



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

GABRYELLE FURTADO DE ALMEIDA

**DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS PRODUZIDOS POR
MICROALGAS E CIANOBACTÉRIAS DA REGIÃO AMAZÔNICA, MACAPÁ-AP**

Macapá
2017

GABRYELLE FURTADO DE ALMEIDA

**DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS PRODUZIDOS POR
MICROALGAS E CIANOACTÉRIAS DA REGIÃO AMAZÔNICA, MACAPÁ-AP**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, na área de concentração Biologia Farmacêutica.

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Maria Mathes Faustino.

Co-orientador: Prof. Dr. Irlon Maciel Ferreira.

Macapá
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

615.1

A447d Almeida, Gabryelle Furtado de.

Determinação do perfil de ácidos graxos produzidos por microalgas e cianobactérias da região Amazônica, Macapá-AP / Gabryelle Furtado de Almeida; orientadora, Silvia Maria Mathes Faustino; co-orientador, Irlon Maciel Ferreira – Macapá, 2017.

114 f.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Farmácia – Ácidos Graxos. 2. Catálise enzimática. 3. Fração lipídica. 4. Microalgas. I. Faustino, Silvia Maria Mathes, orientadora. II. Ferreira, Irlon Maciel, co-orientador. III. Fundação Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

GABRYELLE FURTADO DE ALMEIDA

**DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS PRODUZIDOS POR
MICROALGAS E CIANOBACTÉRIAS DA REGIÃO AMAZÔNICA, MACAPÁ-AP**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, na área de concentração Biologia Farmacêutica.

Data de Aprovação: 20/02/2017.

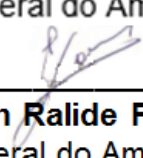


Prof. Dra. Silvia Maria Mathes Faustino
Universidade Federal do Amapá (Orientadora)

Prof. Dr. Irlon Maciel Ferreira
Universidade Federal do Amapá (Co-orientador)



Prof. Dr. Roberto Messias Bezerra
Universidade Federal do Amapá (Avaliador 1)



Prof. Dr. Madson Ralide Fonseca Gomes
Universidade Federal do Amapá (Avaliador 2)

Prof. Dr. Rodrigo Alves Soares Cruz
Universidade Federal do Amapá (Suplente 1)

Prof. Dra. Lorane Izabel da Silva Hage Melim
Universidade Federal do Amapá (Suplente 2)

*Dedico a minha família em especial
ao meu amado filho Henrique e amigos.*



AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha Orientadora, Profa. Dra. Silvia Maria Mathes Faustino, pela paciência de sempre e por acreditar no meu potencial quanto aluna de mestrado. Vale lembrar, que o seu amor pela pesquisa sobre as algas transbordou... E hoje me sinto orgulhosa por aprender tanto e querer continuar neste caminho dos mais belos tons encantadores de verde natural. E, além disso, por ter se tornado mais que uma orientadora... uma amiga!! E por vezes até uma mãe na qual admiro muito e irei guardar eternamente em meu coração.

Ao meu Co-orientador, Prof. Dr. Irlon Maciel, por todo o incentivo e apoio durante esta jornada. Por horas, insistente até demais, porém sabia que toda aquela exigência era apenas porque queria o melhor de mim no meu trabalho. Obrigada, a lição foi aprendida e compreendida com sucesso.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) por proporcionar a realização desta pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos durante todo o período de realização desta dissertação.

Ao apoio institucional da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), através do Laboratório de Cultivo de Algas e Bioprospecção (LACAL), Laboratório de Pesquisa em Fármacos (LPFar), Laboratório de Absorção Atômica e Bioprospecção (LAAB) e ao Grupo de Biocatálise e Biotransformação em Química Orgânica (BIORG) que disponibilizaram a infraestrutura, material e equipamentos indispensáveis para a execução da pesquisa.

A Policia Técnico Científica do Estado do Amapá (POLITEC-AP) por ceder através do MSc. Ciro Penido a utilização do equipamento Espectrômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier (Espectrômetro IV-TF) que foi essencial para compor os dados do trabalho.

Aos membros da banca examinadora da minha dissertação, Prof. Dr. Roberto Messias Bezerra e Prof. Dr. Madson Ralide Fonseca Gomes, pelo incentivo, pelas críticas e sugestões que contribuíram de forma ímpar para a finalização do trabalho. Sem esquecer também dos suplentes, Prof. Dr. Rodrigo Alves Soares Cruz e Profa. Dra. Lorane Izabel da Silva Hage Melim, que também me ajudaram no decorrer de toda esta caminhada com seus conselhos e críticas construtivas.

Agradeço a minha família por todo o apoio a mim oferecido durante esses últimos vinte e quatro meses do mestrado, onde por horas apesar da minha ausência sempre esteve ao meu lado. Em especial, a minha mãe e irmã, respectivamente, Nilcéa Furtado e Amanda Almeida, por toda a dedicação, carinho e ajuda em todos os sentidos, ressaltando os estudos de modo imparcial na minha vida. E também, ao meu filho Henrique de Almeida que possui apenas cinco anos de idade, mas compreende que sua mãe estuda para lhe proporcionar um futuro brilhante e repleto de realizações.

Aos meus amigos que souberam entender a minha falta durante várias ocasiões. Contudo, os laços de afeto permaneceram e a amizade consolidou-se ao longo dos anos. Como dizem: “O que é verdadeiro permanece”. E os planos só aumentam juntamente com a vontade de ver cada um crescendo profissionalmente e num futuro próximo poder vislumbrar suas vitórias.

Entretanto, tenho que agradecer um amigo em especial, o Ryan Ramos por toda a sua disponibilidade, dedicação e atenção para esclarecer pontos específicos que fizeram a diferença para mim durante a reta final da minha pesquisa.

E por fim, agradeço a *Deus*, Pai Celestial que vêm derramando suas bênçãos em mim e foi me tranquilizando ao longo da minha pesquisa ao me dar discernimento e compreensão do conhecimento para sempre seguir em frente e em busca das afirmações, sejam estas positivas ou negativas.

Obrigada a todos que confiaram em mim e no meu potencial para executar cada tarefa. Muito obrigada!!

*“Nobody said it was easy
No one ever said it would be this hard
Oh, take me back to the start [...]”.
The Scientist – Coldplay.*

RESUMO

Os estudos utilizando as microalgas para os mais variados fins vêm crescendo significativamente nos últimos anos. Seu potencial biotecnológico e as vantagens de cultivo frente a outras matérias-primas vegetais foram os principais fatores que desencadearam essas pesquisas, destacando-se a alta produtividade de moléculas correspondentes a carboidratos, proteínas e lipídeos, destes em especial os ácidos graxos, componentes orgânicos usados na dieta humana, usualmente empregados na indústria farmacêutica e de alimentos. Assim, o presente trabalho teve o intuito de determinar o perfil dos ácidos graxos produzidos pelas microalgas e cianobactérias coletadas e identificadas em ambientes aquáticos da cidade de Macapá-AP. Para isso, foram coletadas, isoladas e identificadas quatorze espécies, dentre estas doze foram analisadas por Espectrometria de Infravermelho – Transformada de Fourier (IV-TF) e identificados os principais grupos funcionais presentes nas amostras. Diante disso, considerando a espécie *Scenedesmus ecornis* com alta produtividade de biomassa, a mesma foi escolhida para avaliar o melhor método de extração lipídica. O método por agitação magnética utilizando uma mistura dos solventes clorofórmio-hexano foi mais eficiente (40.6 ± 3.03) na extração de lipídeos brutos quando comparado a extração por Soxhlet (10.66 ± 1.02), seguido pelos solventes hexano e clorofórmio. Tanto por catálise ácida (ácido sulfúrico) quanto por catálise enzimática (Lipase de *Candida antarctica*) usando a hidrólise seguida de esterificação e transesterificação foi possível identificar os ésteres etílicos de ácidos graxos (ácido palmítico, linoleico, oleico e esteárico). Sendo o ácido palmítico o componente majoritário com o uso de ambos os catalisadores, mas com concentrações percentuais distintas. No entanto, o método de hidrólise por catálise enzimática foi mais viável para a extração lipídica de *Scenedesmus ecornis*, pois o catalisador pode ser reutilizado por até dois ciclos consecutivos, variando o rendimento de ésteres etílicos de ácidos graxos de 83% no primeiro uso para 78% na segunda utilização. Assim, sugere-se que a catálise enzimática via hidrólise-esterificação foi o método mais viável na extração de lipídeos da microalga *Scenedesmus ecornis*.

Palavras-chave: Ácidos Graxos. Catálise Enzimática. Fração Lipídica. Microalgas.

ABSTRACT

Studies using microalgae for a variety of purposes have been growing significantly in recent years. Its biotechnological potential and the advantages of cultivation compared to other raw material vegetables were the main factors that triggered these researches, highlighting the high productivity of molecules corresponding to carbohydrates, proteins and lipids, of these especially fatty acids, organic components used in the human diet, usually employed in the pharmaceutical and food industry. Thus, the present work aimed to determine the profile of the fatty acids produced by microalgae and cyanobacteria collected and identified in aquatic environments of the city of Macapa-AP. For this, fourteen species were collected, isolated and identified, among these twelve were analyzed by Infrared Spectrometry - Fourier Transformed and identified the main functional groups present in the samples. In front of that, considering the species *Scenedesmus ecornis* with high biomass productivity, it was chosen to evaluate the best method of lipid extraction. The method by magnetic stirring using a chloroform-hexane solvent mixture was more efficient (40.6 ± 3.03) in crude lipid extraction when compared to Soxhlet extraction (10.66 ± 1.02), followed by hexane and chloroform solvents. Both by acid catalysis (sulfuric acid) and by enzymatic catalysis (*Candida antarctica* lipase) using the hydrolysis followed by esterification and transesterification it was possible to identify ethyl esters of fatty acids (palmitic, linoleic, oleic and stearic acid). As palmitic acid is the major component with the use of both catalysts, but with different percentage concentrations. However, the enzymatic catalysis hydrolysis method was more feasible for the lipidic extraction of *Scenedesmus ecornis*, since the catalyst can be reused for up to two consecutive cycles, with the yield of ethyl fatty acid esters of 83% being changed in the first use to 78 % on second use. Thus, it is suggested that enzymatic catalysis via hydrolysis-esterification was the most viable method in the lipid extraction of the microalga *Scenedesmus ecornis*.

Key words: Fatty Acids. Catalysis Enzyme. Lipid Fraction. Microalgae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Principais grupos de macro e microalgas estudadas.....	20
Figura 2	Microalga como um sistema de produção de metabólitos	22
Figura 3	Classificação dos lipídeos	32
Figura 4	Exemplo dos lipídeos biologicamente mais relevantes	33
Figura 5	Localização dos fosfolipídeos na membrana celular	34
Figura 6	Principais ferramentas para a análise de lipídeos	36
Figura 7	Classificação dos ácidos graxos	37
Figura 8	Tipos de biocombustíveis que podem ser produzidos por microalgas e cianobactérias.....	46
Figura 9	Cultivo laboratorial de espécies de microalgas.....	53
Figura 10	Biomassa liofilizada em placas de petri.....	53
Figura 11	Método de extração por Soxhlet.....	54
Figura 12	Método de extração por agitação magnética.....	54
Figura 13	Método de extração por hidrólise via catálise enzimática	56
Figura 14	Reação de transesterificação (1º uso).....	56
Figura 15	Método de extração por hidrólise via catálise ácida	57
Figura 16	Reação de transesterificação (Reuso)	58
Figura 17	Células de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	60
Figura 18	Células de <i>Chlorella</i> spp.	60
Figura 19	Células de <i>Limnithrix planctonica</i>	59
Figura 20	Células de <i>Monoraphidium contortum</i>	60
Figura 21	Células de <i>Planktolyngbya limnetica</i>	63
Figura 22	Células de <i>Pseudanabaena mucicola</i>	63
Figura 23	Células de <i>Scenedesmus</i> spp.	64
Figura 24	Células de <i>Spirogyra communis</i>	65
Figura 25	Células de <i>Spirulina platensis</i>	66
Figura 26	Células de <i>Synechococcus</i> sp.....	67
Figura 27	Espectro de IV-TF da espécie <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	68
Figura 28	Espectro de IV-TF da espécie <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	69
Figura 29	Espectro de IV-TF da espécie <i>Chlorella vulgaris</i>	70
Figura 30	Espectro de IV-TF da espécie <i>Limnithrix planctonica</i>	71
Figura 31	Espectro de IV-TF da espécie <i>Monoraphidium contortum</i>	72

Figura 32	Espectro de IV-TF da espécie <i>Planktolyngbya limnetica</i>	73
Figura 33	Espectro de IV-TF da espécie <i>Pseudanabaena mucicola</i>	74
Figura 34	Espectro de IV-TF da espécie <i>Scenedesmus ecoris</i>	75
Figura 35	Espectro de IV-TF da espécie <i>Scenedesmus ovalternus</i>	75
Figura 36	Espectro de IV-TF da espécie <i>Spirogyra communis</i>	76
Figura 37	Espectro de IV-TF da espécie <i>Spirulina platensis</i>	77
Figura 38	Espectro de IV-TF da espécie <i>Synechococcus</i> sp.....	77
Figura 39	Comparação entre os métodos Soxhlet e agitação magnética na extração de lipídeos (%)	79
Figura 40	Cromatograma do perfil dos etil-ésteres correspondentes aos ácidos graxos extraídos da reação com CALB analisados por CG-EM	80
Figura 41	Espectros de massas dos etil-ésteres correspondentes aos ácidos graxos extraídos da reação com CALB analisados por CG-EM em comparação com os espectros da biblioteca do equipamento	81
Figura 42	Perfil de fragmentação do éster palmitato de etila.....	84
Figura 43	Cromatograma do perfil dos etil-ésteres correspondentes aos ácidos graxos extraídos da reação com H ₂ SO ₄ analisados por CG-EM	85
Figura 44	Cromatograma do perfil dos etil-ésteres correspondentes aos ácidos graxos extraídos pela reação com CALB e H ₂ SO ₄ analisados por CG-EM	86
Figura 45	Cromatograma do perfil dos etil-ésteres correspondentes aos ácidos graxos extraídos da reação com o reuso da CALB analisados por CG-EM.....	87
Figura 46	Espectros de massas dos etil-ésteres correspondentes aos compostos extraídos da reação com o reuso da CALB analisados por CG-EM	87
Figura 47	Produção de EEAG por diferentes métodos	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Substâncias encontradas em microalgas	23
Tabela 2	Espécies de microalgas e cianobactérias e suas atividades biológicas ...	24
Tabela 3	Principais métodos de extração de ácidos graxos: Vantagens e desvantagens.....	42
Tabela 4	Relação entre o biodiesel produzido de microalgas e cianobactérias com derivados de óleos vegetais.....	48
Tabela 5	Composição do meio BG-11	51
Tabela 6	*Solução de micronutrientes: BG-11	52
Tabela 7	Composição do Meio NPK (15:05:05)	52
Tabela 8	Determinação dos ésteres etílicos equivalentes aos ácidos graxos identificados por CG-EM extraídos por catálise enzimática (CALB) da biomassa de <i>Scenedesmus ecornis</i>	83
Tabela 9	Determinação dos ésteres etílicos equivalentes aos ácidos graxos identificados por CG-EM extraídos por catálise ácida (H ₂ SO ₄) da biomassa de <i>Scenedesmus ecornis</i>	86
Tabela 10	Determinação dos ésteres etílicos equivalentes aos ácidos graxos identificados por CG-EM extraídos por catálise enzimática no reuso do biocatalisador (CALB) da biomassa de <i>Scenedesmus ecornis</i>	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CALB	<i>Candida antarctica</i> lipase B
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
E.C.	“Enzyme Commission of the IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology)” - Classificação enzimática.
EEAG	Ésteres etílicos de ácidos graxos
EMAG	Ésteres metílicos de ácidos graxos
IV-TF	Infravermelho por Transformada de Fourier
g/L	Gramas/litro
mg	Miligrama
MJ/Kg	Megajoules/kilograma
mL	Mililitro
ng	Nanograma
NPK	Nitrogênio, fósforo e potássio
μL	Microlitro
μm	Micrometro
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS.....	19
2.1	OBJETIVO GERAL.....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3	REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1	MICROALGAS E CIANOBACTÉRIAS: DEFINIÇÕES E SEUS POTENCIAIS	20
3.1.1	Aplicações e substâncias produzidas por microalgas e cianobactérias	26
3.2	CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	28
3.3	LIPÍDEOS E SUAS DEFINIÇÕES	30
3.3.1	Tipos e funções de lipídeos.....	31
3.3.2	Ácidos graxos: Importância e obtenção	36
3.3.3	Ácidos graxos e sua relação com as microalgas.....	38
3.4	PRINCIPAIS MÉTODOS PARA A EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE MICROALGAS	39
3.4.1	Reação de transesterificação e seus catalisadores.....	42
3.5	NOVAS PERSPECTIVAS: USO DE BIOCATALISADORES.....	45
3.6	COMBUSTÍVEIS FOSSEIS x BIODIESEL	45
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.1	TIPO DE ESTUDO	49
4.2	COLETA, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO	49
4.3	SOLVENTES E REAGENTES.....	49
4.4	EQUIPAMENTOS.....	50
4.4.1	Espectrometria de Infravermelho – Transformada de Fourier (IV-TF)	50
4.4.2	Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)....	50
4.4.3	Outros equipamentos.....	51
4.5	MICRO-ORGANISMOS.....	51
4.6	MEIO DE CULTIVO E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	51
4.7	EXTRAÇÃO DA BIOMASSA SECA POR LIOFILIZAÇÃO	53
4.8	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS.....	54
4.8.1	Extração por Soxhlet.....	54
4.8.2	Extração por agitação magnética.....	55
4.8.3	Reação de Hidrólise	55

4.8.3.1 Via catálise enzimática (CALB)	55
4.8.3.2 Via Catálise Ácida (H ₂ SO ₄).....	57
4.9 REAÇÃO DE REUSO DO BIOCATALISADOR (CALB)	57
4.9.1 Reação de Transesterificação Via Catálise Enzimática (CALB) – REUSO	58
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
4.11 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.1 MORFOLOGIA DAS MICROALGAS E CIANOBACTÉRIAS	59
5.1.1 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	59
5.1.2 <i>Chlorella pyrenoidosa</i> H. Chick e <i>Chlorella vulgaris</i> Beyerinck (Beijerinck	60
5.1.3 <i>Limnithrix planctonica</i> (Woloszynska) Meffert.....	61
5.1.4 <i>Monoraphidium contortum</i> (Thuret) Komárková-Legnerová.....	62
5.1.5 <i>Planktolyngbya limnetica</i>	62
5.1.6 <i>Pseudanabaena mucicola</i> (Naumann & Huber-Pestalozzi) Schwabe	63
5.1.7 <i>Scenedesmus</i> Meyen	64
5.1.8 <i>Spirogyra communis</i> (Hassall) Kützing	65
5.1.9 <i>Spirulina platensis</i> (Gomont) Geitler	66
5.1.10 <i>Synechococcus</i> sp.....	66
5.2 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DE MICROALGAS E CIANOBACTÉRIAS POR ESPECTROMETRIA DE INFRAVERMELHO – TRANSFORMADA DE FOURIER (IV-TF)	67
5.2.1 IV-TF da espécie <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	68
5.2.2 IV-TF das espécies <i>Chlorella pyrenoidosa</i> e <i>Chlorella vulgaris</i>	69
5.2.3 IV-TF da espécie <i>Limnithrix planctonica</i>	71
5.2.4 IV-TF da espécie <i>Monoraphidium contortum</i>	71
5.2.5 IV-TF da espécie <i>Planktolyngbya limnetica</i>	72
5.2.6 IV-TF da espécie <i>Pseudanabaena mucicola</i>.....	73
5.2.7 IV-TF das espécies de <i>Scenedesmus ecornis</i> e <i>Scenedesmus ovalternus</i> ..	74
5.2.8 IV-TF da espécie <i>Spirogyra communis</i>	76
5.2.9 IV-TF da espécie <i>Spirulina platensis</i>.....	76
5.2.10 IV-TF da espécie <i>Synechococcus</i> sp.	77

5.3	COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO SOXHLET E AGITAÇÃO MAGNÉTICA.	78
5.4	IDENTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA COM ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM).....	79
5.5	ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	89
6	CONCLUSÃO	91
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	93
	REFERÊNCIAS.....	94

1 INTRODUÇÃO

As microalgas desempenham um papel indispensável na cadeia alimentar marinha, como fonte de alimento em vários estágios de crescimento de moluscos, crustáceos e algumas espécies de peixes.

Além disso, estudos sobre as cianobactérias e microalgas eucarióticas como fontes de compostos bioativos, tais como: carotenóides, pigmentos, polissacarídeos, polifenóis e lipídeos, vêm ganhando espaço no meio científico, pois as informações que discorrem sobre as substâncias presentes nestes micro-organismos, tanto relacionadas as suas funções e possíveis usos, podem ser aplicadas em produtos que agregam e/ou oferecem benefícios para a sociedade.

Entre esses benefícios estão os trabalhos envolvendo a biorremediação ambiental aliada ao conceito de biorrefinaria, pesquisas denotando as atividades antioxidantes, antimicrobianas e antidiabéticas de diversas espécies de microalgas, predominantemente as do gênero *Chlorella*. Além disso, nota-se também relatos sobre a intensa biodiversidade de microalgas no que concerne a região Amazônica, porém pouco estudadas quanto a sua viabilidade na produção de metabólitos.

As pesquisas evidenciando principalmente o uso de lipídeos produzidos por cianobactérias e microalgas eucarióticas para a obtenção de biodiesel tem ganhado destaque. Tendo em vista, a necessidade e a busca por alternativas renováveis de energia, tanto de forma ecologicamente correta quanto sustentável, em razão dos recursos advindos de combustíveis fósseis estarem cada vez mais escassos e onerosos.

Em comparação com outras matérias-primas como os óleos vegetais, de soja, mamona e girassol, as microalgas não necessitam de grandes quantidades de terras aráveis para o cultivo, possuem altas taxas de crescimento podendo assim sintetizar e acumular rapidamente quantidades elevadas de lipídeos, os quais variam com a espécie e, além disso, geralmente as microalgas não competem com a cadeia alimentar, por exemplo, a soja muito utilizada como alimento.

As microalgas são micro-organismos fotossintetizantes capazes de combinar a água e o dióxido de carbono (CO₂) juntamente à luz solar para produzir biomassa. Essa pode ser produzida também em escala laboratorial a partir do cultivo em condições (luminosidade, nutrientes e temperatura) que permitam a extração de

lipídeos, em especial, os ácidos graxos que poderão ser utilizados para a produção de biodiesel.

Outra importante característica dos ácidos graxos, é a sua viabilidade tanto para a indústria farmacêutica quanto a de alimentos. Com isso, destacam-se vários produtos que em sua composição apresentam ácidos graxos, tais como: emulsificantes, fertilizantes, borrachas, plastificantes e suprimentos alimentares.

Os ácidos graxos são importantes componentes da matéria orgânica das microalgas. Em geral são encontrados na forma de triglicerídeos, que por transesterificação produzem mono ésteres de ácidos graxos, produzidos principalmente por álcoois de cadeia curta (etanol ou metanol) catalisada por ácidos, bases ou enzimas. Os ácidos graxos tais como: o ácido palmítico, ácido oleico e os ácidos graxos considerados essenciais como: linoleico, linolênico e araquidônico já foram encontrados em algumas espécies de microalgas.

