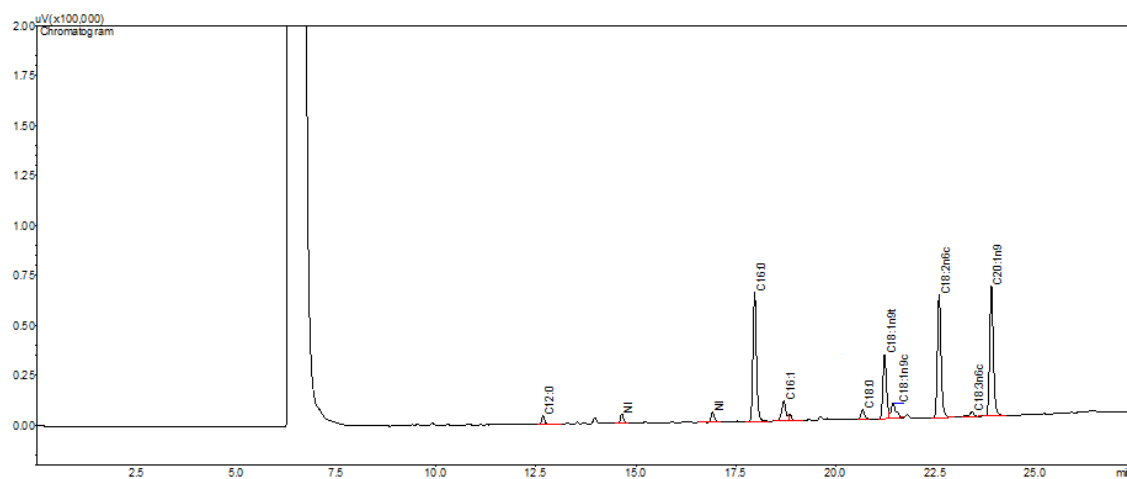


Figura 1: Cromatograma do perfil de ácidos graxos do óleo da microalga *Chlorella* sp., extraído pelo método de Schmid-Bondzynski-Ratzlaff.

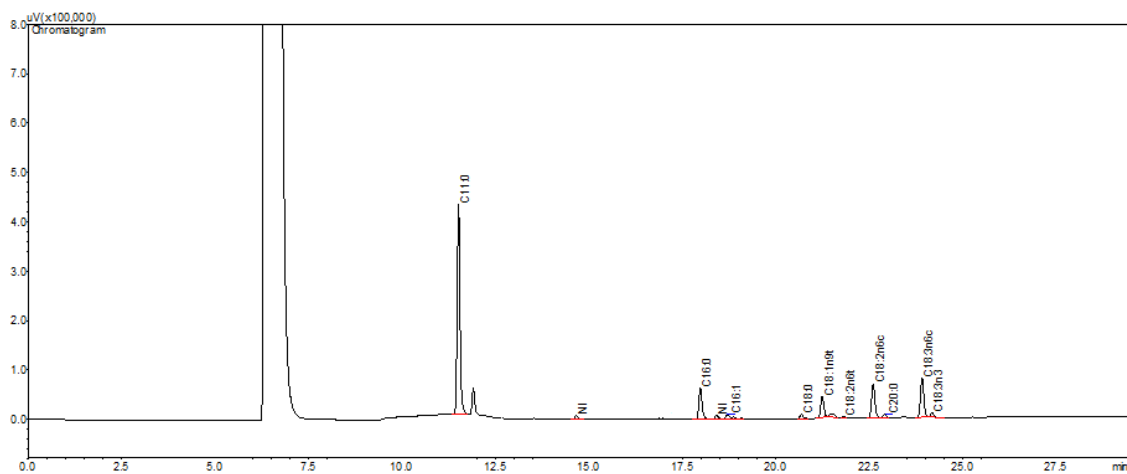


Figura 2: Cromatograma do perfil de ácidos graxos do óleo da microalga *Chlorella* sp., extraído pelo método de Bligh & Dyer.