Vale ressaltar, os mecanismos necessários para a extração de ácidos graxos da biomassa microalgal no qual irão selecionar os compostos conforme grau de especificidade e seletividade do método em uso. Soxhlet, sonicação, fluido supercrítico, Bligh e Dyer e a extração enzimática são alguns dos vários métodos descritos e copiosamente adaptados para otimizar o processo.

A extração enzimática associada à reação de transesterificação é uma das técnicas que vêm ganhando espaço por utilizar as lipases (E.C. 3.1 enzimas que atuam sobre os lipídeos) consideradas catalisadores “verdes” já que diminui o impacto ao meio ambiente, pois permite que a reação e extração seja realizada de maneira sustentável ou em condições brandas. Além do mais, para intensificar a extração é imprescindível, a escolha adequada da lipase e considerar parâmetros que podem influenciar como: temperatura, tamanho da partícula e agitação.

Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo caracterizar o perfil de ácidos graxos produzidos pelas microalgas e cianobactérias coletadas e identificadas em ambientes aquáticos da cidade de Macapá-AP com a finalidade de estabelecer técnicas eficientes para a extração de ácidos graxos, investigar os compostos por Espectrometria de infravermelho – Transformada de Fourier (IV-TF), quantificá-los por Cromatografia Gasosa e Espectroscopia de Massas (CG-EM) e estabelecer quais espécies possuem potencial para a produção de biodiesel sendo importantes também para a indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar o perfil dos ácidos graxos produzidos pelas microalgas e cianobactérias coletadas e identificadas em ambientes aquáticos da cidade de Macapá-AP.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar, isolar, identificar e cultivar cepas de microalgas e cianobactérias através do meio de cultura BG-11 e do fertilizante químico NPK;
- Extrair os ácidos graxos presentes nas microalgas e cianobactérias;
- Identificar e quantificar por IV-TF e CG-EM o perfil químico dos ácidos graxos encontrados nas espécies cultivadas;
- Estabelecer qual (is) espécie (s) possuem potencial para a produção de biodiesel sendo importantes também para a indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos;
- Comparar a eficiência dos processos de obtenção dos ésteres etílicos via catálise enzimática (CALB) e catálise ácida (H_2SO_4).

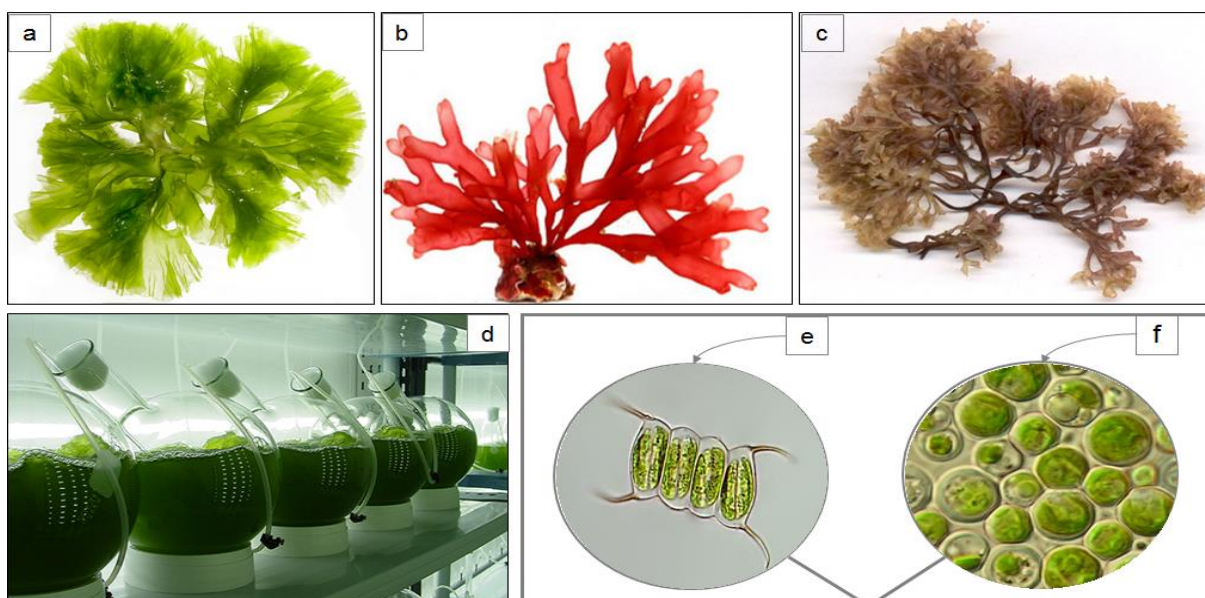
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 MICROALGAS E CIANOACTÉRIAS: DEFINIÇÕES E SEUS POTENCIAIS

Os ficologistas consideram qualquer organismo com clorofila *a* e um talo não diferenciado em raízes, caule e folhas como sendo uma alga (os primeiros organismos fotossintéticos de água doce e marinha da cadeia alimentar). As cianobactérias também estão incluídas nesta definição, embora sejam organismos procarióticos. (LEE, 2008; RICHMOND, 2004).

As algas são divididas em macroalgas e microalgas (Figura 1). Tipicamente as Chlorophytas (algas verdes), Rhodophytas (algas vermelhas) e as Phaeophytas (algas marrons) são macroalgas (PRATAMA et al., 2015), enquanto as microalgas (com tamanhos de 3 – 20 μm) representam tanto as procarióticas e eucarióticas, pluricelulares ou unicelulares, e apresentam ampla similaridade com as plantas superiores, como, por exemplo, a composição de seus carboidratos de reserva, proteínas e pigmentos fotossintéticos. Além disso, podem ser encontradas em diversos ambientes, desde solos férteis a desertos quentes e frios (WOJCIECHOWSKI et al., 2013).

Figura 1 – Principais grupos de macro e microalgas estudadas



Legenda: (a) Alga verde; (b) Alga vermelha; (c) Alga parda; (d) Microalgas; (e) *Scenedesmus* sp. e (f) *Chlorella* sp.

Fonte: VISÃO, 2013.

Estima-se que existem mais de 50.000 espécies de microalgas, no entanto um pouco menos de 30.000 mil já foram estudadas e caracterizadas (MENDES; VERMELHO, 2013). Estão presentes em sua grande maioria em ambientes marinhos, mas também colonizam ambientes dulcícolas e apresentam uma enorme capacidade de produzir biomassa por unidade de área e tempo, devido ao seu rápido metabolismo, possibilitando a duplicação da biomassa em condições ótimas em um tempo de apenas 24 horas, produzindo de forma simultânea energia renovável (AZEREDO, 2012; PENTEADO, 2014).

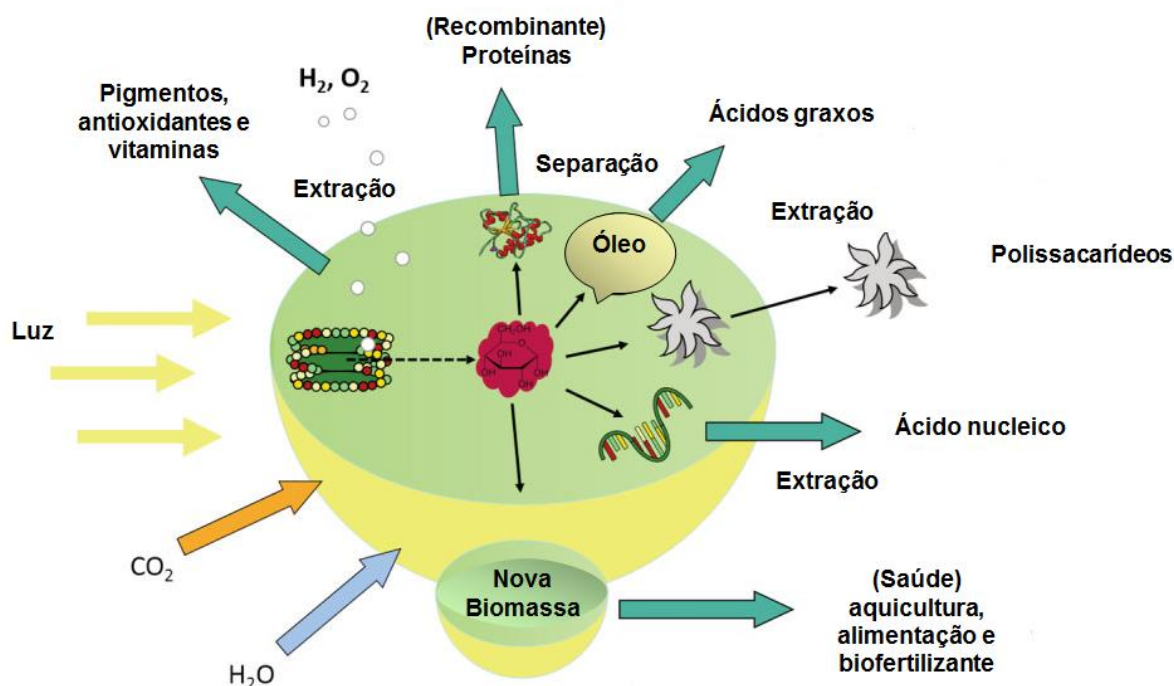
As cianobactérias são organismos hospedeiros promissores para a produção de pequenas moléculas que podem ser segregadas, como etanol, butanol, ácidos graxos e outros ácidos orgânicos. As microalgas eucarióticas são interessantes para produtos cuja armazenagem celular é importante, tais como proteínas, lipídeos, amido e hidrocarbonetos. Ambas estão sendo estudadas para o desenvolvimento de novas linhagens de produção geneticamente modificadas para aumentar a produtividade dos metabólitos de interesse (WIJFFELS; KRUSE; HELLINGWERF, 2013).

Segundo Richmond (2004), o interesse para estes dois grupos de organismos fototróficos reside no seu potencial, de forma semelhante aos micro-organismos heterotróficos, para produzir biomassa para alimentos, rações e insumos químicos. Sendo que o gênero *Chlorella* ocupa o primeiro lugar no uso comercial destes micro-organismos.

Devido ao seu conteúdo genético relativamente simples, as microalgas e cianobactérias são capazes de capturar a energia solar, fixar CO₂, crescer rapidamente e sintetizar metabólitos específicos. Assim, tornam-se excelentes candidatas para a produção de biocombustíveis (WANG et al., 2012).

As microalgas apresentam-se como uma fonte potencial de compostos bioativos para a utilização na indústria alimentícia como nutracêuticos e na indústria farmacêutica, pois assimilam os nutrientes existentes no meio e os incorpora a sua biomassa (Figura 2), gerando quantidades significativas de óleo. A escolha da espécie junto as condições de cultivo otimizadas favorece a produção de metabólitos que podem ser utilizados para os mais diversos fins (MORIOKA et al., 2014; RAMÍREZ-MÉRIDA et al., 2015).

Figura 2 – Microalga como um sistema de produção de metabólitos



Fonte: HARISKOS; POSTEN, 2014 (Adaptado).

Essa gama de produtos surge como uma evolução no conceito emergente de biotecnologia microalgal, pois tomando como base a aplicabilidade destes micro-organismos e as propriedades específicas de cada composto e, além disso, levando em consideração que pouco menos de 50% das espécies mantidas em coleções foram totalmente investigadas por seu conteúdo químico, pesquisas que explorem seus potenciais são imprescindíveis (HAMED, 2016).

Para uso na indústria farmacêutica, por exemplo, testes para detectar a atividade antibacteriana e antifúngica são fundamentais. Os ácidos graxos da cianobactéria *Synechocystis* sp., inibiram o crescimento das bactérias *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e do fungo *Candida albicans* (valores de Concentração Inibitória Mínima – CIM – de 2,5-1,25 mg mL⁻¹, respectivamente) e as ficobiliproteínas isoladas desta espécie, também apresentaram atividade antimicrobiana. As cianobactérias *Gleocapsa* sp. e *Synechocystis* sp., especialmente seus exopolissacarídeos (biopolímeros), demonstraram ser potencialmente promissores contra os patógenos alimentares examinados (NAJDENSKI et al., 2013).

Por apresentar várias substâncias e atividades biológicas, de forma geral, os estudos relacionando microalgas e cianobactérias intensificaram-se significativamente. Algumas destas substâncias e seus exemplos são descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Substâncias encontradas em microalgas

Tipos de Substâncias	Exemplos
Pigmentos	β -caroteno, astaxantina, luteína, zeaxantina, cantaxantina, clorofila, ficocianina, ficoeritrina, fucoxantina.
Ácidos graxos poli-insaturados	Ácido docosahexaenóico (DHA), ácido eicosapentaenóico (EPA), ácido araquidônico (ARA).
Vitaminas	A, B1, B6, B12, C, E, biotina, riboflavina, ácido nicotínico, pantotenato, ácido fólico.
Antioxidantes	Polifenóis, superóxido dismutase, tocoferóis.
Outros	Antimicrobianos, antifúngicos, agentes antivirais, toxinas, aminoácidos, proteínas, esteróis, aminoácidos tipo micoporinas para proteção contra a luz.

Fonte: PRIYADARSHANI; RATH, 2012 (Adaptado).

As algas têm várias aplicações industriais, entre estas destaca-se a biorremediação ambiental e de águas residuais como alternativas biotecnológicas para reduzir e/ou remover a poluição por metais pesados, considerando vários fatores favoráveis como: cultivo de baixo custo, alta absorção de íons metálicos, seletividade de metais e propriedades mecânicas adequadas para a produção em larga escala (ZERAATKAR et al., 2016).

A espécie *Botryococcus braunii* foi associada à melhor remoção de nitrogênio e fósforo (79,63% e 100%, respectivamente), acúmulo de lipídeos (36,14%) e predominância de ácidos graxos, como ácido palmítico e linoleico, em comparação com outras 20 espécies de microalgas testadas para o crescimento em efluentes secundários provenientes de águas residuais domésticas tratadas. Isso denotou seu uso potencial no desenvolvimento de um processo em grande escala de tratamento terciário de águas residuais associado a produção de biocombustíveis (SYDNEY et al., 2011).

O crescente interesse no acoplamento de processos biológicos nos tratamentos de águas residuais com a geração de produtos de valor agregado (como óleo contendo ácidos graxos) tem estimulado esforços na adaptação de métodos de extração para subprodutos de tratamento. A microalga *Rhizoclonium hieroglyphicum* foi utilizada nos estudos de Mulbry et al. (2009) como uma alternativa para a remoção de nutrientes de efluentes dos estrumes de laticínios, através da otimização de métodos, tais como: a extração em alta temperatura e pressão e a extração pelo método de Folch – modificado.

Em diversos trabalhos é possível destacar as espécies de microalgas sendo amplamente utilizadas para os mais diversos fins. Com isso, na Tabela 2, destacam-se alguns estudos realizados com estas e suas principais atividades biológicas até então relatadas.

Tabela 2 – Espécies de microalgas e cianobactérias e suas atividades biológicas

Espécies de Microalgas e Cianobactérias	Compostos e/ou atividades biológicas	Referências
<i>Chlamydomonas</i> sp.	Antioxidante	Parulekar (2016)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Polissacarídeos / antioxidante	Chen et al. (2016)
<i>Limnothrix</i> sp.	C-ficocianina / antioxidante	Gantar et al. (2012)
<i>Microcystis</i> sp.	Aeruginazole A / antimicrobiana	Raveh; Carmeli (2010)
<i>Monoraphidium</i> sp.	Astaxantina / anti-inflamatória e antioxidante	Fujii (2015)
<i>Scenedesmus</i> sp.	Antibacteriana	Ishaq et al. (2016)
	Antidiabética	Gago (2016)
<i>Spirogyra</i> sp.	Ácidos graxos insaturados e compostos fenólicos / antimicrobiana	Naik; Hemavani; Thippeswamy (2012)
<i>Spirulina Platensis</i>	Ficocianina e ficocianobilina / proteção contra a nefropatia diabética	Zheng et al. (2013)

Quando comparada a extração lipídica das microalgas *Scenedesmus* sp. e *Schizochytrium limacinum* frente a extração de óleo de soja utilizando isopropanol

aquoso, Yao et al. (2013) notaram a eficiência da extração após ruptura celular, por agitação ultrassônica para a espécie *S. limacinum* com rendimento em torno de 94-96% do óleo com 88 ou 95% de isopropanol aquoso. Para *Scenedesmus* sp. a extração foi mais eficaz quando as células se encontravam intactas com rendimento de óleo de 86-93% com isopropanol de 70, 88 ou 95%. O rendimento do óleo de soja com 88-95% de isopropanol foi de 93-95%. Comprovando assim a eficiência da extração lipídica com isopropanol aquoso para microalgas verdes.

Os compostos voláteis formados pela degradação térmica de carotenóides presentes na microalga *Dunaliella bardawil* foram alvos da investigação feita por Tinoco et al. (2016), que detectaram 10, 12 e 120 ng mL⁻¹ dos compostos β -ciclocitral, α -ionona e β -ionona, respectivamente, utilizando água como solvente, entre 60 e 87°C durante 30-75 min em agitação; o mesmo estudo foi utilizado por aquecimento com a irradiação por micro-ondas, onde 5, 5, 50 ng mL⁻¹ foram obtidos entre 75-107°C por 1,5-2,8 min. Assim, sugerindo uma nova forma de obtenção biotecnológica para os carotenóides desta espécie.

Em um estudo realizado por Cunha (2012), observou-se que nos rios Araguari e Falsino, ambos localizados no Estado do Amapá, apresentaram uma enorme biodiversidade de fitoplâncton (também conhecidos por algas) quando comparado a outros estudos na região e no Brasil. Sendo que, a divisão Chlorophyta e a classe Zygnematophyceae foram as que indicaram um maior número de táxons, corroborando a diversidade aquática da Amazônia brasileira e a relevância desse tipo de levantamento ecológico.

As pesquisas envolvendo o uso de microalgas nos mais diversos campos vêm crescendo exponencialmente, no entanto, o número de depósitos de patentes sobre microalgas é reduzido no Brasil quando comparado aos Estados Unidos, por exemplo. Revelando assim uma ausência de cultura de proteção à propriedade intelectual o que contrapõe a biodiversidade local (BARCELLOS et al., 2012).

Ainda são necessários grandes avanços na concepção e no desenvolvimento de tecnologias que possam reduzir os custos e aumentar os rendimentos. Somente estudos integrados, seguindo um programa de P & D (pesquisa e desenvolvimento) coerente e de longo prazo, bem financiado, irão eventualmente atingir esse objetivo: a seleção de linhagens que produzem grande quantidade de lipídeos perfeitamente adaptadas às condições regionais, aliadas à melhoria genética e a otimização de

processos, certamente constituirão as contribuições para as inovações de sucesso, como exemplo, a biorrefinaria (AMARO; GUEDES; MALCATA, 2011).

Para tornar a produção de microalgas economicamente viável e sustentável, é necessário utilizar todos os compostos produzidos de forma benéfica. A biomassa residual pode ser fracionada ou convertida em diversas rotas energéticas para materiais e subprodutos. Vale lembrar, que são necessárias observações quanto a: estequiometria das células; estrutura da unidade de produção e ao volume dos mercados endereçáveis. Assim, viabilizando o uso da biomassa para produtos tanto de alto valor quanto médio valor (HARISKOS; POSTEN, 2014).

Com isso, a biorrefinaria mostra-se eficaz quando aplicada, por exemplo, diante de técnicas que promovam o isolamento de proteínas e lipídeos. No entanto, outras frações como carboidratos e pigmentos irão acrescentar valor significativo para o processo de produção quando isolados. Vanthoor-Koopmans et al. (2013), observaram que o campo elétrico pulsado (mais eficiente), o fluxo de fluido supersônico e o ultrassom são técnicas promissoras para a ruptura celular contínua. Para a tecnologia de separação, os líquidos iônicos (sais formados por cátions e ânions) são mais propícios para separar compostos hidrofóbicos e hidrofílicos.

A maior parte da matéria orgânica pode ser utilizada para a produção de bioenergia por meio do processo de fermentação anaeróbica. Mussnug et al. (2010) demonstraram que a fermentação da alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* foi eficiente com uma produção de 587 mL ($\pm 8,8$ SE) de biogás g de sólidos voláteis⁻¹ (VS⁻¹), enquanto que a fermentação de *Scenedesmus obliquus* foi ineficiente com apenas 287 mL ($\pm 10,1$ SE) de biogás g VS⁻¹ produzido. Com relação a biorrefinaria, a produção de hidrogênio em *C. reinhardtii* antes da fermentação anaeróbia da biomassa de algas foi medida e resultou em um aumento da geração de biogás para 123% ($\pm 3,7$ SE). Denotando assim, que em alguns casos têm-se efeitos sinérgicos inesperados.

3.1.1 Aplicações e substâncias produzidas por microalgas e cianobactérias

Os polissacarídeos extraídos de macroalgas e utilizados como fonte de ficocolóides (ágar, carragenina e alginato) foram os primeiros produtos comerciais provenientes de algas. As microalgas, contudo, só entraram no mercado, para este

tipo de aplicações, no final do século passado, quando a tecnologia de cultivo deste organismo unicelular foi desenvolvida (BEN-AMOTZ, 2009).

Células de *Chlamydomonas reinhardtii*, por exemplo, quando “estressadas” e cultivadas fotoautotróficamente ou fotoheterotróficamente, acumulam triacilgliceróis em plastídios e corpos lipídicos citoplasmáticos, atingindo cerca de 46-65% de peso seco em acúmulo de amido (MERCHANT et al., 2012).

A *Chlorella vulgaris* é uma espécie que apresenta vantagens biotecnológicas como: grande capacidade de adaptação, elevada produção de biomassa, biomoléculas como: proteínas (50%), clorofila (5%) e um grande número de vitaminas (LEE, 2008). Além disso, é utilizada como suplemento alimentar, em pó, cápsulas e comprimidos, em particular nos países asiáticos, Europa e América do Norte (SILVA et al., 2015).

Pesquisas recentes descrevem a possibilidade dos metabólitos produzidos por cianobactérias, dentre estas a *Limnothrix*, possuir potencial para desenvolvimento comercial de compostos não apenas biomédicos relevantes, mas também aqueles com aplicações para o controle de algas e outros micro-organismos. Outra promissora aplicação, seria a produção rentável de biocombustíveis baseados na quantidade de biomassa produzida por este gênero (BERRY et al., 2008; HONG et al., 2016).

A espécie *Monoraphidium contortum* foi identificada como uma promissora candidata a produção de biocombustíveis líquidos, caracterizados pela alta produtividade de biomassa durante o crescimento máximo. O seu teor lipídico pode chegar a 56%, dependendo eventualmente das condições de cultivo empregadas (YU et al., 2012; BOGEN et al., 2013).

Alguns estudos relatam a presença de *Planktolyngbya* em ambientes eutrofizados, sendo que algumas espécies são potencialmente neurotóxicas como *Planktolyngbya limnetica* (JAKUBOWSKA; ZAGAJEWSKI; GOŁDYN, 2013). E ainda, cepas de *Planktolyngbya reilingii* são descritas por Sant’Anna et al. (2008) como produtoras de saxitoxinas.

Pesquisas preliminares indicaram que *Pseudanabaena* possui a capacidade de produzir microcistina como toxina. Outros estudos em andamento, avaliam sua capacidade de produzir outras toxinas e sua capacidade de fixação de nitrogênio (KLING et al., 2012).

O gênero *Scenedesmus* possui a sua capacidade de acumular grandes quantidades de lipídeos (TANG et al., 2011; REN et al., 2013) que podem ser

utilizados na produção de biodiesel, como aditivos alimentares ou combinados com outras fontes de proteína (BALEN et al., 2015).

A microalga *Spirogyra* é fonte valiosa de compostos bioativos naturais que são amplamente explorados para atividades antimicrobianas, antivirais, antioxidantes, anti-inflamatórias, citotóxicas e outras atividades biológicas (KUMAR et al., 2015). Nabavi (2013), em um estudo sobre as atividades biológicas da espécie *Spirogyra singularis* identificou que o extrato possui ação antioxidante em testes de peroxidação de ácido linoleico induzidos por hemoglobina e remoção de peróxido de hidrogênio. Esse mesmo extrato mostrou também uma boa atividade anti-hemolítica. Isso ocorre devido a presença de teores de fenol e flavonóides no extrato.

Spirulina tornou-se popularmente conhecida para o consumo alimentar devido à grande diversidade e concentração de nutrientes que contém como: β -caroteno, ácido linolênico, minerais e rica em vitaminas do complexo B. É a fonte de alimento mais nutritiva e concentrada encontrada na natureza. Possui um alto teor proteico, que corresponde a 60% do peso seco, lhe conferindo um elevado valor nutritivo; as proteínas representam aproximadamente 2% do peso seco. (CAPELLI; CYSEWSKI, 2010).

Feller et al. (2015) destacaram em seus estudos sobre a composição bioquímica de microalgas para a aplicação em bioprodutos e biodiesel, a espécie *Spirulina platensis* com quantidades significativas de ácidos graxos saturados e poli-insaturados, respectivamente, o ácido palmítico e o ácido linoleico.

De acordo com Ruffing (2014), a espécie *Synechococcus elongatus* quando utilizada como célula hospedeira é capaz de realizar a conversão direta de dióxido de carbono para ácidos graxos livres. A utilização de *Synechococcus* sp. como “tapetes” em ambientes aquáticos, têm demonstrado sucesso em aplicações benéficas de biorremediação para remoção *in situ* e fora do local de poluentes (DUBEY et al., 2011).

3.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As condições de cultivo devem reproduzir ao máximo o ambiente natural da alga, em condições de temperatura, luminosidade, pH (potencial hidrogeniônico) da água, concentrações de sais e minerais. Contudo, na realidade existem muitas diferenças significativas, a maioria são impostas propositalmente. Na verdade, após o isolamento a partir do ambiente natural, espécies de algas são mantidas sob

condições artificiais controladas como: composição do meio, luz e temperatura. A imposição de um ambiente artificial sob as células sobreviventes provoca um período de adaptação fisiológica e/ou seleção, durante o qual o crescimento da população não irá acontecer ou é muito lenta (BARSANTI; GUALTIERI, 2014).

Em busca da otimização do crescimento das microalgas para potencializar a extração lipídica, o método de Taguchi (ferramenta utilizada para o melhoramento de fatores controláveis por meio de um planejamento experimental) foi uma alternativa encontrada por Loures (2016) na tentativa de estabelecer a melhor concentração de nitrato de sódio (NaNO_3) e encontrar o ajuste necessário para maximizar a concentração de biomassa.

De acordo com Souza et al. (2016), as condições de cultivo e o tempo de incubação são imprescindíveis para a definição da composição final da biomassa. O acúmulo de moléculas de reserva como carboidratos e lipídeos, importantes matérias-primas para a produção de biocombustíveis, pode acontecer por causa da depleção de nitrogênio.

Os nutrientes presentes no meio de cultivo precisam atender as necessidades nutricionais das microalgas para assim elevar sua produtividade. Contudo, não existe um meio de cultivo único para todas as espécies de microalgas, pois cada uma exige uma quantidade específica de nutrientes (RICHMOND, 2004; SIPAÚBA-TAVARES; IBARRA; FIORESI, 2009).

Com regime de nutrientes simples e barato para a cultura, uma taxa de crescimento mais rápida em comparação com outras culturas energéticas terrestres, uma elevada produtividade de biomassa e um perfil bioquímico atraente, a espécie *Chlorella* sp. destacou-se nos estudos realizados por Phukan et al. (2011), apresentando cerca de 18,59 MJ/Kg de conteúdo energético, reafirmando sua candidatura como fonte de bioenergia.

A aeração no cultivo de microalgas é um dos fatores que influencia seu crescimento, pois é responsável por impedir que as células se aglomerem, assim garantindo maior incidência de luz sob o cultivo. A aeração constante ajuda na mistura do meio de cultura e auxilia a distribuição de forma homogênea dos nutrientes (LEE; SHEN, 2004).

Um outro fator que interfere diretamente na composição química das microalgas é a temperatura. González-Fernández et al. (2016) notaram em um estudo para elucidar a digestão anaeróbica da biomassa de microalgas colhidas e cultivadas

em águas residuais com diferentes cenários (1º. 23°C / 14h de iluminação, 2º. 15°C / 14h e o 3º. 15°C / 11h) que a temperatura afetou a produtividade de biomassa, mas não a concentração final da mesma. No entanto, nestas diferentes situações houve variações significativas no teor de lipídeos, proteínas e carboidratos.

O pH também está na lista de causas que podem modificar as condições de crescimento. A microalga *Chlorella vulgaris* apresenta elevada acumulação em sua biomassa de lipídeos sob limitação de enxofre no pH de 7,5, resultando numa taxa de crescimento específico máximo de 0,541 dias⁻¹ e um teor de lipídeos totais de 53,43%g (SAKARIKA; KORNAROS, 2016).

As inovações no cultivo de microalgas são cada vez mais estudadas. Isso é refletido na pesquisa feita por Wagner, Steinweg e Posten (2016), onde estes utilizaram a iluminação LED (sigla em inglês que significa “Diodo Emissor de Luz”) colorida, como vermelho, azul, verde e misturas, para o cultivo integrado de microalgas e, assim quantificar os rendimentos de biomassa em comparação com a luz branca. Na espécie *Chlamydomonas reinhardtii* foi observado uma mudança no tamanho e a forma de agregação das células frente as cores vermelha e azul denotando uma influência de pigmentos sensoriais.

Culturas de microalgas em larga escala quando comparadas a produção atual de petróleo são muito dispendiosas. Diante disso, o desafio atual para o cultivo de microalgas está associado a diminuição dos custos para a produção de biodiesel em relação às plantas oleaginosas e ao isolamento e seleção de espécies promissoras de elevada acumulação de lipídeos (CAROLINO, 2011).

3.3 LIPÍDEOS E SUAS DEFINIÇÕES

A palavra “Lipídeo” tem origem grega “Lipos” que significa “Gordura”. Portanto, os lipídeos são insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos não polares, tais como, hexano e éter etílico. De acordo com esta definição, os lipídeos representam a classe mais diversificada de macromoléculas. Uma biomembrana típica contém mais de cem espécies de lipídeos, isso inclui moléculas que contenham ácidos graxos, esteróis, hidrocarbonetos, pigmentos e toxinas (LUCKEY, 2014; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2016; LEBLOND; DAHMEN, 2016).

Um subgrupo de lipídeos (glicerofosfolipídeos, galactolipídeos e sulfolipídeos), interessantes para estudo de membrana, contém segmentos que são polares e com

isso aumentam a capacidade de dissolução em água. Esses lipídeos são descritos como “anfifílicos” ou “anfipáticos”, ou que contenham ambos metade hidrofóbica e hidrofílica (STILLWELL, 2013; NELSON; COX, 2014).

Segundo Junqueira e Carneiro (2012), os lipídeos possuem altas regiões composta por hidrocarbonetos de cadeias longas. De acordo com suas principais atividades, os lipídeos celulares podem ser divididos em duas principais categorias: lipídeos de reserva nutritiva (compõem-se de gorduras neutras como o glicerol) e lipídeos estruturais (constituintes de todas as membranas celulares).

Os lipídeos não são apenas constituintes das membranas celulares, mas também importantes mediadores de sinalização, agindo assim como “lipídeos bioativos”. Entre seus papéis proeminentes, destacam-se: regulação imune, inflamação e manutenção da homeostase. As principais famílias de lipídeos bioativos são: os clássicos ecosanóides (ex. Leucotrieno B₄; prostaglandina E₂), fosfolipídeos (fosfatidilinositol), endocanabióides (araquidonilglicerol) e mediadores lipídicos pró-resolução especializados (EPA e DHA) (CHIURCHIÙ; MACCARRONE, 2016).

Além do mais, os lipídeos são constituintes importantes da dieta humana, não apenas pelo seu alto teor energético, mas também porque os ácidos graxos essenciais (como EPA e DHA encontrados em óleos de peixe), as vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) e outros micronutrientes lipofílicos estão contidos na gordura de alimentos naturais (RODWELL et al., 2016).

3.3.1 Tipos e funções de lipídeos

Os lipídeos encontram-se amplamente distribuídos em organismos vegetais e animais, principalmente nas membranas celulares e nas células de gordura. O termo gordura e lipídeo são frequentemente usados indistintamente. O termo gordura é mais familiar para os leigos pra substâncias que apresentam textura claramente gordurosas e imiscíveis em água. Exemplos familiares são a manteiga e as partes gordas da carne. Em geral, os alimentos lipídicos são indicados como gorduras (sólidos) ou óleos (líquidos) (GURR et al., 2016).

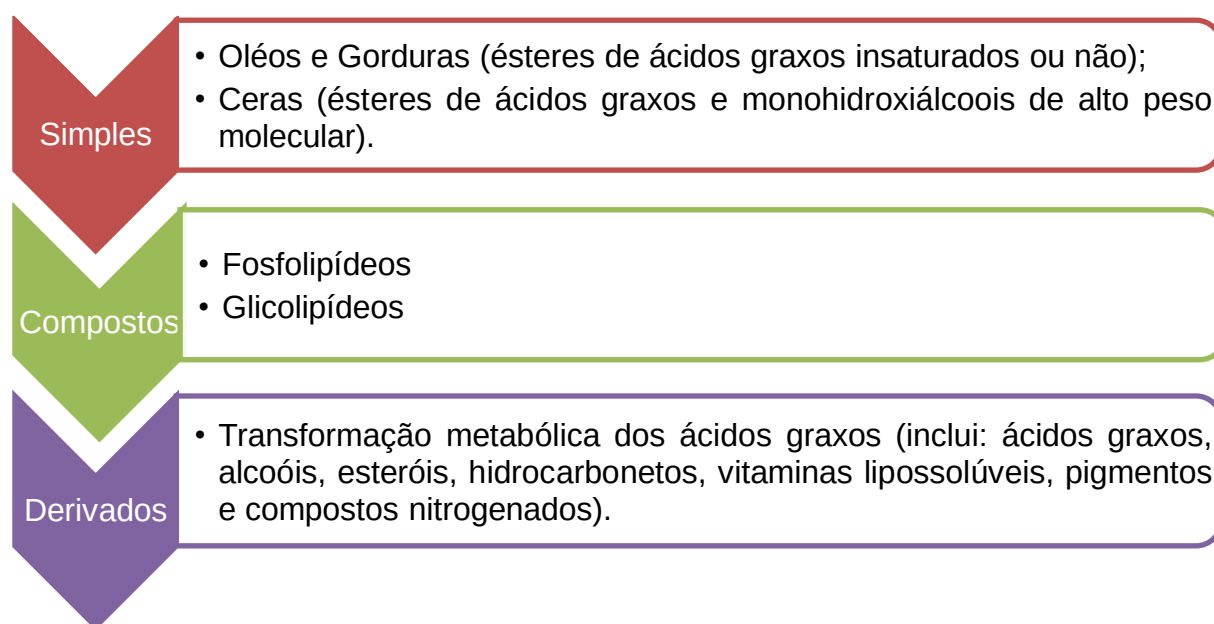
Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n°. 270/2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, os óleos vegetais e as gorduras vegetais são produtos constituídos principalmente de glicerídeos de ácidos graxos de espécie (s) vegetal (is). E as gorduras vegetais apresentam-se na forma sólida ou pastosa a

temperatura de 25°C e os óleos vegetais apresentam-se na forma líquida a mesma temperatura.

As propriedades físicas e químicas dos óleos e gorduras estão diretamente relacionadas com o grau de insaturação e o tamanho da cadeia. Um bom exemplo é o ponto de fusão que diminui drasticamente com o aumento do número de duplas ligações. O alto grau de saturação das cadeias (gorduras) aumenta a interação das moléculas e dificulta a fluidez do material, diminuindo sua susceptibilidade a oxidação. Enquanto que para materiais com alto grau de insaturação (óleos), a baixa interação entre as cadeias aumenta a fluidez, mas diminui a sua estabilidade oxidativa (OLIVEIRA; SUAREZ; SANTOS, 2008; PINHO; SUAREZ, 2013).

Os lipídeos são essenciais para a vida e a existência das células. Dessa forma, é comum dividir os lipídeos em: simples, compostos e derivados (figura 3). Os lipídeos simples são compostos que, por hidrólise total, dão origem somente a ácidos graxos e álcoois. Os lipídeos compostos são aqueles que contêm outros grupos na molécula, além de ácidos graxos e álcoois. São chamados lipídeos derivados as substâncias obtidas na sua maioria por hidrólise dos lipídeos simples e compostos (POL; GROSS; PARTON, 2014; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2016).

Figura 3 – Classificação dos lipídeos

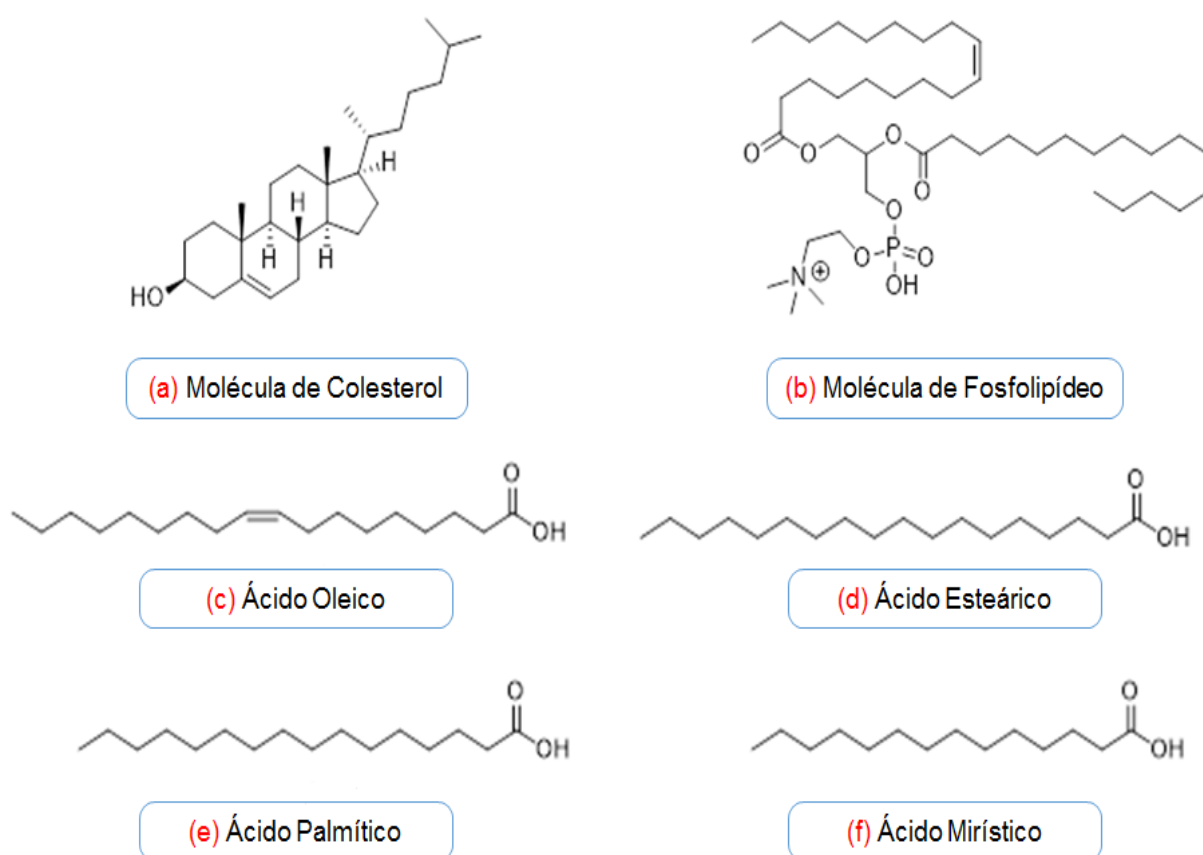


Fonte: FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2016 (Adaptado).

Estes lipídeos apresentam várias funções no metabolismo humano. Os produtos hidrolíticos de triglicerídeos e fosfolipídeos, particularmente os ácidos graxos, têm atividades antimicrobianas. Além de serem compostos naturais, eles possuem a vantagem de serem ambientalmente seguros e geralmente inofensivos para o organismo em concentrações que matam agentes patogênicos (THORMAR, 2011).

“Do ponto de vista fisiológico e clínico, os lipídeos biologicamente mais relevantes são os fosfolipídeos, o colesterol, os triglicerídeos e os ácidos graxos livres” (XAVIER et al., 2013) (Figura 4).

Figura 4 – Exemplo dos lipídeos biologicamente mais relevantes

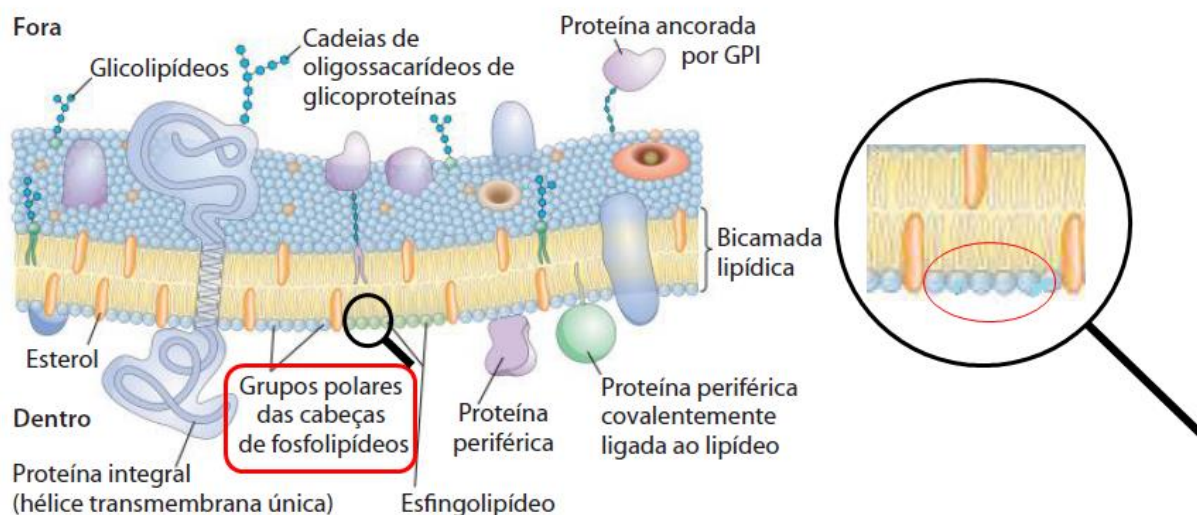


Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2017.

Os fosfolipídeos apresentam-se como os componentes majoritários da membrana celular (Figura 5) que é composta por uma dupla camada lipídica que atua como barreira à passagem de moléculas polares e íons, permitindo assim a criação de um meio intracelular ideal para as reações bioquímicas no interior da célula. Vale ressaltar, que a membrana celular é constituída também por proteínas e envolve

diversas estruturas tais como: mitocôndrias, cloroplastos, núcleo, retículo endoplasmático (liso e rugoso), lisossomos, entre outros (DE OLIVEIRA, 2014; NELSON; COX, 2014).

Figura 5 – Localização dos fosfolípídeos na membrana celular



Fonte: NELSON; COX, 2014 (Adaptado).

A estabilidade da membrana celular é mantida por uma variedade de interações, dentre elas, destacam-se: interações hidrofóbicas entre as cadeias de ácidos graxos de moléculas fosfolipídicas; interações de Van Der Waals entre cadeias de ácidos graxos, causando o agrupamento das caudas hidrofóbicas; ligações de hidrogênio entre grupos-cabeça polares e moléculas de água e interações eletrostáticas entre grupos-cabeça carregados (PANDIT, 2008).

Além dos fosfolípídeos, muitas membranas celulares contêm glicolípídeos e colesterol. Os glicolípídeos consistem de duas cadeias de hidrocarbonetos ligados a cabeça polar que contém carboidratos. O colesterol, em contraste, consiste em quatro anéis de hidrocarbonetos (fortemente hidrofóbicos) ao invés de cadeias lineares, mas o grupo hidroxil (OH) ligado a uma das extremidades do colesterol é fracamente hidrofílico. Logo, ambas as moléculas são anfipáticas devido as suas características estruturais (COOPER; HAUSMAN, 2007).

O colesterol é uma substância que tem aspecto de cera e contribui para a formação de certos hormônios e sais biliares podendo ser encontrado incorporado a várias estruturas celulares. Todas as células são capazes de sintetizá-lo a partir de

precursores simples, sua rota biosintética apesar de complexa tem um único precursor, o acetato. Este é convertido em unidades de isopropeno, unidades C₅ que possuem o esqueleto de carbono de isopreno as quais seriam condensadas para formar uma molécula linear, precursora do colesterol, onde então é organizada em estrutura cíclica (VOET; VOET, 2013; WARDLAW; SMITH, 2013).

A ciclização do esqualeno produz o colesterol. O esqualeno é um hidrocarboneto linear, quando ciclizado forma o esqueleto esteroide tetracíclico e a cadeia lateral através de uma série de mudanças adicionais como: oxidações, remoção ou migração de grupos metil. A síntese e o transporte do colesterol estão sob regulação complexa de hormônios. A enzima HMG-CoA-redutase (ou 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase) controla a taxa de síntese do colesterol. As proteínas do complexo Insig, SCAP e SREBP, detectam os níveis de colesterol e provocam o aumento da síntese ou da degradação da HMG-CoA-redutase (VOET; VOET; PRATT, 2014).

Os triglicerídeos são ésteres de glicerol, mono e diacilgliceróis, em que um ou dois ácidos graxos estão esterificados com o glicerol, também são encontrados nos tecidos. É pouco armazenado no fígado, a maior parte é secretada, empacotada com outros lipídeos e apoproteínas (proteína que liga lipídeos) para formar partículas de lipoproteínas chamadas de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2012; RODWELL et al., 2016).