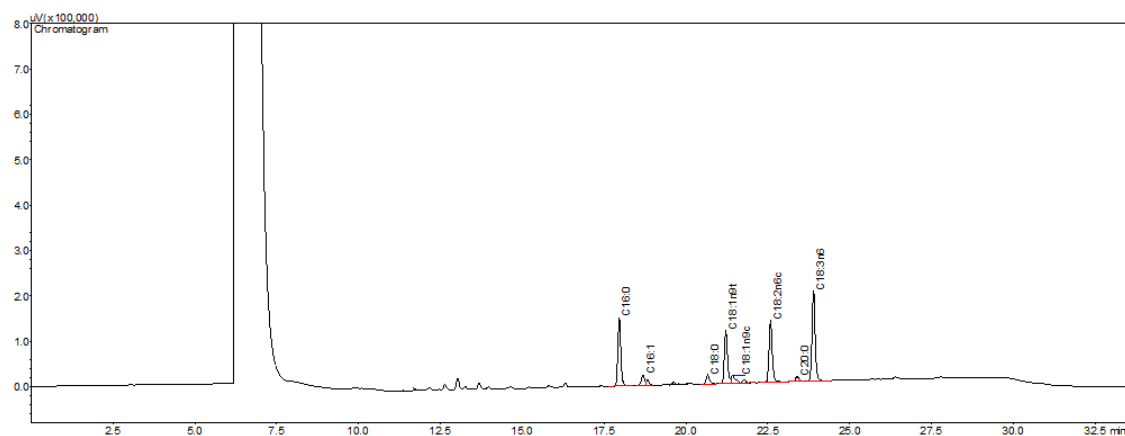


Figura 3: Cromatograma do perfil de ácidos graxos do óleo da microalga *Chlorella* sp., extraído pela Rota 1.

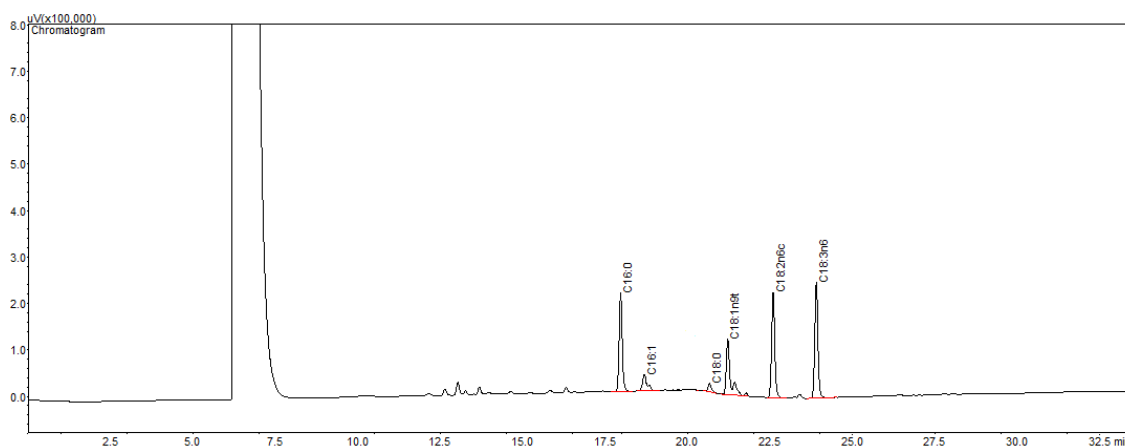


Figura 4: Cromatograma do perfil de ácidos graxos do óleo da microalga *Chlorella* sp., extraído pela Rota 2.

ANEXO IV – Composição de ácidos graxos de gordura animal.

Tabela 1 - Composição de ácidos graxos de gordura de frango, sebo bovino e gordura de porco.

Ácido graxo	¹ Gordura de frango	¹ Sebo bovino	² Gordura de porco
C14:0	0,6	3	1,30
C16:0	23,8	23,8	20,7
C16:1	7,2	5,5	2,0
C18:0	5,6	22,3	10,9
C18:1	43,6	37,9	39,1
C18:2	16,8	2,3	19,6
C18:3	0,8	0,3	1,2
C20:0	0,1	0,5	0,9
C20:1	0,3	0,1	1,0
AGS	30,1	49,6	33,8
MUFAs	51,1	43,5	42,1
PUFAs	17,6	2,6	20,8
Relação saturado/insaturado	0,44	1,1	0,53

Fonte: ¹Echim, Maes e Greyt (2012); ²Shah et al. (2015).