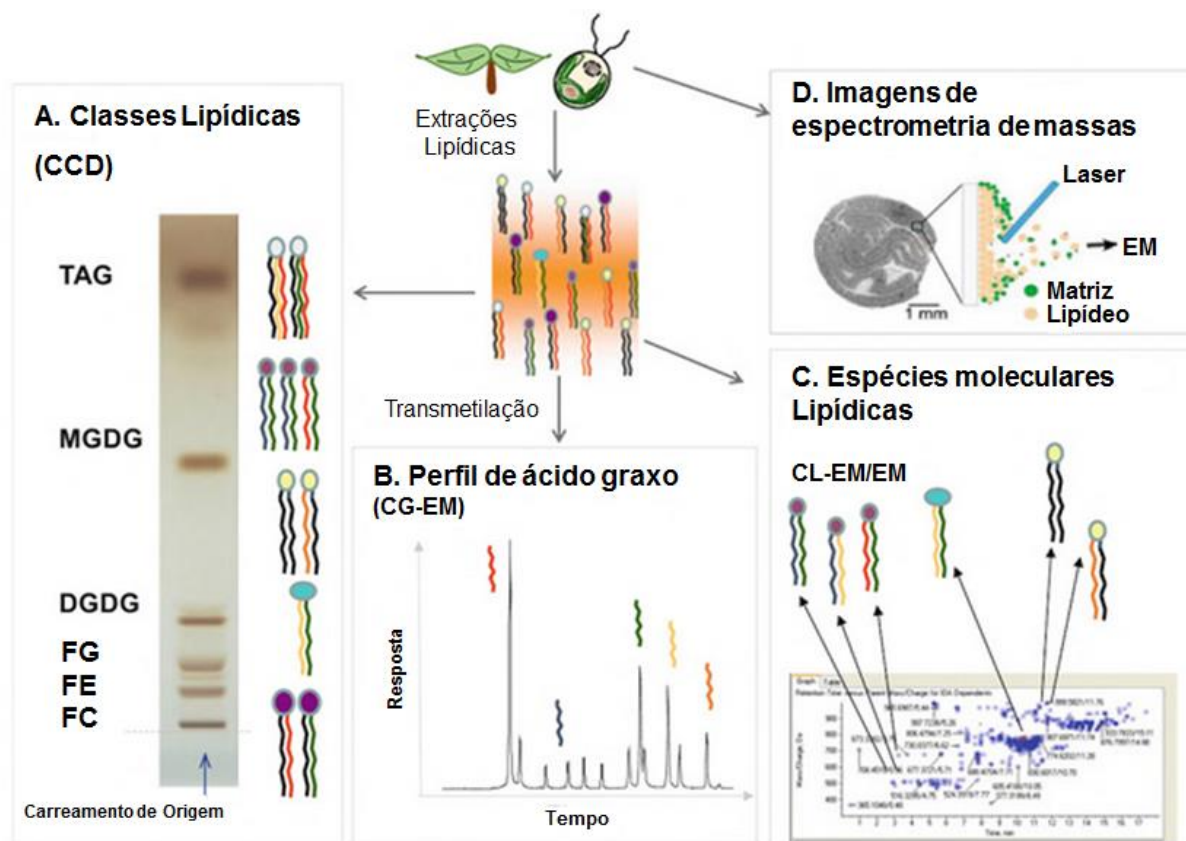
Nelson e Cox (2014), afirmam que outros lipídeos como: ubiquinonas e as plastoquinonas, embora presentes em quantidades relativamente pequenas, desempenham papéis cruciais, pois são transportadores de elétrons nas mitocôndrias e nos cloroplastos, respectivamente. Os policetídeos, por exemplo, são produtos naturais amplamente usados na medicina. As chaperonas auxiliam no enovelamento de proteínas de membrana, agentes emulsificantes no trato digestivo e mensageiros intracelulares.

Além disso, os lipídeos também são precursores de hormônios que auxiliam na absorção e no transporte das vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) e melhoram a textura e o sabor dos alimentos (PINHEIRO; PORTO; MENEZES, 2005).

Li-beisson, Nakamura e Harwood (2016) discorrem que para avaliar a quantidade e a composição de cada classe de lipídeos, métodos cromatográficos têm sido desenvolvidos desde 1950. Os mais populares e acessíveis são: a Cromatografia de Camada delgada (CCD) e a Cromatografia Gasosa (CG). As imagens de

espectrometria de massas estão sendo desenvolvidas e utilizadas em células de plantas e/ou microalgas, fornecendo informações adicionais em relação a composição química lipídica. As principais características de cada técnica são resumidas na figura 6.

Figura 6 – Principais ferramentas para a análise de lipídeos



Legenda: TAG – Triacilgliceróis; MGDC – Monogalactosildiácilglicerol; DGDG – Digalactosildiácilglicerol; FG – Fosfatidilglicerol; FE – Fosfatidiletanolamina; FC – Fosfatidilcolina; CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas; CL-EM/EM – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

Fonte: LI-BEISSON; NAKAMURA; HARWOOD, 2016 (Adaptado).

3.3.2 Ácidos graxos: Importância e obtenção

Os ácidos graxos são compostos imprescindíveis para o bom funcionamento do organismo podendo ser obtidos de fonte vegetal ou animal. Além disso, são um grupo de moléculas orgânicas que fornecem a energia necessária para a manutenção dos processos biológicos. Em síntese, os ácidos graxos possuem cerca de duas vezes mais valor energético quando comparados as proteínas e carboidratos, e ainda, seu

armazenamento no tecido adiposo requer menos quantidade de água (KREMMYDA et al., 2011).

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos compostos por cadeias de hidrocarbonetos longos insaturados ou saturados que constituem uma das unidades fundamentais dos lipídeos, com estado de oxidação tão baixo quanto os hidrocarbonetos nos combustíveis. As cadeias carbônicas lipídicas podem ser classificadas em: curta (entre 2 a 6 átomos de carbono), média (entre 8 a 12 átomos de carbono) e longa (acima de 14 átomos de carbono) (SANTOS et al., 2013; NELSON; COX, 2014).

Além desta classificação, os ácidos graxos ainda podem ser divididos quanto à posição da primeira dupla ligação (a partir do seu radical metil, representada pela letra grega ômega (ω) ou a partir de seu grupo funcional, representada pela letra delta (Δ) e quanto ao número de duplas ligações (saturados, mono-insaturados e poli-insaturados) (SOLOMONS; FRYHLE, 2011). Esta última, é a mais conhecida entre as formas de classificação, conforme apresentado na figura 7.

Figura 7 – Classificação dos ácidos graxos

Saturados	• Sem duplas ligações entre seus átomos de carbono. • Exemplos: láurico, mirístico, palmítico e esteárico.
Mono-insaturados	• Com uma ligação dupla na molécula. • Exemplo: ácido oleico.
Poli-insaturados	• Com mais de uma ligação dupla na molécula. • Exemplo: ômega 3 e ômega 6.

Fonte: XAVIER et al., 2013 (Adaptado).

“Os ácidos graxos participam de diversos processos no organismo – como a caracterização dos lipídeos no organismo em níveis plasmáticos – têm ação no processo inflamatório e no metabolismo lipídico hepático e do tecido adiposo” (MARKIEVICZ et al., 2016).

Em uma dieta normal pode-se obter os ácidos graxos através do consumo de alimentos como: peixes, ovos, óleos vegetais e carnes. Além disso, os ácidos graxos podem ser produzidos pelo próprio organismo através de um processo chamado

lipogênese. No entanto, nem todos os tipos são fornecidos por esse processo, requerendo assim outras maneiras de suplementação (FERREIRA; SOUZA-SOARES; COSTA, 2013).

Os ácidos linoleico, linolênico e araquidônico são ácidos graxos poli-insaturados e, em razão de sua ação são considerados ácidos graxos essenciais, não podem ser fabricados a partir de outras substâncias do corpo ou a partir de um outro ácido graxo. Eles têm que ser supridos na dieta, portanto, são considerados nutrientes essenciais (SIZER; WHITNEY, 2003; BARRETT et al., 2014).

Os estudos envolvendo a utilização de óleos de origem tanto vegetal quanto animal para a obtenção de ácidos graxos como matéria-prima, vêm ganhando destaque nos últimos anos entre a comunidade científica. O uso de microalgas, por exemplo, surge como uma alternativa inovadora e promissora em pesquisas, tendo em vista seu potencial para armazenamento de ácidos graxos e outras moléculas importantes com atividades biológicas essenciais.

3.3.3 Ácidos graxos e sua relação com as microalgas

Em geral, os lipídeos presentes nas microalgas são derivados de ácidos graxos que possuem de 12 a 22 carbonos, podendo ser saturados ou insaturados. Os lipídeos da célula incluem lipídeos neutros (não possuem polaridade) utilizados como reserva de energia, como os triglicerídeos, e lipídeos polares formadores de membranas celulares, como fosfolipídeos e glicolipídeos (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

As microalgas são capazes de sintetizar os ácidos graxos nos cloroplastos das células. Em resumo, através de uma série de reações (condensação, redução e desidratação) a partir da acetilcoenzima A se tem como produto final os ácidos graxos saturados. Para produzir ácidos graxos insaturados, uma dupla ligação é introduzida pela enzima solúvel estearoil ACP (proteína carreadora de acil) desaturase na rota biosintética. A composição final de ácidos graxos das microalgas é definida pelas atividades da enzima que utiliza Acil ACP na fase de terminação da síntese de ácidos graxos (HU et al., 2008).

Pesquisas recentes têm explorado o uso de microalgas para a obtenção de lipídeos, dentre estes os ácidos graxos, principalmente os de maior valor comercial como o ácido linolênico. As microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* apresentaram respectivamente, ácido linolênico e ácido araquidônico, quando

cultivadas à 35°C em diferentes intensidades luminosas e variações nas concentrações de bicarbonato de sódio e nitrato (COSTA et al., 2006).

A suplementação com a farinha de microalga *Schizochytrium* sp. à 3,0% introduzida na dieta de tilápias (nome comum de várias espécies de peixes ciclídeos de água doce) reduziu o consumo de alimento quando induzida por 38 dias; melhorou expressivamente a quantidade de ômega 3 (ácido graxo essencial) sem alterar a qualidade da carne do filé da tilápia quando oferecida por 49 dias; e em 60 dias aumentou o somatório de ácidos graxos ômega 3 na cabeça, vísceras e espinha da tilápia na fase adulta (JORGE, 2016).

Os ácidos graxos presentes nas espécies bentônicas *Klebsormidium* sp. e *Stigeoclonium* sp. são C18: 2ω6 (ácido linoleico) e C18: 3ω3 (ácido linolênico), respectivamente (máximo de 5,4% e 11,1% de DW) e *Uronema* sp. rica em C16:0 (ácido palmítico) (2,3% de DW). Isso indica, que as espécies *Klebsormidium* sp. e *Stigeoclonium* sp. são fontes potenciais de ácidos graxos poli-insaturados (LIU; VANORMELINGEN; VYVERMAN, 2016).

3.4 PRINCIPAIS MÉTODOS PARA A EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE MICROALGAS

O método para a extração de ácidos graxos deve ser rápido e eficiente com o intuito de diminuir a degradação dos compostos presentes nas microalgas. Vale ressaltar, que para poder iniciar a extração dos ácidos graxos as microalgas passam primeiramente pelas etapas de isolamento, cultivo e desidratação por meio de: sedimentação, centrifugação, filtração, floculação e/ou liofilização (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

Existem vários métodos de extração, dentre estes destacam-se como mais utilizados a extração com: Soxhlet, sonicação, método proposto por Bligh & Dyer, fluido supercrítico e enzimático. Alguns deles mostraram rendimentos significativos de extração de óleo na escala laboratorial. Contudo, pouco ou nenhum teste piloto em grandes escalas (produção) foram realizados. Isso representa uma oportunidade para a pesquisa definir tecnologias eficientes para a extração de óleo de microalgas, tendo em vista que há uma necessidade para estes métodos de extração serem testados em escalas além do laboratório (MERCER; ARMENTA, 2011).

O aparelho de Soxhlet (inventado por Franz Von Soxhlet in 1879) é um equipamento simples que possibilita a extração de uma quantidade considerável de óleo quando comparado a outros métodos. O procedimento baseia-se no contato contínuo da amostra com o solvente orgânico através do refluxo por um período de tempo prolongado, em geral, é operado em uma temperatura de ebulição (BATISTA, 2016).

Clorofórmio, etanol e hexano foram os solventes mais eficazes na extração de ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) pelo método de Soxhlet, onde o extrato de clorofórmio produziu mais de 75% de EMAG, 25% a mais do que o extrato de etanol e cerca de 58% a mais do que o extrato de hexano. Dessa forma, provando ser um método confiável, eficiente e muito acessível para a extração de ácidos graxos da biomassa de *Chlorella* sp. (RAMLUKAN; MOODLEY; BUX, 2014).

A técnica ultrassônica é capaz de aumentar o rendimento de óleo das microalgas de 50-500%. Este rendimento é afetado pela força ultrassônica e pelo tipo de solvente e/ou enzima utilizado. A sonicação ocorre quando ondas sonoras se propagam para o meio líquido resultando em ciclos de alta e baixa pressão que através da força de cisalhamento quebram a estrutura celular mecanicamente (SUALI, SARBATLY, 2012; VIDAL JUNIOR, 2014). Além do mais, quando relacionadas a extração de materiais lipídicos de microalgas, a sonicação pode remover micro-organismos contaminantes aderidos a superfície da parede celular destas (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014).

Com o auxílio de um sonicador a uma ressonância de 50 Hz durante 15 minutos foi possível extrair os ácidos graxos e quantificá-los por meio da cromatografia gasosa, que foi capaz de detectar a sua eficiência na extração de ácido linoleico presente na espécie *Chlorella* sp. e ácido oleico nas espécies *Nostoc* sp. e *Tolypothrix* sp. (PRABAKARAN; RAVINDRAN, 2011).

O clássico método de Bligh & Dyer (1959), originalmente proposto para extração de lipídeos nos músculos de peixes, é amplamente utilizado para a extração de ácidos graxos de microalgas por ser simples, rápido e modificável. A mistura dos solventes clorofórmio, metanol e água geralmente usados na proporção 2:1:0,8 v/v é aplicada diretamente sob a biomassa microalgal a ser estudada (VIÊGAS, 2010).

Chatsungnoen e Chisti (2016), utilizaram 1g de biomassa seca para uma mistura de solvente de 5 mL de clorofórmio, 10 mL de metanol e 4 mL de água. Ao final, comprovaram a eficiência na extração dos óleos da pasta de biomassa floculada

a partir da pasta de biomassa recuperada sem o uso dos flocculantes (sulfato de alumínio e cloreto de ferro) para as espécies *Chlorella vulgaris*, *Choricystis minor*, *Neochloris* sp., *Annochloropsis salina* e *Cylindrotheca fusiformis*.

O fluido supercrítico é uma tecnologia verde emergente que possui o potencial de substituir a extração com um solvente orgânico (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012). Essa técnica baseia-se na utilização de um fluido em condições supercríticas (pressão e temperatura) nas suas propriedades químicas que se encontram entre um líquido e um gás (CÓRDOBA-CASTRO et al., 2015).

Com a ajuda de CO₂ supercrítico utilizando metanol e hexano como co-solventes a baixa temperatura (37 e 55 °C) e pressão (5.9 e 7.6 megapascals (MPa), foram encontrados EMAG de cadeia mais longa da microalga *Nannochloropsis oculata* produzidos quando o metanol era o co-solvente, tais como: EPA, DPA (ácido docosapentaenóico), DHA e ácido linolênico. Logo, a variação nos compostos produzidos utilizando diferentes co-solventes e pressões demonstra a afinidade do CO₂ supercrítico para produzir o produto necessário (MCKENNEDY et al., 2016).

A extração enzimática consiste em utilizar a água como solvente e enzimas para a degradação seletiva da parede celular. Contudo, é necessário selecionar adequadamente as enzimas que serão usadas na pesquisa, devido as suas propriedades específicas para que não ocorra interrupção enzimática ao longo do processo (FU et al., 2010; ZUORRO et al., 2016).

A biomassa úmida da espécie *Nannochloropsis gaditana*, ao passar pela reação de transesterificação, obteve a conversão máxima de EMAG de 99,5% utilizando a lipase Novozyme 435 (N435) de *Candida antarctica* como catalisador, em uma proporção de massa equivalente a N435: óleo de 0,32, metanol / óleo e proporções de t-butanol / óleo de 4,6 e 7,1 cm³ g⁻¹ respectivamente, a 40°C durante 56 horas. Nota-se que a velocidade de reação como a reutilização da lipase ao longo de vários ciclos reacionais pode depender do teor de lipídeos presentes na biomassa da microalga (LÓPEZ et al., 2016).

Na tabela 3 estão relatados os principais métodos de extração de ácidos graxos encontrados na literatura, destacando-se as vantagens e desvantagens no uso destas técnicas.

Tabela 3 – Principais métodos de extração de ácidos graxos:
Vantagens e desvantagens

Método	Vantagens	Desvantagens	Referências
Soxhlet	Extração de lipídeos com alta eficiência; Medições diretas.	Grandes quantidades de solventes; Tempo de extração longo.	Hounslow et al. (2016) Ibañez et al. (2012) Kumar; Singh (2016)
Sonicação	Baixo tempo de extração; Redução no uso de solvente; Extração a temperatura ambiente	Dificuldade de renovação do solvente; Falta de uniformidade na distribuição de energia.	Adam et al. (2012) Brennan; Owende (2010) Hamed (2016)
Bligh & Dyer	Método fácil e replicável; Adequado para pequena escala.	Toxicidade dos solventes; Dificuldade do uso em larga escala.	Kumar et al. (2017) Saravanan; Madhivanan; Saravanane (2016)
Fluido supercrítico	Alta seletividade; Não tóxico; Baixo Custo;	Equipamento caro; Custo Operacional.	Herrero et al. (2015) Kumar et al. (2017) Santana et al. (2012)
Extração enzimática	Compostos orgânicos voláteis não são produzidos; “Ambientalmente amigável”	Custo elevado da enzima	Sani; Daud; Aziz (2013)

3.4.1 Reação de transesterificação e seus catalisadores

A transesterificação é uma alternativa frente a processos como: microemulsão e pirólise, pois é relativamente simples, promovendo a obtenção do biodiesel com

propriedades semelhantes ao diesel de petróleo, a partir de gordura animal ou óleos vegetais (SALEH; TREMBLAY; DUBÉ, 2010).

A transesterificação consiste na reação química onde o composto a ser analisado é constituído essencialmente de triglicerídeos, como um mono-álcool de cadeia curta na presença de catalisador, induzindo a formação de mono-ésteres e glicerina. No passo que a esterificação consiste na reação de ácidos graxos com mono-álcoois na presença de catalisadores, levando a formação de mono-ésteres e água (SUAREZ; MENEGHETTI, 2015).

Vale lembrar que, a esterificação de ácidos graxos livres com álcoois de baixo peso molecular é considerada um processo prévio a transesterificação quando os substratos apresentam alta acidez, para converter ácidos graxos livres em ésteres metílicos ou etílicos, evitando assim a saponificação (formação de sabão) (CEBIN et al., 2012).

Considerando o processo para a obtenção de biodiesel a partir de microalgas, as etapas de colheita da biomassa, secagem do material bruto e a extração de lipídeos com solvente por exemplo, o hexano, são essenciais no decorrer do procedimento. Ressalta-se ainda, que a extração está sujeita a um processo de transesterificação, onde três ácidos graxos de uma molécula de triacilglicerídeos reagem consecutivamente com álcool, tipicamente metanol, com o auxílio de um catalisador para formar EMAG e glicerol (SCHLAGERMAN et al., 2012).

A viabilidade da produção de biodiesel a partir das microalgas foi investigada por Nautiyal, Subramanian e Dastidar (2014) como matéria-prima para produção de biodiesel de terceira geração. Notou-se que, a extração com hexano e posterior transesterificação catalisada por ácido sulfúrico (H_2SO_4) do biodiesel de *Spirulina* é composto principalmente por éster metílico de ácido palmítico. Enquanto isso, o biodiesel das algas de uma lagoa local (Nova Deli, Índia), também extraídos com hexano, tem mais porcentagem de ácido oleico e palmítico.

O uso de catalisadores nas reações para a produção de biodiesel é comum. Diante disso, podemos classificar os catalisadores em: ácidos, alcalinos, enzimáticos e heterogêneos. Ambos têm características peculiares consideradas fundamentais como: a atividade, seletividade e especificidade que aliadas as suas propriedades secundárias, morfologia, resistência mecânica, estabilidade térmica e reprodutibilidade, podem ser aplicados em reações específicas (SILVA, RODRIGUES, NONO, 2008).

O ácido clorídrico (HCl) e o H_2SO_4 são exemplos de catalisadores ácidos. Estes na reação de transesterificação são úteis para converter a matéria-prima de ácidos graxos livres em ésteres fornecendo bons rendimentos. No entanto, a velocidade de reação é lenta e geralmente, requer altas temperaturas para converter triglicerídeos em ésteres metílicos (GERPEN, 2005; MATHIMANI; UMA; PRABAHARAN, 2015).

A aplicação de catalisadores alcalinos como por exemplo, o hidróxido de sódio (NaOH) e o hidróxido de potássio (KOH) são mais frequentemente utilizados comercialmente, pois além de serem manipulados com facilidade são menos corrosivos e favorecem a transesterificação do triglicerídeo em cerca de 4.000 vezes mais quando comparada aos catalisadores ácidos. Contudo, os ácidos graxos livres podem reagir com o catalisador básico e formar água e sabão, resultando na perda de catalisadores alcalinos durante o processo de reação (HUANG et al., 2010; TIAN; LI, 2016).

A alta produção de ácidos graxos livres em microalgas pode gerar o sabão como subproduto durante a transesterificação alcalina. Assim, catalisadores heterogêneos (Amberlyst-15 e catalisadores baseados em ZrTiO) foram utilizados para transformar ácido oleico em biodiesel por Veillette et al. (2017) nas microalgas, *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella protothecoides*, os lipídeos de *C. protothecoides* permitiram atingir uma conversão maior (84%) em relação aos lipídeos de *S. obliquus* (34%). Contudo, ambas as espécies sofreram limitações de transferência de massa, devido a impurezas, revelando a necessidade de estudos adicionais sobre a transesterificação alcalina dos lipídeos remanescentes do biodiesel.

Dentre as enzimas utilizadas como biocatalisadores na reação de transesterificação de triglicerídeos, as lipases se destacam para a produção de biodiesel. Essas enzimas são classificadas como enzimas hidrolíticas (hidrolases), pois hidrolisam triglicerídeos em seus respectivos ácidos graxos e glicerol (FERREIRA et al., 2016; ROSSET et al., 2013).

As reações enzimáticas geralmente podem ser realizadas em temperatura ambiente, pH próximo ao neutro e a velocidade de reação catalisada por enzima pode chegar até 10^{12} vezes maior do que as não catalisadas (ROSSET et al., 2011). Além disso, possuem boa tolerância ao nível de ácidos graxos livres onde a reação ocorre em condições moderadas e não há poluição para o ambiente natural. Entretanto, as enzimas são mais caras e alguns produtos químicos produzidos durante a reação podem ser tóxicos a enzima (ARENAS et al., 2016).

3.5 NOVAS PERSPECTIVAS: USO DE BIOCATALISADORES

A crescente necessidade de substituir os produtos à base de petróleo para lidar com as preocupações globais relacionadas às alterações climáticas suscitou um interesse considerável pelos micro-organismos fotossintéticos. As cianobactérias, em particular, possuem grande potencial como biocatalisadores para combustíveis e produtos químicos. Entretanto, o campo ainda é imaturo e muitas preocupações sobre a viabilidade econômica do potencial biotecnológico de cianobactérias permanecem (GUDMUNDSSON; NOGALES, 2015).

Em vários relatos recentes relacionados à biocatálise, um enorme “pool” de biodiversidade foi encontrado em ecossistemas marinhos que é considerado um reservatório natural rentável para adquirir um inventário de biocatalisadores úteis, pois suas próprias características em habitat, como: tolerância ao sal, hipertermoestabilidade, barofilicidade e adaptabilidade ao frio são apontadas como aspectos importantes do ponto de vista biotecnológico associadas as novas características químicas e estereoquímicas desses biocatalisadores (TRINCONE, 2011).

As actinobactérias marinhas são bem reconhecidas por sua capacidade de produzir produtos naturais valiosos, além de produzir enzimas únicas responsáveis pela biossíntese de produtos naturais. Muitas actinobactérias marinhas também produzem enzimas hidrolíticas que são capazes de degradar vários biopolímeros, como celulose, xilano e quitina. Estas enzimas são importantes para produzir biocombustíveis e bioquímicos de interesse de biomassa renovável por isso é estudado seu uso como biocatalisadores (ZHAO; XU; CHEN, 2016).

3.6 COMBUSTÍVEIS FOSSEIS x BIODIESEL

Atualmente, os combustíveis derivados do petróleo, carvão e gás natural são utilizados como a maior fonte de energia ainda consumida pelo mundo. Os Estados Unidos foram líderes mundiais de comércio de petróleo durante muito tempo, até descobrir-se as reservas do Oriente Médio (CEMIG, 2012).

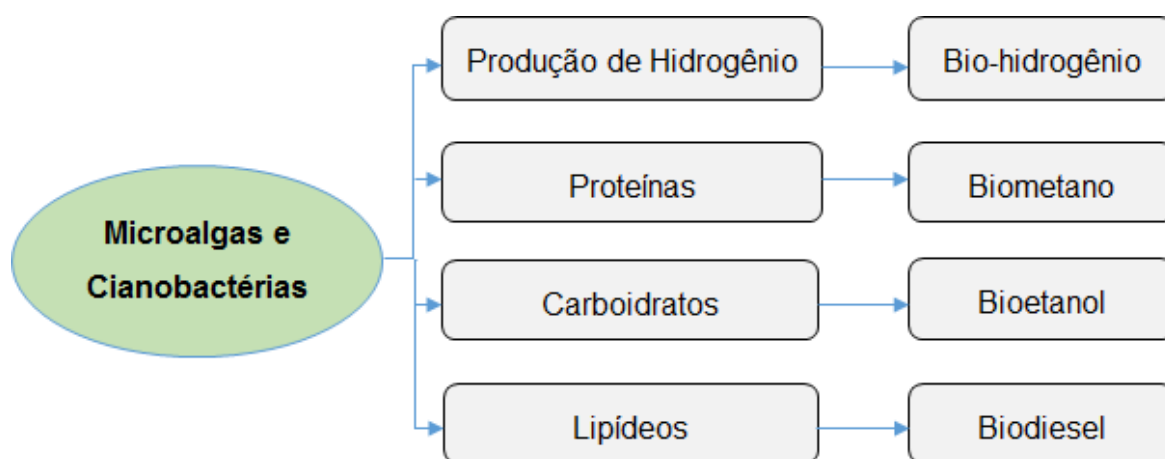
No Brasil, o preço do barril de petróleo foi cotado em R\$ 221,46 em 2013, mais que o dobro da média cotada em 2004 (R\$ 89,21) (ANP, 2014). Contudo, avaliações pessimistas denotam que essas fontes são limitadas e estima-se que num futuro

próximo ocorra o esgotamento (RODOLFI et al., 2009; SMITH et al., 2010), logo é imprescindível a busca por fontes alternativas promissoras que garantam as necessidades energéticas (MUTANDA et al, 2011).

Nesta conjuntura, há uma mobilização internacional e de maneira imparcial entre os setores acadêmicos, industriais, sociais e governamentais com ênfase no desenvolvimento de processos biotecnológicos sobre o tripé de sustentabilidade ambiental, social e econômica, com empenho na diversificação da matriz energética como fonte de energia renovável, ou seja, biocombustíveis (HAKALIN, 2014).

Diante disso, as microalgas e cianobactérias apresentam-se como uma fonte alternativa e que podem gerar diversos tipos de biocombustíveis a partir de seus metabólitos (Figura 8).

Figura 8 – Tipos de biocombustíveis que podem ser produzidos por microalgas e cianobactérias



Fonte: KUMAR; SINGH, 2016.

Os biocombustíveis no Brasil têm se destacado há algum tempo através da utilização de álcool como combustível ou sob a forma de uma mistura de 22 a 25% de álcool na gasolina. Ultimamente, são produzidos 28 bilhões de litros de etanol por ano a partir da fermentação do açúcar da cana-de-açúcar, desse modo, o país entra em uma posição favorável levando em consideração os termos de emissão de CO₂ em relação a outros países (MAPA, 2014).

O biodiesel tem se revelado uma fonte alternativa em substituição ao óleo diesel fóssil, diante disso, diversos fatores influenciam o uso de biodiesel no mundo e no Brasil. Na Europa o principal motivo para a utilização do biodiesel está ligado às

questões ambientais; nos Estados Unidos, às questões estratégicas de garantia de suprimento de combustível em preço e quantidade adequados, e, no Brasil, à questão social (OSAKI; BATALHA, 2011).

No Brasil, o diesel é o combustível mais utilizado, compondo cerca de 57,7% dos combustíveis líquidos. Em 2010, sua produção foi de 45 bilhões de litros, adicionados de 9% importados para suprir a demanda interna. O transporte rodoviário é o setor que mais usa o diesel, representando 75% do total, seguido do uso agropecuário, com 14%, e 5% para geração de energia elétrica nos sistemas isolados. O consumo de óleo diesel e biodiesel por regiões no Brasil é de 37% na região Sudeste, 16% no Sul, 30% no Nordeste, 9% no Centro-Oeste e 8% no Norte (ANP, 2014).

Para a produção de biodiesel, três gerações de matérias primas são amplamente utilizadas, tais como: culturas alimentares, culturas não alimentares e derivados de microalgas, sendo esta a única fonte que pode ser desenvolvida de forma sustentável no futuro (AHMAD et al., 2011).

A Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), por intermédio da lei nº. 11.097 de 13 de janeiro de 2005, definiu biodiesel como: “biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil”.

O biodiesel é um combustível produzido a partir de óleos vegetais ou de gorduras animais. Dezenas de espécies vegetais presentes no Brasil podem ser usadas na produção do biodiesel, entre elas soja, dendê, girassol, babaçu, amendoim, mamona e pinhão-mansão. Entretanto, o óleo vegetal *in natura* é bem diferente do biodiesel, que deve atender à especificação estabelecida pela Resolução ANP nº 7/2008 (ANP, 2014).

Para a produção de biodiesel é importante a escolha da matéria-prima e isso dependerá de alguns critérios como o teor de óleo por área de cultivo; o custo de produção deve ser acessível a tal ponto que o preço do produto final seja equivalente ao diesel de petróleo; o balanço energético da cultura deve ser favorável; os subprodutos da extração do óleo devem ser aproveitados; a cultura deve ser propícia para a região onde ela se encontra e o biodiesel produzido deve atender as especificações dos motores (TEIXEIRA, 2006).

Os óleos encontrados nas microalgas possuem características físico e químicas (grau de insaturação dos ácidos graxos) similares aos dos óleos vegetais e esta vantagem, dentre inúmeras outras, corroboram o apontamento para as microalgas como sendo matérias-primas favoráveis para a produção de biocombustíveis (HALIM et al., 2011). A tabela 4 evidencia as principais diferenças entre as matérias-primas utilizadas para produzir biodiesel.

Tabela 4 – Relação entre o biodiesel produzido de microalgas e cianobactérias com derivados de óleos vegetais

Aspecto	Biodiesel produzido por microalgas e cianobactérias	Biodiesel produzido de óleos vegetais
Tecnologia	Cultivo biológico da célula	Agricultura
Período de produção	5-7 dias por batelada de cultivo	Vários meses ou anos
Conteúdo de óleo	Entre 30-50%	Inferior a 20%
Terra (solo) ocupado para produção	0,010-0,013 hectare para produzir 1×10^3 L de óleo	2,24 hectares para produzir 1×10^3 L de óleo
Potencial de desenvolvimento	Ilimitado	Limitado

Fonte: DA RÓS, 2012.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO

O estudo experimental contou com as amostras de microalgas e cianobactérias que foram coletadas na Lagoa dos Índios (48°76'15"W 00°37'79"N) e na Área de Proteção Ambiental do Curiaú (51°01'10"W 00°12'58"N) ambas na cidade de Macapá-AP, e também com as disponíveis no Laboratório de Cultivo de Algas e Bioprospecção (LACAL) da UNIFAP.

4.2 COLETA, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

Com auxílio de uma rede de fitoplâncton de 20 µm acoplada a um copo coletor de 200 mL, foi realizado o arraste horizontal na superfície da água por inúmeras vezes até a coleta final de espécies de microalgas e cianobactérias. Logo após, as espécies foram cuidadosamente transportadas ao LACAL para análise. O isolamento baseou-se na técnica de diluição da amostra de 1 em 1 mL com água destilada fracionadas em uma lâmina até se observar em microscopia óptica apenas uma célula da espécie na qual foi identificada baseada nos dados descritos na literatura e, posteriormente colocada sob cultivo laboratorial em seus respectivos meios de cultura.

4.3 SOLVENTES E REAGENTES

Solventes: O clorofórmio (CHCl_3) foi adquirido da Vetec®, o hexano (C_6H_{14}) da Synth Brasil e o etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) foi obtido da Dinâmica, ambos apresentando graus de controle de qualidade P.A.

Reagentes: O ácido sulfúrico (H_2SO_4), e o sulfato de sódio (Na_2SO_4) anidro foram adquiridos da Synth Brasil. O nitrato de sódio (NaNO_3), o fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4), o sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), o cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), o ácido cítrico ($\text{HOC}(\text{COOH})(\text{CH}_2\text{COOH})_2$), o citrato de amônio férrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot x\text{Fe}_3 + y\text{NH}_3$), o ácido etilenodiamino tetra-acético disódio dihidratado ($\text{Na}_2 \text{EDTA}$), o ácido bórico (H_3BO_3), o cloreto de manganês tetrahidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), o sulfato de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), o molibdato de sódio dihidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), o sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), o

nitrito de cobalto hexahidratado ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e o carbonato de sódio (Na_2CO_3) foram obtidos da Sigma-Aldrich®. *Enzima*: Lipase de *Candida antarctica* (CALB) – Novozyme 435® (5.000 U) – obtida da Sigma-Aldrich®.

4.4 EQUIPAMENTOS

4.4.1 Espectrometria de Infravermelho – Transformada de Fourier (IV-TF)

Os espectros de Infravermelho foram obtidos por meio do equipamento Espectrômetro de IV-TF, interferômetro típico Michelson.com, acessório refletância total atenuada (ATR), de diamante (Spectrum Two FT, PerkinElmer Inc., Waltham, MA, EUA) com detector de sulfato de triglicina deuterado (DTGS). A faixa espectral de 350 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 0,5 cm^{-1} . Algoritmo Compensação de Vapor Atmosférico (AVC) para corrigir absorção de CO_2 e H_2O . As análises foram realizadas no Laboratório Forense da Polícia Técnico Científica do Estado do Amapá (POLITEC-AP). As amostras sólidas, previamente secas em liofilizador (12h), foram analisadas individualmente no equipamento (aproximadamente 5 mg).

4.4.2 Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

As análises por espectrometria de massas foram realizadas em um aparelho Shimadzu/GC 2010, acoplado a um auto injetor Shimadzu/AOC-5000 e um detector de massas (Shimadzu MS2010 Plus) com impacto de elétrons (70 eV) equipado com uma coluna de sílica fundida RTX-5. Os parâmetros foram: razão de *split* 1:20, hélio como gás de arraste, volume de injeção de 1,0 μL , temperatura do injetor: 250°C, temperatura do detector em 250°C, temperatura inicial da coluna: 50°C, permanecendo por 1 minuto, taxa de aquecimento de 5 °C/minuto até 250°C. O tempo total da análise foi de 45 minutos. A identificação dos ácidos graxos presentes na biomassa foi realizada pela derivatização dos ésteres correspondentes contidos na biblioteca do CG-EM (MS database, NIST 5.0).

4.4.3 outros equipamentos

Foi utilizado um microscópio óptico da marca Nikon modelo E200. A balança analítica utilizada foi da marca Bioprecisa® modelo FA2104N. A mesa agitadora shaker orbital analógica modelo SP-180/A. Evaporador rotativo modelo RV-10. E a estufa da SPLABOR modelo SP-200.

4.5 MICRO-ORGANISMOS

As espécies isoladas neste estudo foram: Cianobactérias: *Limnothrix planctonica*, *Planktolynghya limnetica*, *Pseudanabaena mucicola*, *Spirulina platensis* e *Synechococcus* sp.; Microalgas eucarióticas: *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris*, *Monoraphidium contortum*, *Scenedesmus acuminatus*, *Scenedesmus baculiformes*, *Scenedesmus ecornis*, *Scenedesmus ovalternus*, *Spirogyra communis*.

4.6 MEIO DE CULTIVO E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

O meio de cultura sintético BG-11 (ALLEN, 1968) apresentou na sua composição diferentes sais, conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5 – Composição do meio BG-11

Composição	Estoque (g/L)	Volume/L (mL)	Concentração final (g/L)
NaNO ₃	150	10	1,5
K ₂ HPO ₄	40	1	0,04
MgSO ₄ .7H ₂ O	75	1	0,075
CaCl ₂ .2H ₂ O	36	1	0,036
Ácido cítrico	6	1	0,006
Citrato de amônio férrico	6	1	0,006
Na ₂ EDTA	1	1	0,001
*Micronutrientes	-	1	-
Carbonato de sódio	20	1	0,02

Fonte: ALLEN, 1968.

O meio de cultivo BG-11 foi utilizado para as cianobactérias, pois é um meio rico em nutrientes. Nota-se que na Tabela 5 existe uma composição de micronutrientes que enriquece o meio de cultura BG-11. Esta solução de micronutrientes é descrita detalhadamente na Tabela 6 onde é possível observar a quantidade em g/L de cada substância.

Tabela 6 – *Solução de micronutrientes: BG-11

Micronutrientes	g/L
H₃BO₃	2,86
MnCl₄H₂O	1,81
ZnSO₄.7H₂O	0,222
Na₂MoO₄.2H₂O	0,39
CuSO₄.5H₂O	0,079
Co (NO₃)₂ 6H₂O	0,049

Fonte: ALLEN, 1968.

O fertilizante químico NPK (Nitrogênio, Fósforo e Potássio), também chamado de macronutrientes, foi utilizado principalmente para aumentar a biomassa de espécies de microalgas. Seus nutrientes são descritos na Tabela 7

Tabela 7 – Composição do meio NPK (15:05:05)

Composição	Quantidade
Nitrogênio (N sol. em água)	15% (54g/L)
Fósforo (P ₂ O ₅ sol. em água)	5% (16g/L)
Potássio (K ₂ O sol. em água)	5% (22g/L)

Fonte: BAUMGARTNER et al. (2013) – Adaptado.

As culturas de microalgas e cianobactérias foram submetidas a aeração constante, intensidade luminosa equivalente à 32 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (fotoperíodo de 12 horas) temperatura de 25°C (Figura 9). As culturas ficaram dispostas em frascos do tipo Erlenmeyer com um volume de 2,0 L permanecendo por 30 ou até 60 dias.

Figura 9 – Cultivo laboratorial de espécies de microalgas



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2016.

4.7 EXTRAÇÃO DA BIOMASSA SECA POR LIOFILIZAÇÃO

A biomassa úmida foi decantada em frascos garrafa para cultura celular de 450 mL adquiridos da TPP®, pelo período de 24 horas. Posteriormente, a biomassa úmida residual foi transferida para placas de petri, identificadas e congeladas. Após congelamento total, as amostras foram liofilizadas por 12h (modelo Enterprise I em aço inoxidável AISI 304). A figura 10 ilustra como as placas ficaram após liofilização da biomassa.

Figura 10 – Biomassa liofilizada em placas de petri



Legenda: (A) *Limnotherix* sp.; (B) *Scenedesmus acuminatus*; (C) *Spirulina* sp.

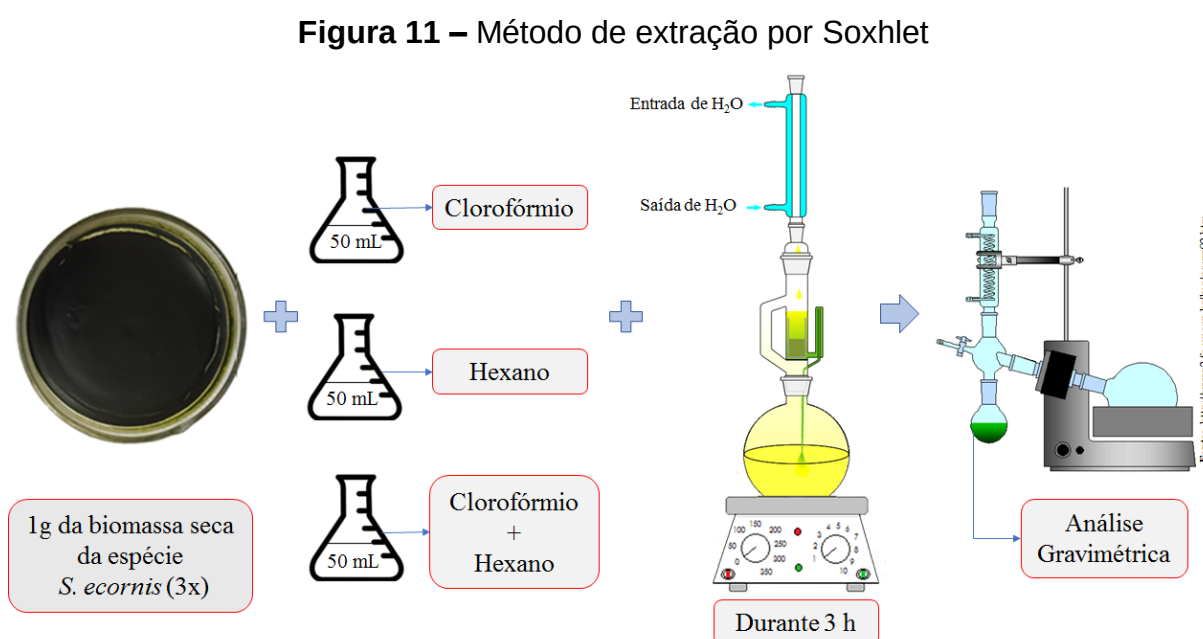
Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2016.

4.8 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

Para a extração de ácidos graxos da biomassa (liofilizada) foram estabelecidos três métodos. A biomassa foi obtida conforme procedimento descrito na seção 4.7. A primeira metodologia foi a extração por Soxhlet utilizando como solventes, clorofórmio, hexano e uma mistura 1:1 destes (descrito na seção 4.8.1). A segunda foi a extração por agitação magnética usando os mesmos solventes da primeira metodologia. E a terceira foi por meio da reação de hidrólise via catálise enzimática (CALB) e via catálise ácida (H_2SO_4) (D'OCA et al., 2011). As metodologias descritas a seguir, foram comparadas entre si, para avaliar a influência do método na extração do perfil de ácidos graxos da microalga *Scenedesmus ecornis*.

4.8.1 Extração por Soxhlet

Para a extração via Soxhlet foi utilizado 1,0 g da biomassa seca da microalga *Scenedesmus ecornis*, transferida para um balão de fundo redondo, contendo 50 mL do respectivo solvente, a mistura foi aquecida e permaneceu em refluxo por 3 h, equivalente a quatro ciclos. Ao final da extração o extrato foi seco com sulfato de sódio (Na_2SO_4) anidro e filtrado, o excesso de solvente foi rotaevaporado e a amostra foi pesada e armazenada para análise gravimétrica (Figura 11).

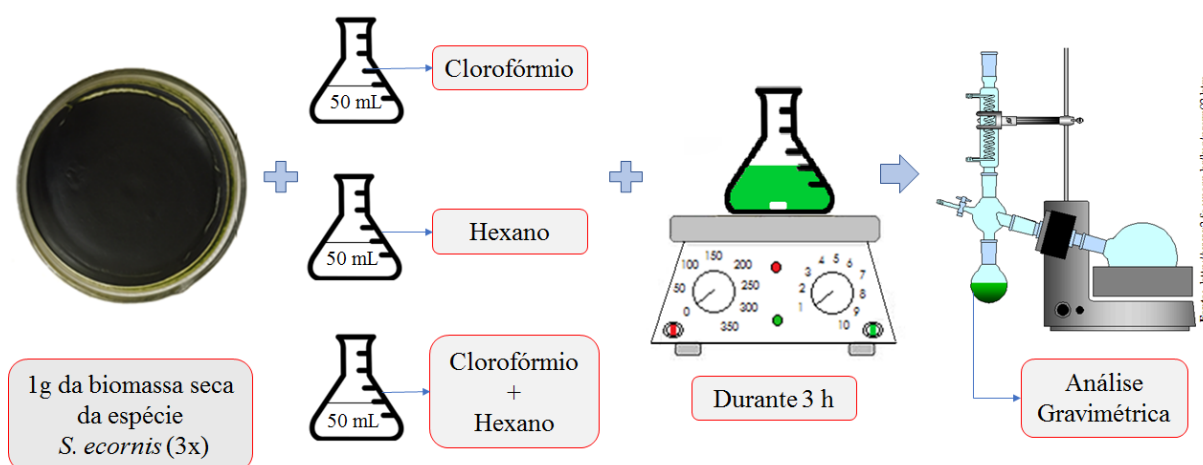


Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2017.

4.8.2 Extração por Agitação Magnética

Nesta etapa, foi utilizado 1,0 g da biomassa seca da microalga *Scenedesmus ecornis*, transferida para um becker de 150 mL, contendo 50 mL do respectivo solvente. A reação foi mantida sob agitação magnética constante (300 rpm) por 3 h. O extrato foi filtrado através de funil de buchner para separar a biomassa seca e lavados com hexano (3 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e filtrada novamente. Por fim, o solvente foi rotaevaporado e a amostra foi pesada e armazenada para ser analisada por gravimetria (Figura 12).

Figura 12 – Método de extração por agitação magnética



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2017.

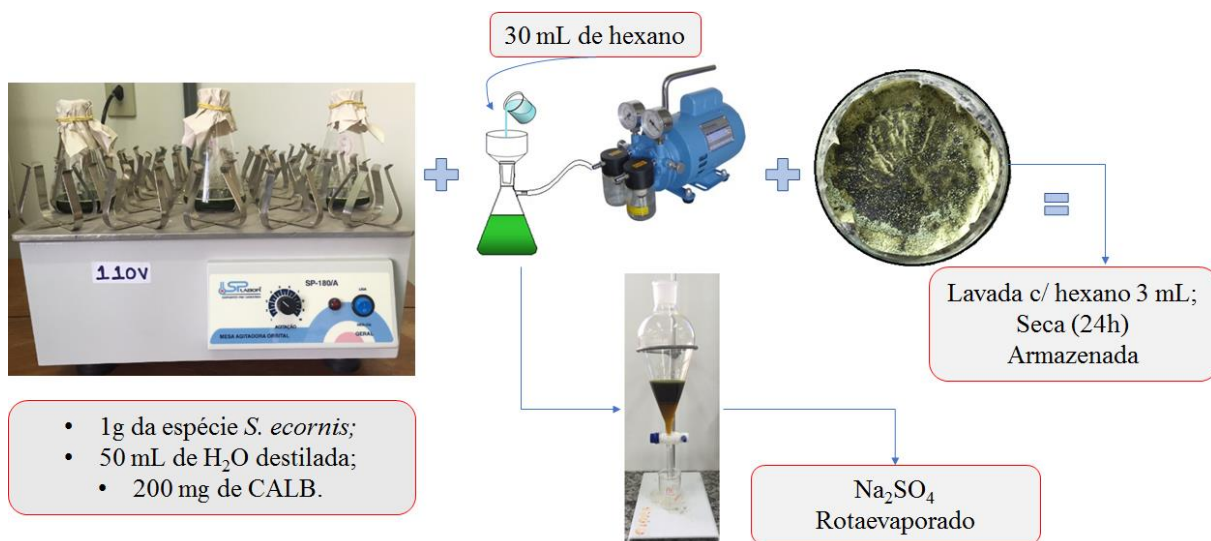
4.8.3 Reação de Hidrólise

4.8.3.1 Via catálise enzimática (CALB)

Neste estudo, utilizou-se 1,0 g da biomassa seca da microalga *Scenedesmus ecornis* para 50 mL de água destilada e 200 mg (20% m/m) de lipase CALB. A reação permaneceu em agitação orbital constante (150 rpm) por 72 h à temperatura de 30°C. Ao final do processo a reação foi filtrada à vácuo e lavada com 30 mL de hexano. A lipase retida no papel de filtro foi lavada com 3 mL de hexano, seca em capela (24 h) e armazenada para posterior reuso. Após a filtração à vácuo da amostra, com o auxílio de um funil de decantação as fases foram separadas, em seguida, adicionou-se

Na_2SO_4 anidro e filtrou-se novamente a amostra, onde o excesso de solvente foi rotaevaporado e o extrato foi pesado e armazenado (Figura 13).

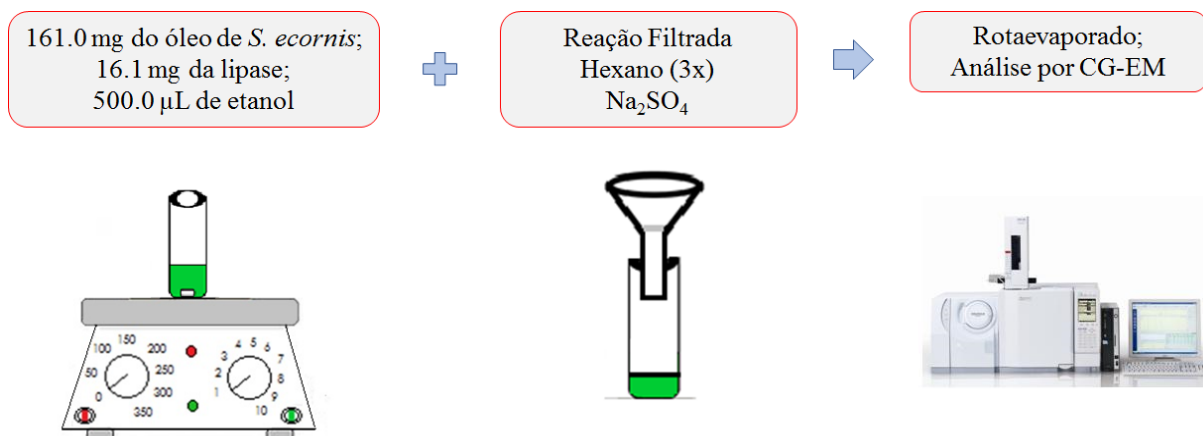
Figura 13 – Método de extração por hidrólise via catálise enzimática



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2017.

Posteriormente, adicionou-se 161,0 mg do óleo extraído da microalga *Scenedesmus ecornis*, 16,1 mg (10% m/m) da lipase CALB e 500,0 μL de etanol P.A. 99,9% em um frasco *vial* (3 mL). A reação foi mantida sob agitação constante por 24 h em agitador orbital (150 rpm) a temperatura de 30°C. Após isso, a reação foi filtrada e lavada com hexano (3 x 1 mL) e seca com Na_2SO_4 anidro. Finalmente, o excesso de solvente foi evaporado e analisou-se o perfil cromatográfico da amostra em CG-EM (Figura 14).

Figura 14 – Reação de transesterificação (1º uso)



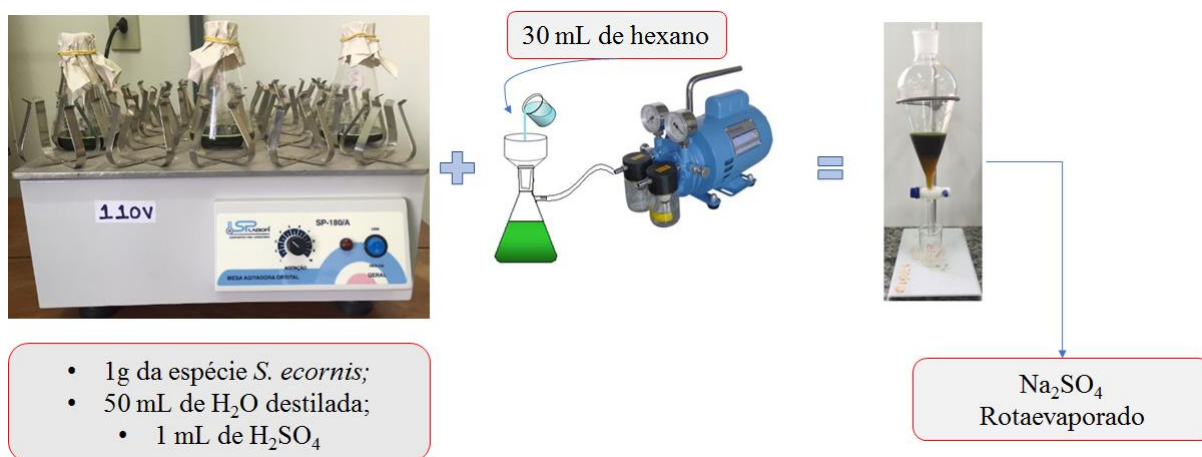
Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2017.

4.8.3.2 Via catálise ácida (H_2SO_4)

Para comparar a eficiência do catalisador durante a reação para a extração de óleo, foi testado também a reação de hidrólise via catálise ácida, onde 1,0 mL (20% m/v) de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), utilizado como agente catalisador, e 1,0 g da biomassa seca da microalga *Scenedesmus ecornis* foram colocados em um frasco Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL de água destilada. A reação permaneceu em agitação orbital constante (150 rpm) por 3 h à temperatura de 30°C.

Posteriormente, a mistura foi filtrada à vácuo e lavada com 30 mL de hexano. Após a filtração à vácuo da amostra com o auxílio de um funil de decantação a reação foi separada em fases orgânica e inorgânica. A fração orgânica foi extraída com hexano (3x 30 mL) em seguida, adicionou-se Na_2SO_4 anidro com o intuito de retirar moléculas de água remanescentes da fase orgânica e, filtrou-se novamente a amostra, onde mais tarde o excesso de solvente foi rotaevaporado e o extrato foi pesado e armazenado (Figura 15).

Figura 15 – Método de extração por hidrólise via catálise ácida



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2017.

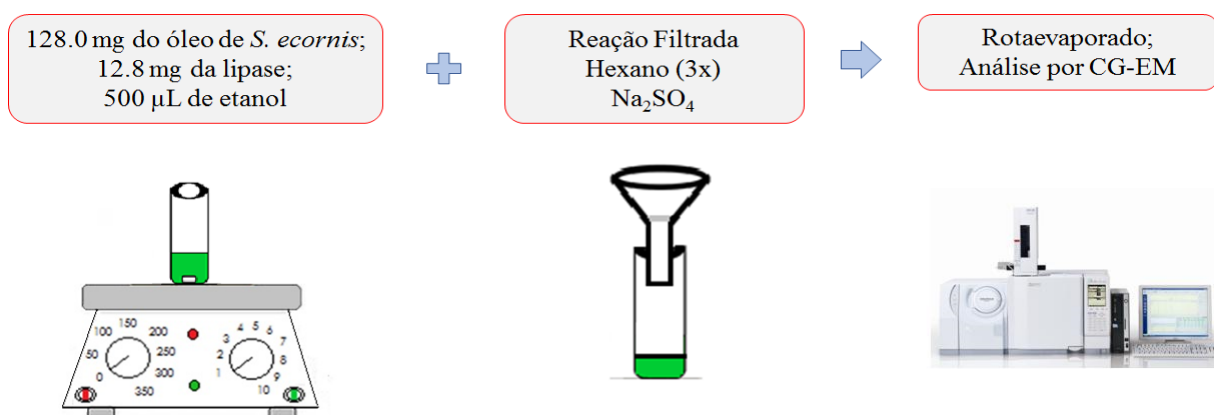
4.9 REAÇÃO DE REUSO DO BIOCATALISADOR (CALB)

Nesta etapa, foi realizado o ensaio para verificar o grau de estabilidade da lipase CALB. O procedimento seguiu inicialmente o mesmo método descrito na seção 4.8.3. Contudo, os valores de extração de óleo foram diferentes para realizar a etapa subsequente (reação de transesterificação), conforme exposto abaixo.

4.9.1 Reação de Transesterificação Via Catálise Enzimática (CALB) – REUSO

Adicionou-se 128,0 mg do óleo extraído da espécie *Scenedesmus ecornis*, 12,8 mg (10% m/m) da lipase CALB e 500,0 µL de etanol P.A. 99,9% em um frasco *vial* (3 mL). A reação foi mantida sob agitação constante por 24 h em agitador orbital (150 rpm) a temperatura de 30°C. Em seguida, a reação foi filtrada e lavada com hexano (3 x 1 mL) e seca com Na₂SO₄ anidro. Por fim, o excesso de solvente foi evaporado e analisou-se o perfil cromatográfico da amostra em CG-EM (Figura 16).

Figura 16 – Reação de transesterificação (Reuso)



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2017.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi feita através de ANOVA *two-way* para investigar os efeitos dos solventes (clorofórmio, hexano e uma mistura de clorofórmio + hexano) na extração por Soxhlet e agitação magnética. ANOVA *one-way* foi utilizado para mostrar as diferenças significativas entre os ésteres etílicos de ácidos graxos (EEAG) extraídos por ambos os métodos e os demais citados acima. O teste Posteriori de Tukey foi usado para analisar as diferenças significativas das médias por meio do *software* R Core Team versão 3.3.2 (2016).

4.11 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo dispensou a submissão a análise por Comitê de Ética em Pesquisa uma vez que não utilizou seres humanos e/ou animais para sua realização.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As microalgas apresentam-se de modo geral como micro-organismos que possuem a capacidade de tolerar condições adversas (iluminação, salinidade, pH, temperatura e até limitação de nutrientes) para manter seu ritmo de crescimento sob controle. Essa característica peculiar influencia a quantidade e os tipos de metabólitos armazenados em suas células.

Condições desfavoráveis (limitação de nitrogênio) no cultivo do gênero *Chlorella*, podem aumentar sua biomassa e conseqüentemente, sua produtividade de substâncias agregando maior valor no seu conteúdo lipídico seguido pela produção de óleo. Contudo, a necessidade de conhecimento sobre a fisiologia e a autoecologia da espécie é imprescindível para iniciar o cultivo em escala comercial (MARTINS; FERNANDES, 2016).

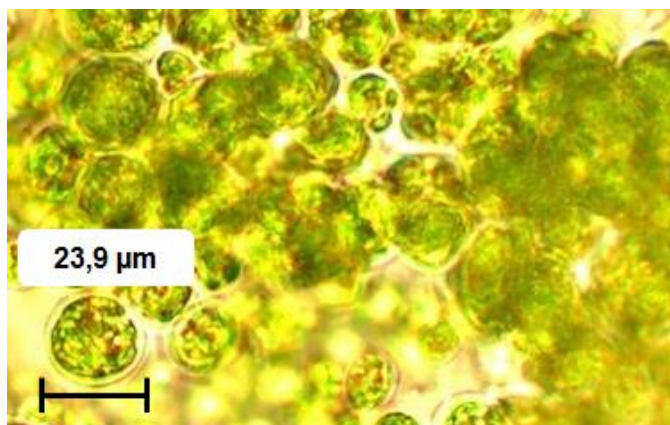
A eficiência destes micro-organismos para adaptarem-se as variações físicas e químicas permite otimizar as condições de cultivo (FERREIRA; SANT'ANNA, 2017). Assim, foram identificadas quatorze espécies dentre microalgas eucarióticas e cianobactérias presentes na região Amazônica da cidade de Macapá-AP, ambas cultivadas em meio BG-11 (rico em nutrientes) e/ou NPK (com macronutrientes essenciais) apresentando dimensões celulares e morfologia típica semelhantes ao relatado por Bicudo e Menezes (2006).

5.1 MORFOLOGIA DAS MICROALGAS E CIANOBACTÉRIAS

5.1.1 *Chlamydomonas reinhardtii* P. A. Dangeard.

A morfologia celular das espécies de microalgas é dependente das condições de cultivo as quais foram submetidas durante o seu crescimento. As células de *Chlamydomonas reinhardtii* observadas na objetiva de 40x apresentaram diâmetro medindo em torno de 15- 24 μm (Figura 17), esféricas, destacando-se algumas como sendo ovóides e/ ou arredondadas similar as células relatadas por Mendes et al. (2012).

Figura 17 – Células de *Chlamydomonas reinhardtii*



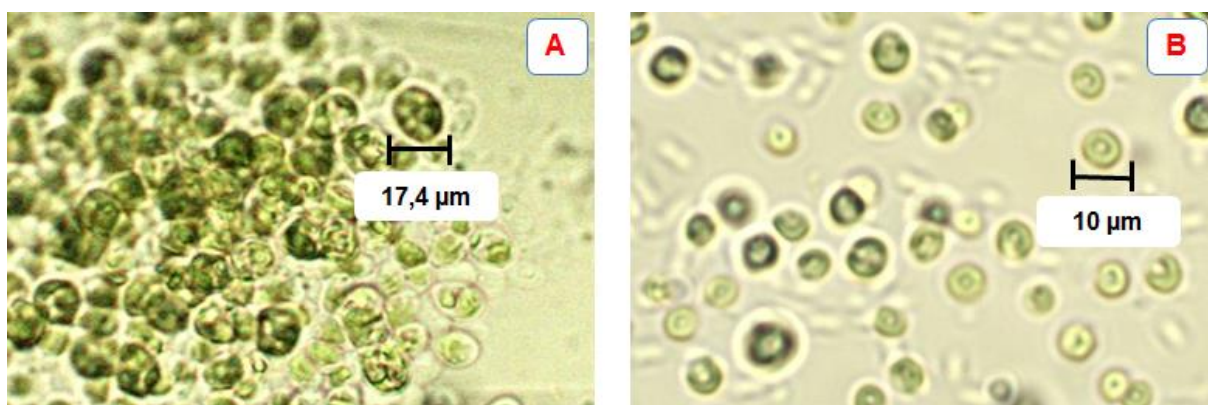
Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2016.

As células de *Chlamydomonas reinhardtii* são monadóides e mostram-se, em vista frontal (taxonômica), grande diversidade de formas, das quais a elipsóide e a ovoide são as mais comuns. Os dois flagelos apresentam tamanhos iguais entre si, são homodinâmicos e se inserem apicalmente no polo anterior da célula (BICUDO; MENEZES, 2006).

5.1.2 *Chlorella pyrenoidosa* H. Chick e *Chlorella vulgaris* Beyerinck (Beijerinck)

Tanto *Chlorella pyrenoidosa* quanto *Chlorella vulgaris* foram cultivadas em meio NPK, suas medidas foram, 15 a 18 µm (*C. pyrenoidosa*) e de 10 a 14 µm (*C. vulgaris*) (Figura 18), tendo como principal característica o crescimento rápido e a tolerância às condições de cultivo (LI et al., 2016).

Figura 18 – Células de *Chlorella* spp.



Legenda: (A) *Chlorella pyrenoidosa*; (B) *Chlorella vulgaris* (Objetiva 40x).

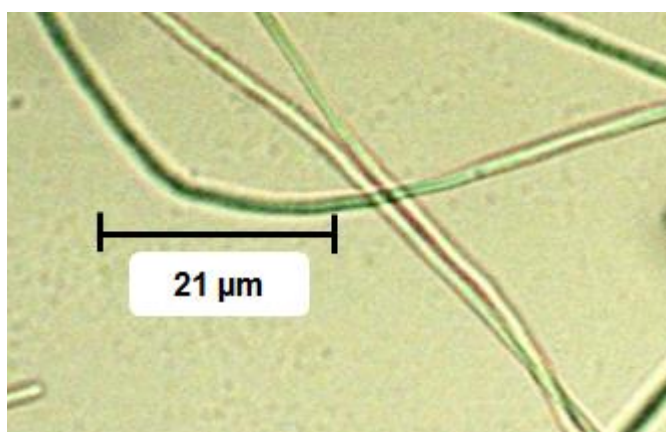
Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Suas células são esféricas, elipsoidal ou ovoide, mas também podem ser reniformes ou um pouco assimétricas com o cloroplasto em forma de taça. A parede celular é bem distinta, porém, delgada (BICUDO; MENEZES, 2006; LEE, 2008).

5.1.3 *Limnothrix planctonica* (Woloszynska) Meffert

A *Limnothrix planctonica* é conhecida por sua rápida taxa de crescimento e por apresentar um biofilme resistente (SFRISO et al., 2014). Neste estudo, os filamentos exibiram o tamanho de até 120 µm de comprimento (Figura 19) após ficarem em cultivo por até 60 dias. A abundância de filamentos ligados entre si, a largura, o comprimento e o número de células, ajudam a monitorar o grau de toxicidade desta espécie (GANDOLA et al., 2016).

Figura 19 – Células de *Limnothrix planctonica*



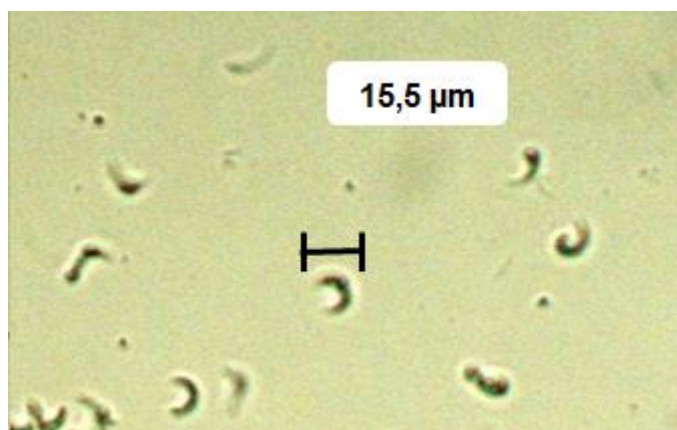
Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Limnothrix planctonica é um gênero tipicamente planctônico e, geralmente, ocorre em regiões temperadas. Possui tricomas normalmente solitários, móveis, ondulados, septos não constritos, inconspícuos. Ápices não atenuados. As células são quase sempre mais longas do que largas, porém, às vezes, são isodiamétricas. O conteúdo celular é verde-azulado, castanho ou avermelhado e apresenta aerótopos localizados no ápice. Célula apical cilíndrico-arredondada (BICUDO; MENEZES, 2006; NOGUEIRA; GAMA JÚNIOR; D'ALESSANDRO, 2011).

5.1.4 *Monoraphidium contortum* (Thuret) Komárková-Legnerová

As células de *Monoraphidium contortum* apresentam-se sob tamanho de 10 até 15,5 μm (Figura 20) irregularmente curvadas e solitárias, similar as estudadas por Ramos et al. (2012) onde as dimensões celulares de *Monoraphidium contortum* variam de 7,5 a 12,0 μm de comprimento.

Figura 20 – Células de *Monoraphidium contortum*



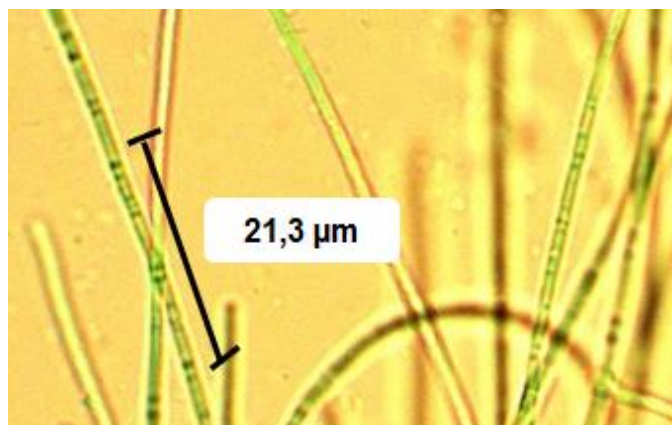
Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2016.

O gênero *Monoraphidium* possui células em geral solitárias, raramente reunidas por curto intervalo de tempo em pares ou tétrades resultantes do processo de reprodução. As células são mais ou menos fusiformes, às vezes cilíndricas, podendo ser muitas vezes mais longas que o próprio diâmetro e também se apresentam tanto retas quanto encurvadas ou até sigmoides (BICUDO; MENEZES, 2006).

5.1.5 *Planktolyngbya limnetica*

A dimensão celular de *Planktolyngbya limnetica* observada sob microscopia optica foi de até 150 μm de comprimento (Figura 21). *Planktolyngbya limnetica* foi descrita contendo de 2 a 3 μm de comprimento e com septos não granulados (SANT'ANNA et al., 2007).

Figura 21 – Células de *Planktolyngbya limnetica*



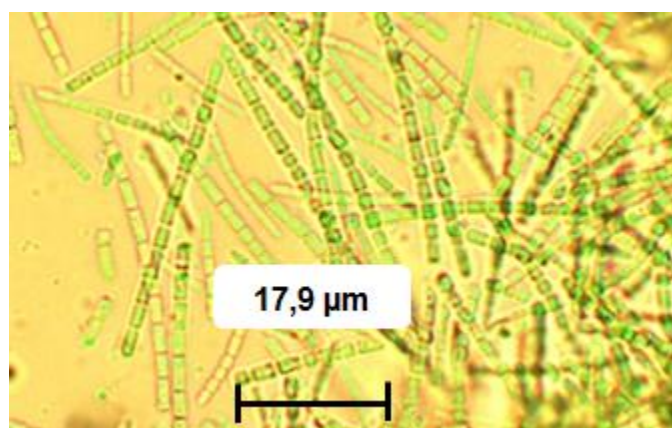
Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Planktolyngbya é um gênero tipicamente planctônico, comum em áreas tropicais e subtropicais. Suas células são, normalmente, mais longas do que largas, cilíndricas e, raramente, isodiamétricas. Filamentosas, filamentos solitários, com bainhas incolores finas (KOMÁREK; KOMÁRKOVA-LEGNEROVA, 2002; BICUDO; MENEZES, 2006; MIRANDA, 2016).

5.1.6 *Pseudanabaena mucicola* (Naumann & Huber-Pestalozzi) Schwabe

A cianobactéria filamentosa *Pseudanabaena mucicola* (Figura 22) apresenta cerca de 16,4 até 24,9 μm de comprimento. Mishra et al. (2012) observaram em seus estudos que a mesma tinha 1 μm de largura. Além disso, são caracterizadas por tricomas (estreitos aproximadamente 0,5 a 3 μm de largura) que se quebram em fragmentos.

Figura 22 – Células de *Pseudanabaena mucicola*



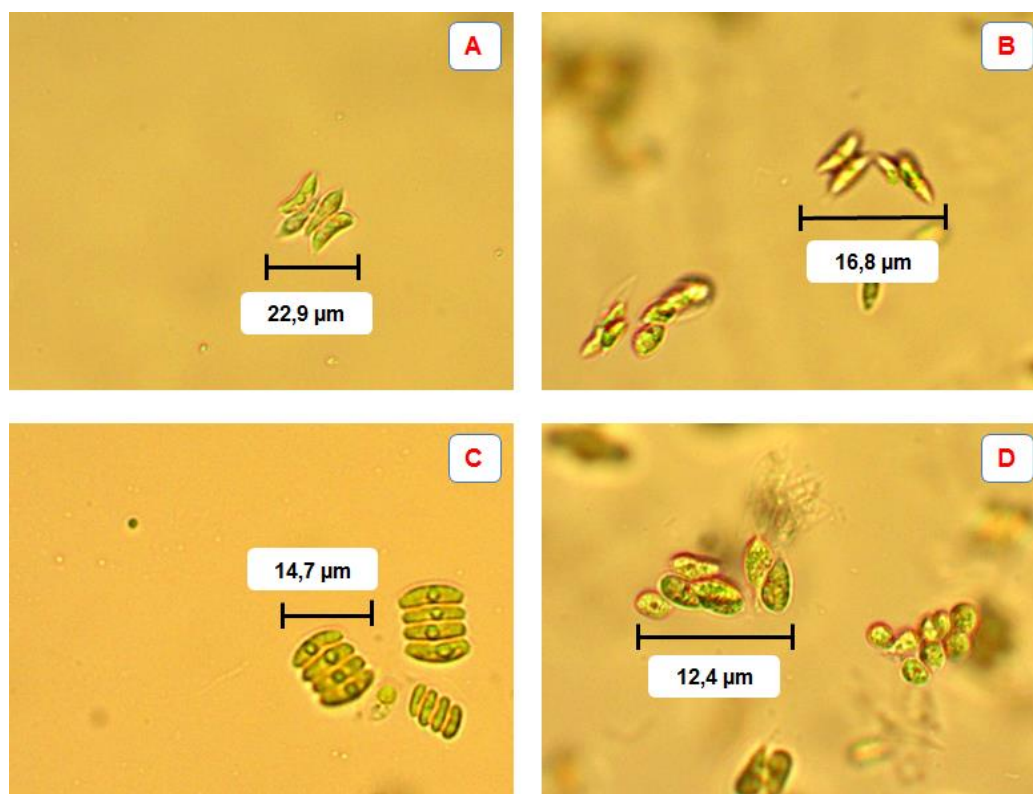
Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Este gênero ocorre predominantemente em ambientes aquáticos eutrofizados. Algumas de suas espécies são cosmopolitas e encontradas comumente em comunidades planctônicas, perifíticas ou bentônicas. São caracterizadas por apresentar tricomas solitários ou, mais raramente, podem formar pequenos emaranhados. São retos ou flexuosos. As células são normalmente mais longas do que largas, cilíndricas ou, mais raramente, em forma de barril. (BICUDO; MENEZES, 2006; GARCIA, 2014).

5.1.7 *Scenedesmus* Meyen

Scenedesmus (Figura 23) varia em tamanho celular de acordo com a espécie, geralmente apresentam-se sob dimensões entre 2 μm a 36 μm de comprimento (ROSINI; SANT'ANNA; TUCCI, 2013).

Figura 23 – Células de *Scenedesmus* spp.



Legenda: (A) *Scenedesmus acuminatus*; (B) *Scenedesmus baculiformes*; (C) *Scenedesmus ecornis*; (D) *Scenedesmus ovalternus* (Objetiva 40x).

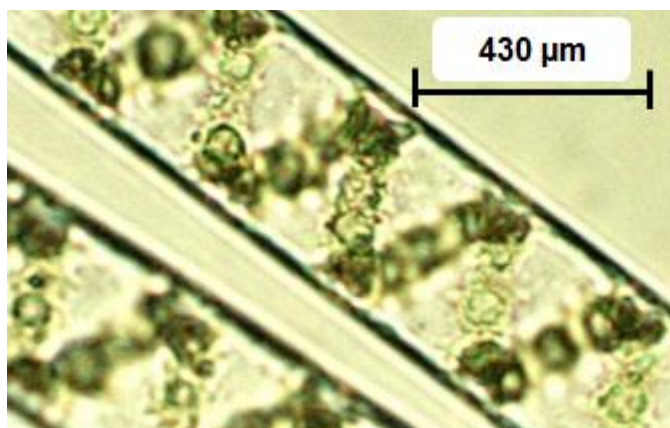
Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2016.

O gênero *Scenedesmus* é de grande importância na caracterização de ambientes eutróficos sendo considerado o mais comum e cosmopolita entre o grupo de algas verdes. Sua colônia sempre plana é formada por 2 ou 4 células, porém podem apresentar 8, 16 ou 32 e, raramente, são unicelulares. As células podem ser elipsoides, ovóides, fusiformes ou lunadas podendo ser todas iguais ou as externas serem de uma forma e as internas de outra (BICUDO; MENEZES, 2006).

5.1.8 *Spirogyra communis* (Hassall) Kützing

O comprimento celular de *Spirogyra communis* pode variar entre 20 a 500 μm de comprimento e 20-35 μm de largura (LEE; CHANG, 2011). Neste estudo, as células de *Spirogyra communis* mediram em torno de 430 μm de comprimento (Figura 24).

Figura 24 – Células de *Spirogyra communis*



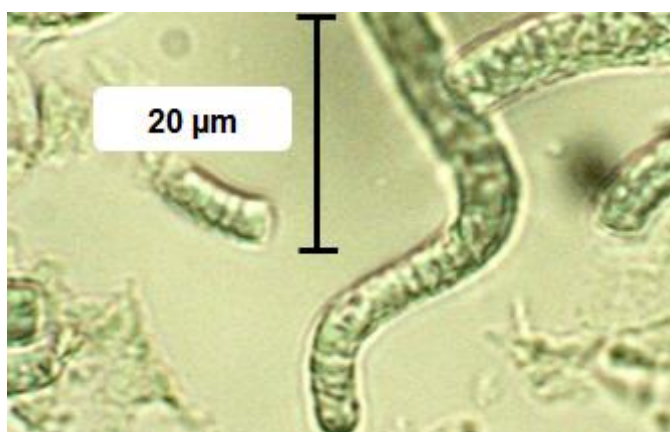
Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Com distribuição cosmopolita, os filamentos de *Spirogyra* são normalmente livre-flutuantes, porém alguns podem ser fixos ao substrato. Os filamentos são unisseriados, simples e constituídos por células cilíndricas, em geral até 30 vezes mais longas que largas, raras vezes as células são mais largas que longas (BICUDO; MENEZES, 2006).

5.1.9 *Spirulina platensis* (Gomont) Geitler

A morfologia das algas permite identificar culturas puras. O caso de *Spirulina platensis* não é diferente, pois através de microscopia óptica é possível observar diferenças significativas na sua forma, comprimento e diâmetro das hélices. Na figura 25, o comprimento celular foi de 20 μm podendo chegar até em mais de 100 μm quando mais espiralada.

Figura 25 – Células de *Spirulina platensis*



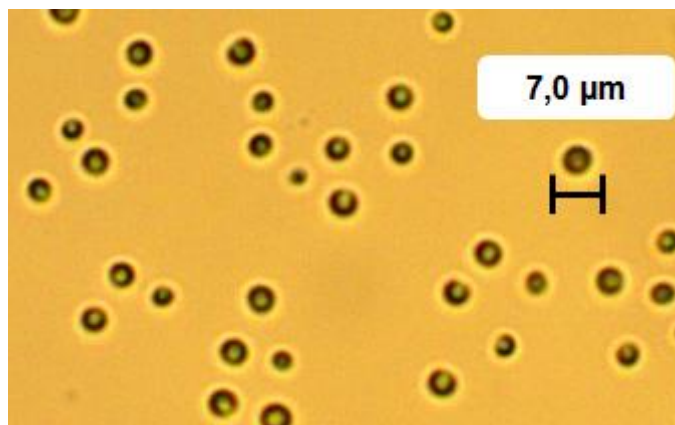
Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Pertencente a Divisão Cyanobacteria, o gênero *Spirulina* é comum de ambientes perifíticos e bentônicos. Apresenta-se regularmente espiralada (espiras bem condensadas ou mais frouxamente agregadas), não constritos a nível de septo e não atenuados para as extremidades. Seus tricomas são solitários ou podem formar pequenos agregados com intenso movimento. O conteúdo celular é verde azulado, castanho ou avermelhado, em geral homogêneo e não apresenta aerótopos (BICUDO; MENEZES, 2006).

5.1.10 *Synechococcus* sp.

As células da cianobactéria *Synechococcus* sp. mediram em torno de 7,0 μm (figura 26) de comprimento. Suas aplicações variam, contudo, as últimas pesquisas têm sido voltadas para a produção de metabolitos de interesse industrial como biocombustíveis (TRIANA et al., 2014).

Figura 26 – Células de *Synechococcus* sp.



Fonte: PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Synechococcus é um gênero unicelular e ocorre, principalmente, no plâncton, no metafítton e sobre pedras. As células são de cilíndricas a longo-cilíndricas, algumas vezes arcuadas ou sigmoides (BICUDO; MENEZES, 2006).

De modo geral, as microalgas e/ou cianobactérias podem variar suas dimensões conforme a vários fatores em que são expostas. Condições de estresse, por exemplo, podem modificar sua conformação tanto no ambiente natural quanto em laboratório.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DE MICROALGAS E CIANOACTÉRIAS POR ESPECTROMETRIA DE INFRAVERMELHO – TRANSFORMADA DE FOURIER (IV-TF)

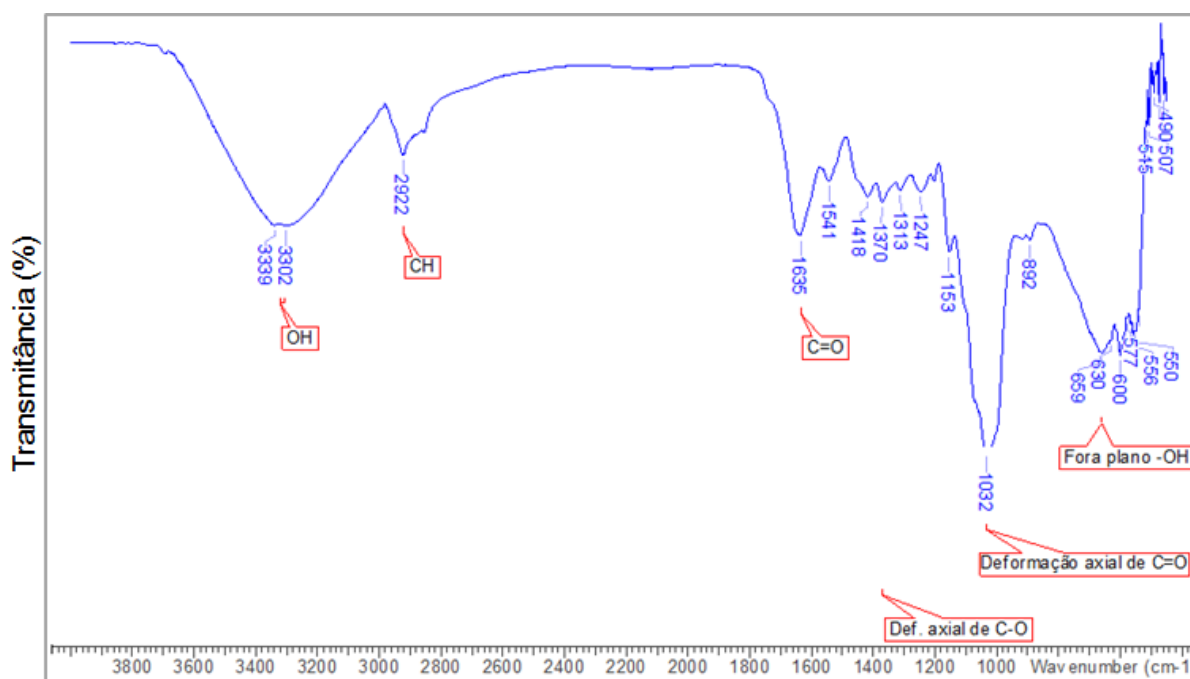
A radiação infravermelha corresponde aproximadamente à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das micro-ondas. As bandas de vibração rotacional entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} são as mais utilizadas. A espectrometria por transformada de Fourier apresenta como principal vantagem o ganho de tempo durante as análises, pois não são usados monocromadores (dispositivo que transmite uma faixa estreita de comprimentos de onda – uma cor) (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012).

Os picos ou bandas no espectro de IV-TF ocorrem pela vibração das ligações dos grupos funcionais presentes na amostra analisada. Assim, foram selecionadas as principais bandas de cada espectro de microalga e cianobactéria para identificar os grupos existentes.

5.2.1 IV-TF da espécie *Chlamydomonas reinhardtii*

O espectro de IV-TF da biomassa seca de *Chlamydomonas reinhardtii* (Figura 27) apresentou um sinal forte e intenso correspondente a deformação axial da ligação de hidroxila (-OH) na banda 3302 cm^{-1} , característico normalmente de ácidos. O sinal em 2922 cm^{-1} é condizente a deformação axial assimétrica da ligação de carbono - CH_2 . Também apresentou um sinal em 1635 cm^{-1} correspondente a ligação $\text{C}=\text{O}$ podendo significar a presença de proteínas na amostra (STEHFEST; TOEPEL; WILHELM, 2005). Além disso, outro sinal característico foi em 1370 cm^{-1} relativo a deformação axial da ligação $\text{C}-\text{O}$; em 1032 cm^{-1} deformação axial da ligação de $\text{C}=\text{O}$ e em 630 cm^{-1} deformação angular fora do plano da ligação de -OH.

Figura 27 – Espectro de IV-TF da espécie *Chlamydomonas reinhardtii*



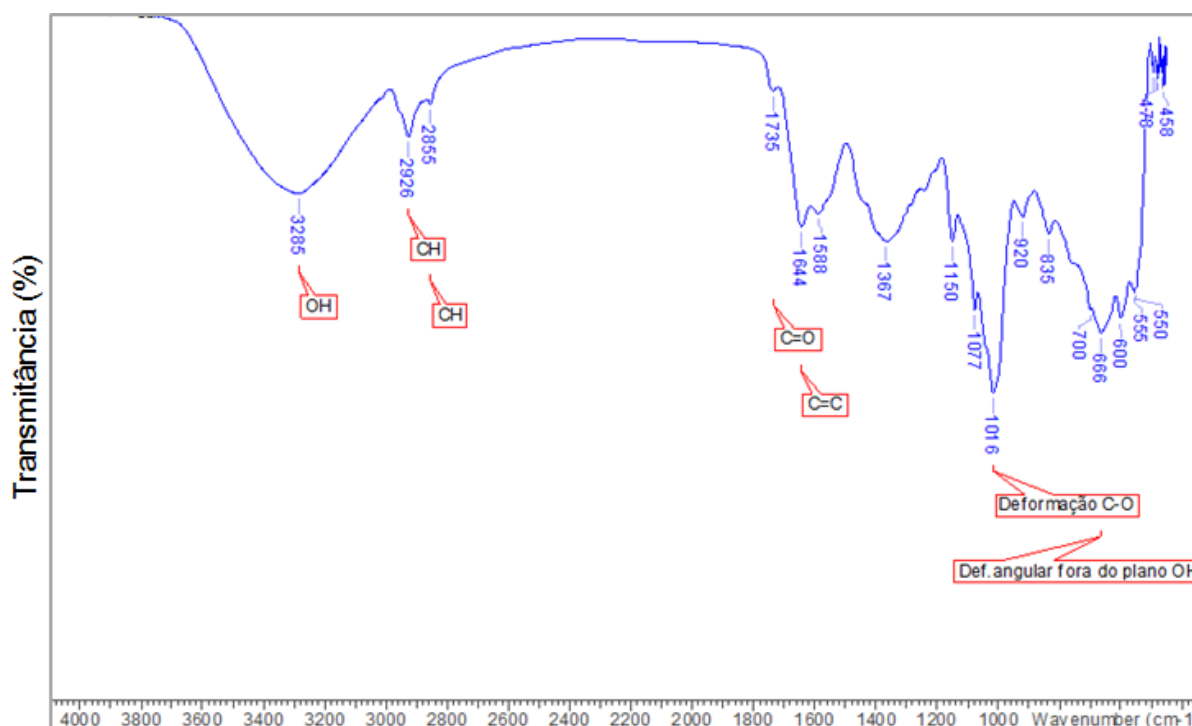
Dean et al. (2010), usaram o IV-TF para investigar os efeitos da limitação de nitrogênio em *Chlamydomonas reinhardtii* em diferentes fases de cultivo. Diante disso, observaram que em 28 dias de cultivo com alta concentração de nitrogênio o espectro de IV-TF apresentou em 1655 cm^{-1} deformação axial da ligação de $\text{C}-\text{O}$ e em 1380 cm^{-1} deformação axial da ligação $\text{C}-\text{O}$ de grupos COO^- . Dois sinais foram de interesse particular, o sinal em 1740 cm^{-1} que foi associado a deformação axial da ligação $\text{C}=\text{O}$

de grupos ésteres, característico de lipídeos e ácidos graxos; e a região entre 1200-950 cm^{-1} associada a deformação angular fora do plano de C-O-C.

5.2.2 IV-TF das espécies *Chlorella pyrenoidosa* e *Chlorella vulgaris*

O espectro de IV-TF de *Chlorella pyrenoidosa* (figura 28) apresentou um sinal característico da ligação de -OH em 3285 cm^{-1} . Xu et al. (2014) atribuem os sinais entre 2926-2855 cm^{-1} como estiramento do grupo metileno -CH₂-. E ainda, em 1635 cm^{-1} se observou a deformação axial da ligação de C=O correspondente a ésteres alifáticos; o sinal em 1016 cm^{-1} é peculiar da deformação axial da ligação de C-O e em 666 cm^{-1} deformação angular fora do plano da ligação de -OH.

Figura 28 – Espectro de IV-TF da espécie *Chlorella pyrenoidosa*



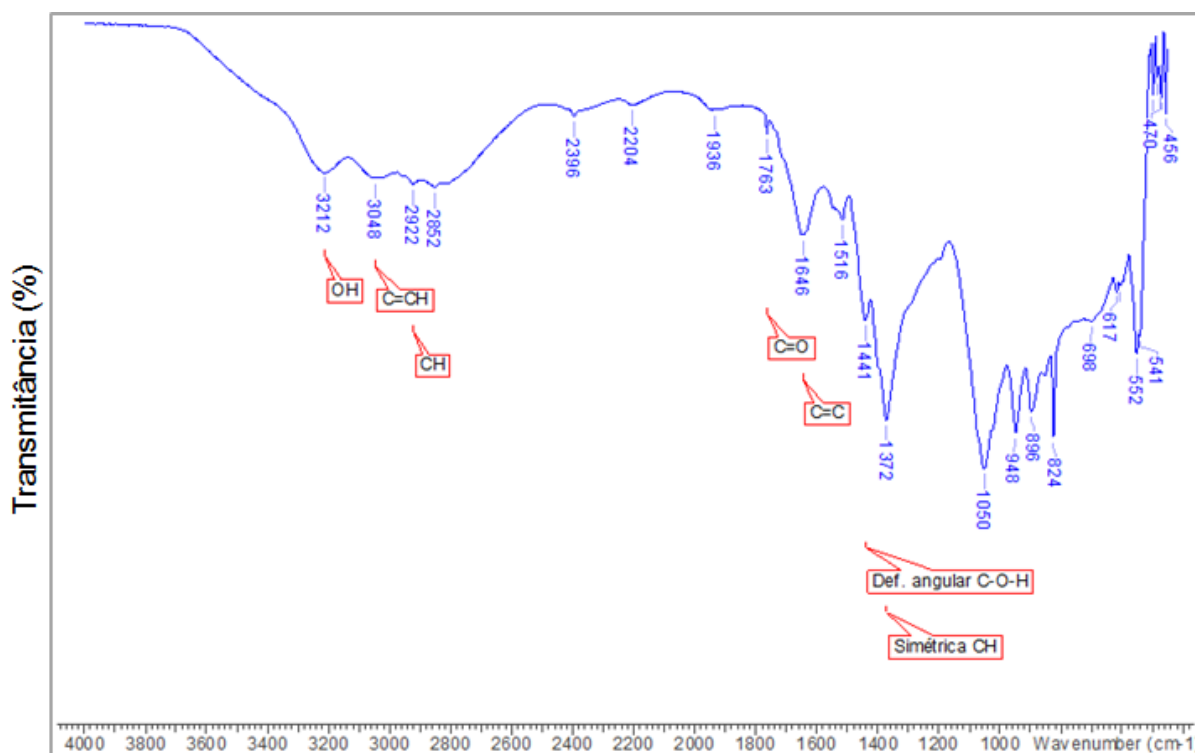
De acordo com Liu et al. (2017), as principais bandas encontradas no espectro de IV-TF de *Chlorella pyrenoidosa* apresentam-se entre 3277-1014 cm^{-1} , sendo o sinal 3277 cm^{-1} característico de deformação axial da ligação de -OH; em 2926 cm^{-1} corresponde a deformação axial assimétrica da ligação de carbono -CH₂; em 1742 deformação axial de C=O de ésteres – sugestivo de ácidos graxos – e um sinal em 1014 cm^{-1} relativo a vibração de deformação axial da ligação de C-O.

No espectro de IV-TF de *Chlorella vulgaris* (figura 29) também foi observado em 3212 cm^{-1} deformação axial da ligação de -OH, normalmente sendo descrito na literatura pela presença de água ou proteínas (MURDOCK; WETZEL, 2009); em 3048 cm^{-1} deformação axial da ligação de -CH que está dentro da banda que indica a presença da cadeia alquímica; em 1763 cm^{-1} deformação axial da ligação de C=O; em 1646 cm^{-1} deformação axial da ligação C=C e em 1441 cm^{-1} deformação angular da ligação de C-O-H.

Segundo Duygu et al. (2012), cada pico no espectro de infravermelho significa vibração ou estiramento de uma ligação de um grupo funcional. Em sua pesquisa definiu que a banda equivalente a 1649 cm^{-1} de *Chlorella vulgaris* é característico de proteínas. As bandas de carboidratos são definidas como fortes vibrações da ligação C-H em 2928 cm^{-1} . E o sinal em 1747 cm^{-1} é caracterizado por deformação axial de C=O frequentemente associado a ácidos graxos.

Vale ressaltar, a similaridade de sinais que sugerem a presença de moléculas derivadas de ácidos carboxílicos e/ou ésteres nos espectros tanto de *Chlorella pyrenoidosa* quanto *Chlorella vulgaris* denotando que ambas possuem aptidão para armazenar essas substâncias em suas células.

Figura 29 – Espectro de IV-TF da espécie *Chlorella vulgaris*.

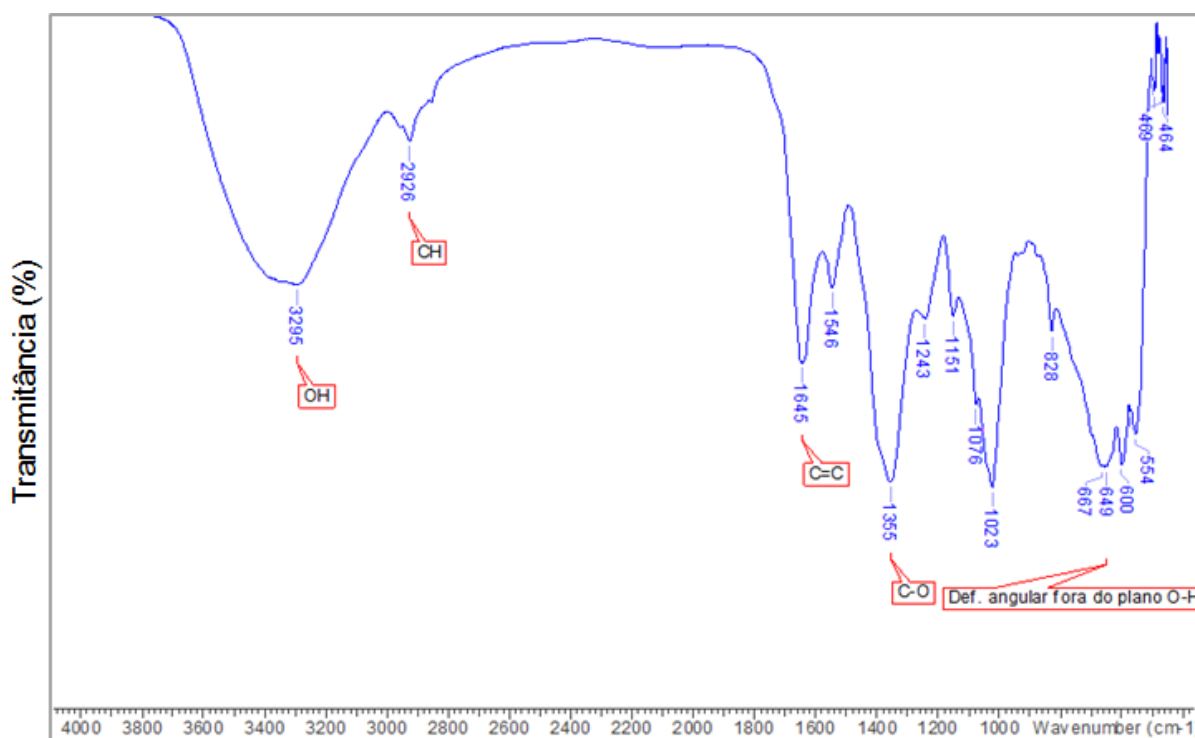


5.2.3 IV-TF da espécie *Limnothrix planctonica*

Na análise do espectro de IV-TF da biomassa seca de *Limnothrix planctonica* (figura 30) se observou um sinal em 3295 cm^{-1} referente a deformação axial da ligação de -OH; em 2926 cm^{-1} estiramento da ligação -CH; em 1645 cm^{-1} corresponde a ligação alqueno não conjugado C=C e em 1355 cm^{-1} relativo a deformação axial da ligação C-O (dímero).

Khattar et al. (2010) realizaram a análise de IV-TF de exopolissacarídeos da cianobactéria *Limnothrix redekei* que indicou a presença de grupos carboxila e carbonila pertencentes a um tipo de polissacarídeo polianiónico.

Figura 30 – Espectro de IV-TF da espécie *Limnothrix planctonica*



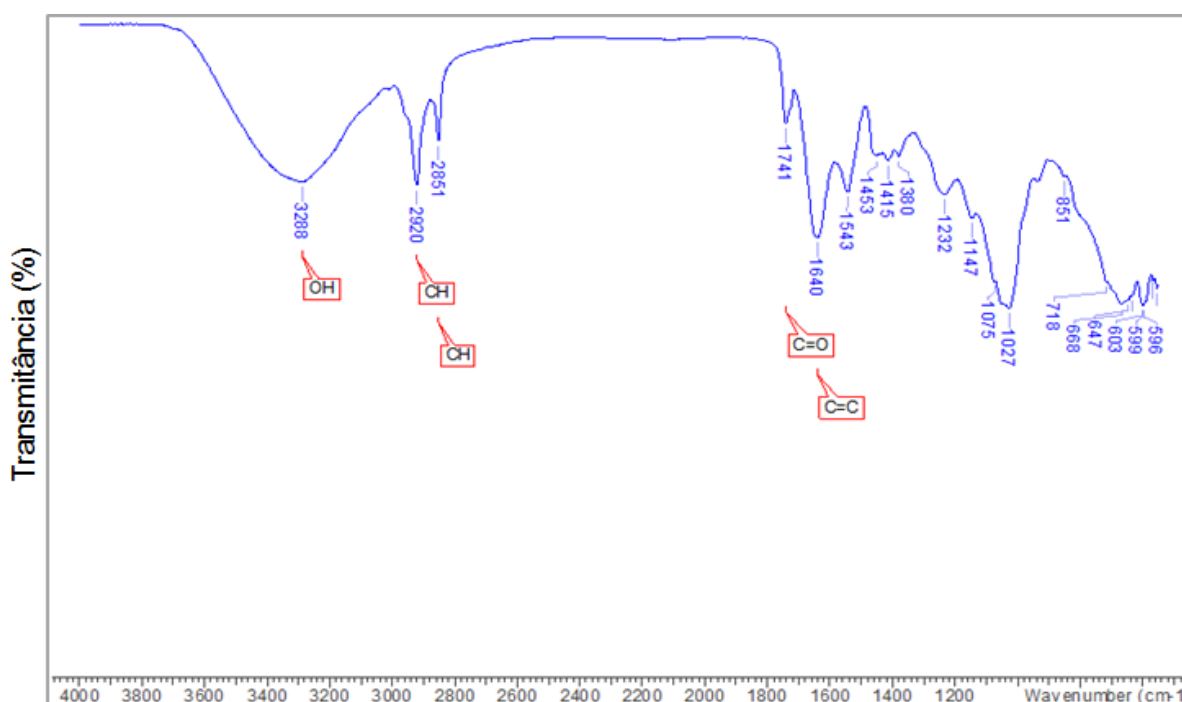
5.2.4 IV-TF da espécie *Monoraphidium contortum*

Em sua análise, *Monoraphidium contortum* apresentou o espectro de IV-TF (figura 31) correspondente a uma vibração forte em 3288 cm^{-1} relativa a deformação da ligação de -OH; também exibiu um sinal em 2920 cm^{-1} relacionado a deformação axial de carbono sp^3 da ligação -CH; em 1640 cm^{-1} deformação alqueno não conjugado da ligação C=C e em 1415 cm^{-1} deformação angular fora do plano de C-O-

H. Além disso, apresentou um sinal vibracional em 1741 cm^{-1} característico de deformação axial da ligação C=O podendo sugerir a presença de ésteres corroborando com o estudo realizado por Xia, Li e Song (2016), onde o espectro de IV-TF de *Monoraphidium dybowskii* apresentou um sinal forte em 1736 cm^{-1} correspondente a deformação axial da ligação C=O relativa a ésteres alifáticos.

Ácidos graxos, triacilglicerídeos (material majoritário) e pigmentos (carotenoides e clorofila) foram os compostos encontrados nas análises de UV-Vis e IV-TF feitas por Gomes (2013) sob o material lipídico extraído de *Monoraphidium* sp.

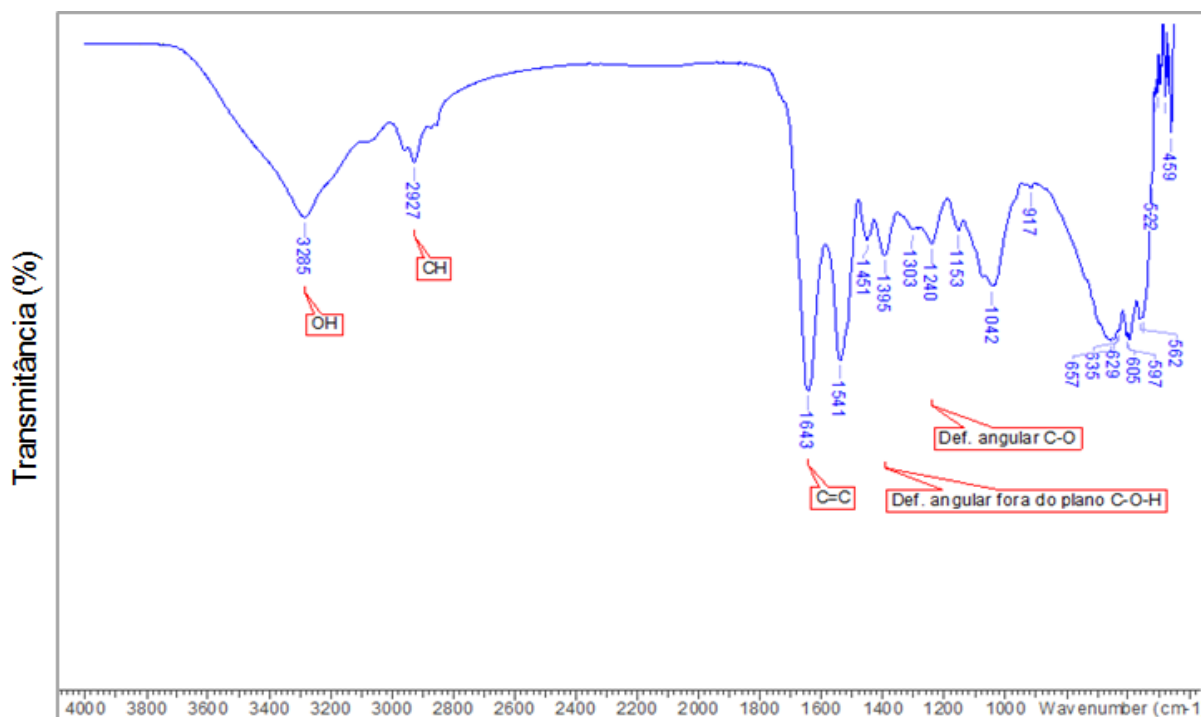
Figura 31 – Espectro de IV-TF da espécie *Monoraphidium contortum*



5.2.5 IV-TF da espécie *Planktolyngbya limnetica*

Na figura 32, o espectro de IV-TF de *Planktolyngbya limnetica* em 3285 cm^{-1} se observou deformação axial da ligação -OH; em 2927 cm^{-1} da ligação de carbono sp^3 -CH; em 1643 cm^{-1} ligação alqueno não conjugado e em 1240 cm^{-1} deformação angular da ligação C-O.

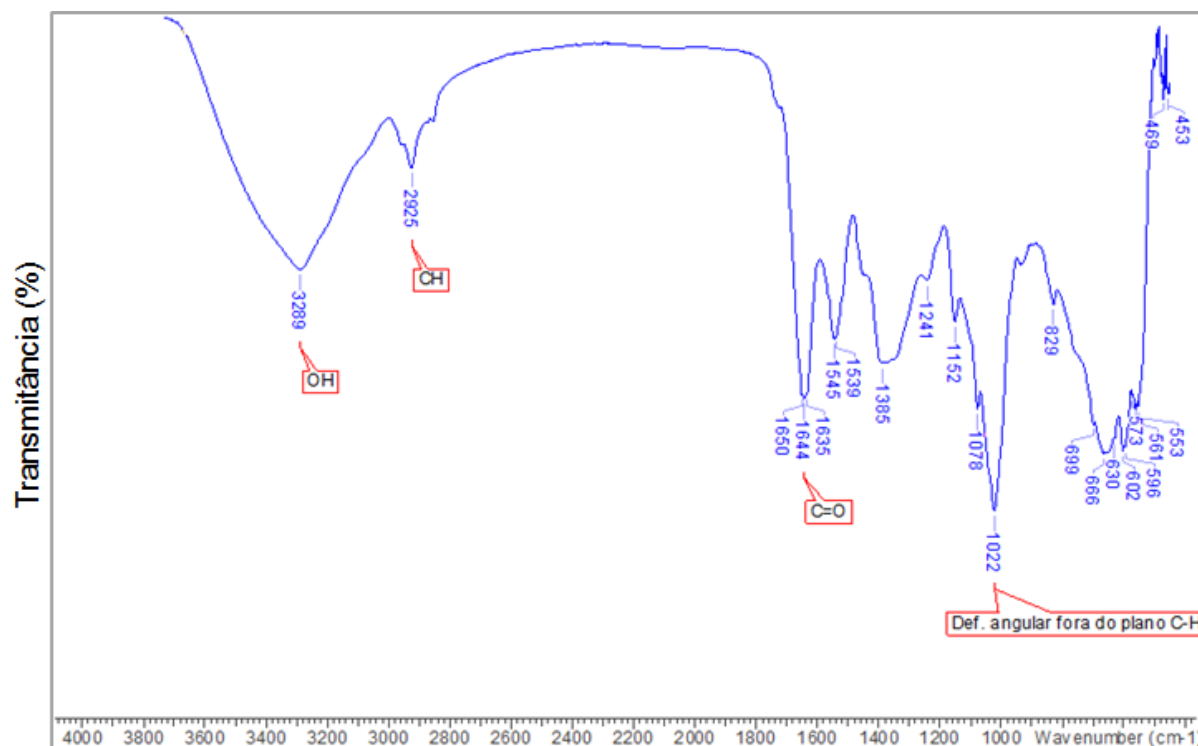
Figura 32 – Espectro de IV-TF da espécie *Planktolyngbya limnetica*



5.2.6 IV-TF da espécie *Pseudanabaena mucicola*

O espectro de IV-TF de *Pseudanabaena mucicola* (figura 33) ilustra um sinal em 3289 cm⁻¹ correspondente a deformação da ligação de -OH; em 2925 cm⁻¹ estiramento assimétrico de CH; em 1644 cm⁻¹ deformação axial da ligação C=O; em 1650 cm⁻¹ estiramento assimétrico característico de amidas livres e em 1022 cm⁻¹ deformação angular fora do plano da ligação carbono hidrogênio característico de proteínas.

Figura 33 – Espectro de IV-TF da espécie *Pseudanabaena mucicola*



5.2.7 IV-TF das espécies de *Scenedesmus ecornis* e *Scenedesmus ovalternus*

O espectro equivalente a figura 34 da espécie *Scenedesmus ecornis* apresentou um sinal em 3286 cm^{-1} característico da deformação axial da ligação -OH; entre $2922\text{--}2853\text{ cm}^{-1}$ presença da ligação de carbono sp^3 -CH₂- e em 1743 cm^{-1} estiramento da ligação de C=O.

Na figura 35, correspondente ao espectro de IV-TF de *Scenedesmus ovalternus*, se observou em 3288 cm^{-1} deformação da ligação -OH; entre $2922\text{--}2852\text{ cm}^{-1}$ deformação da ligação carbono sp^3 -CH₂-; em 1743 cm^{-1} estiramento da ligação C=O característico do grupo éster; lipídeos e ácidos graxos (STEHFEST et al., 2005). Ambas as figuras (27 e 28) demonstram similaridade entre as espécies pertencentes ao gênero *Scenedesmus*.

Figura 34 – Espectro de IV-TF da espécie *Scenedesmus ecornis*

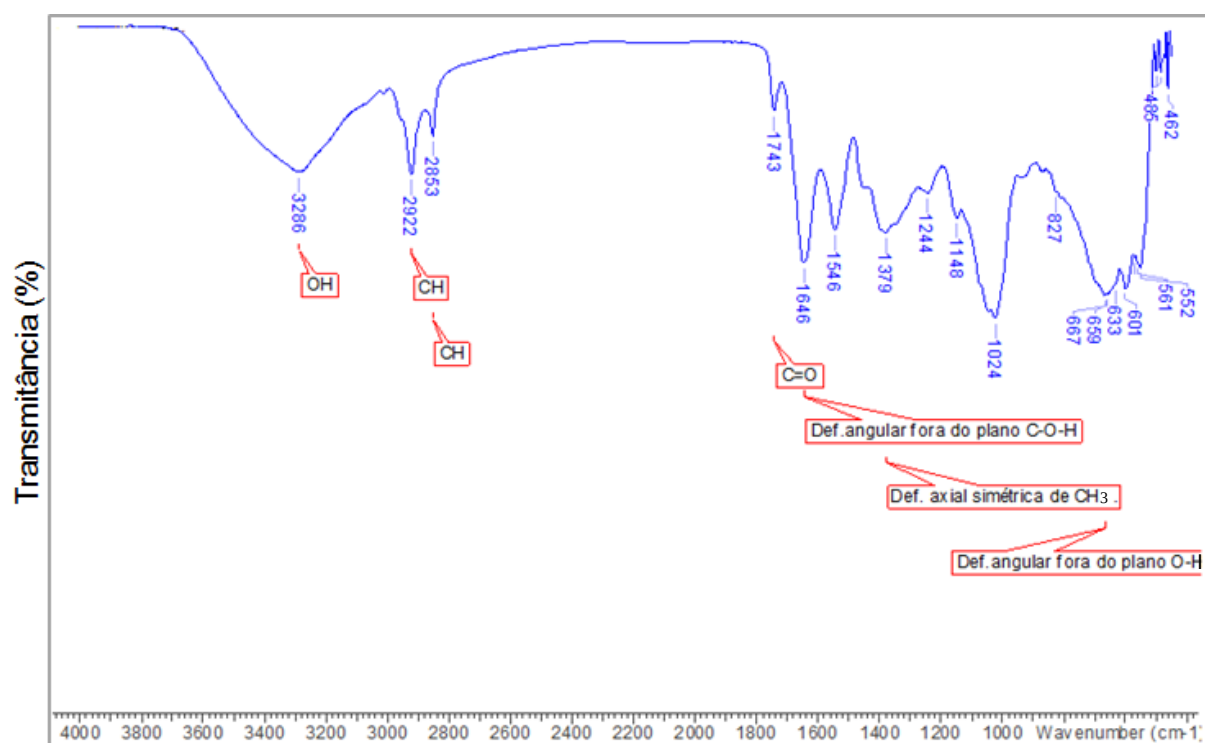
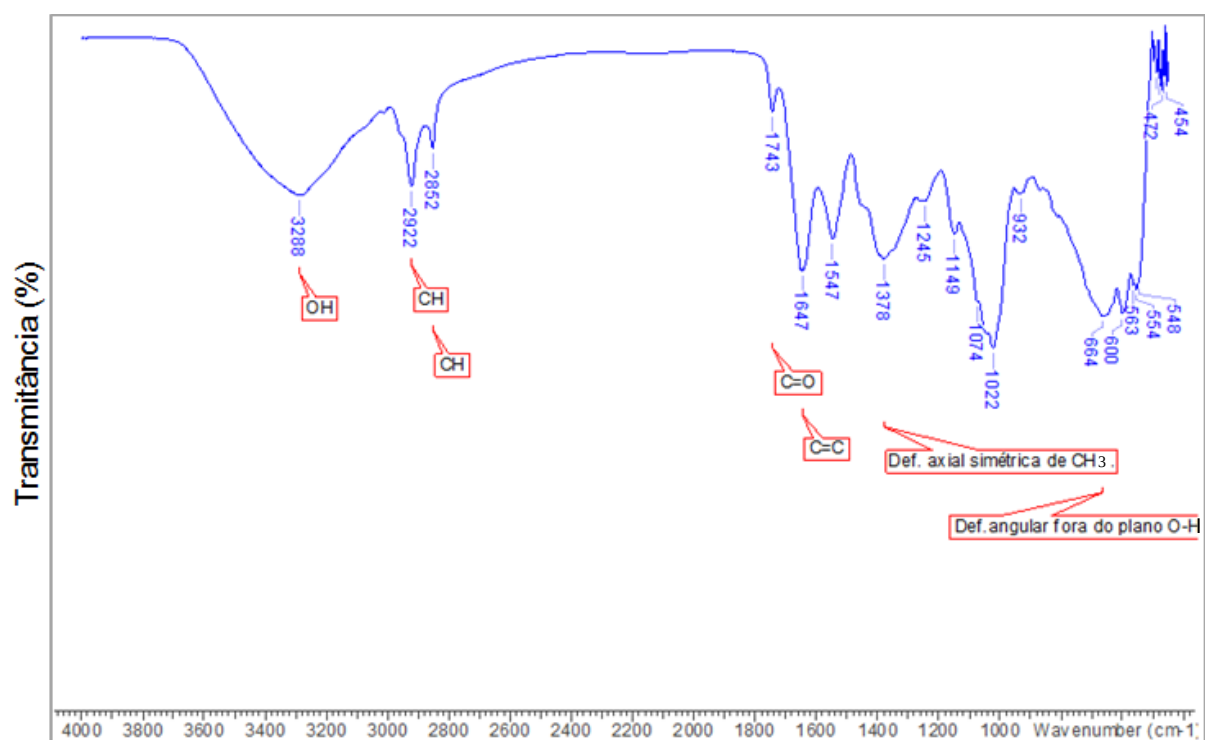


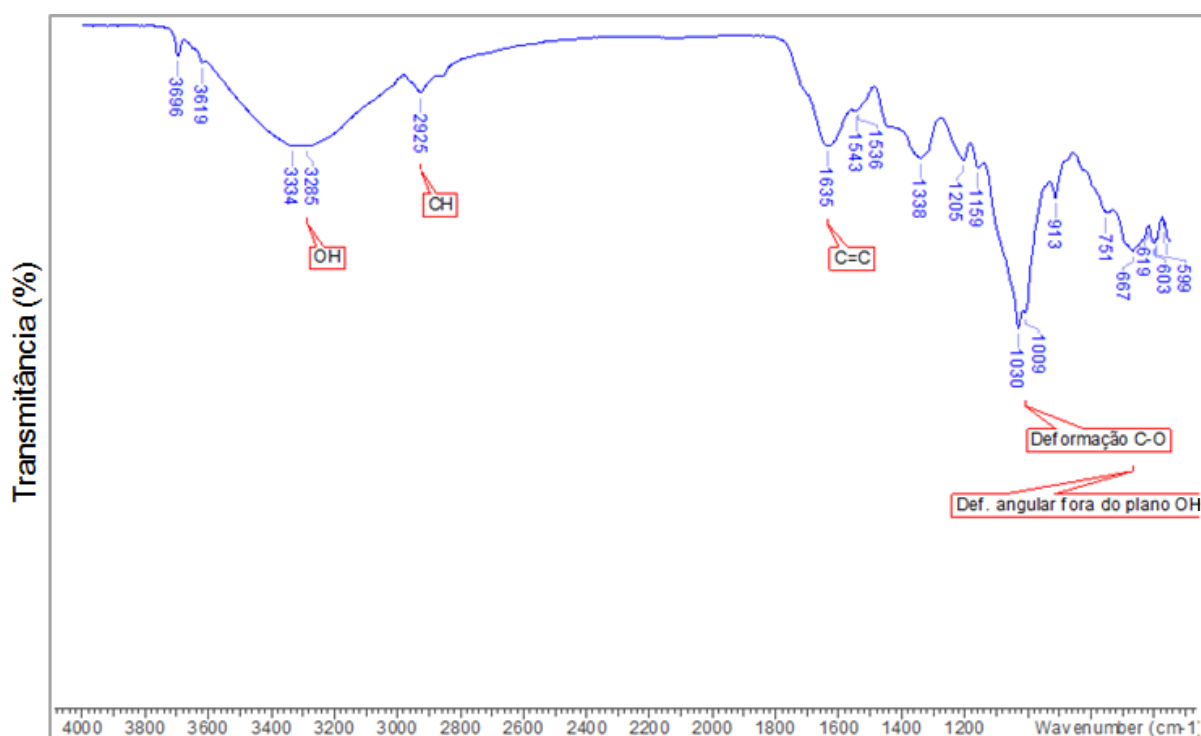
Figura 35 – Espectro de IV-TF da espécie *Scenedesmus ovalternus*



5.2.8 IV-TF da espécie *Spirogyra communis*

O espectro de IV-TF de *Spirogyra communis* (figura 36) evidenciou em 3685 cm^{-1} deformação axial da ligação de -OH; em 2925 cm^{-1} ligação de carbono sp^3 -CH₂- e indica em 1635 cm^{-1} ligação de C=C. O espectro em estudo foi similar ao encontrado por Onyancha et al. (2008) que além destes picos apresentou em 1656 cm^{-1} ligação de C=O e em 1038 cm^{-1} estiramento -C-O peculiar de álcoois, éteres, ácidos carboxílicos e ésteres.

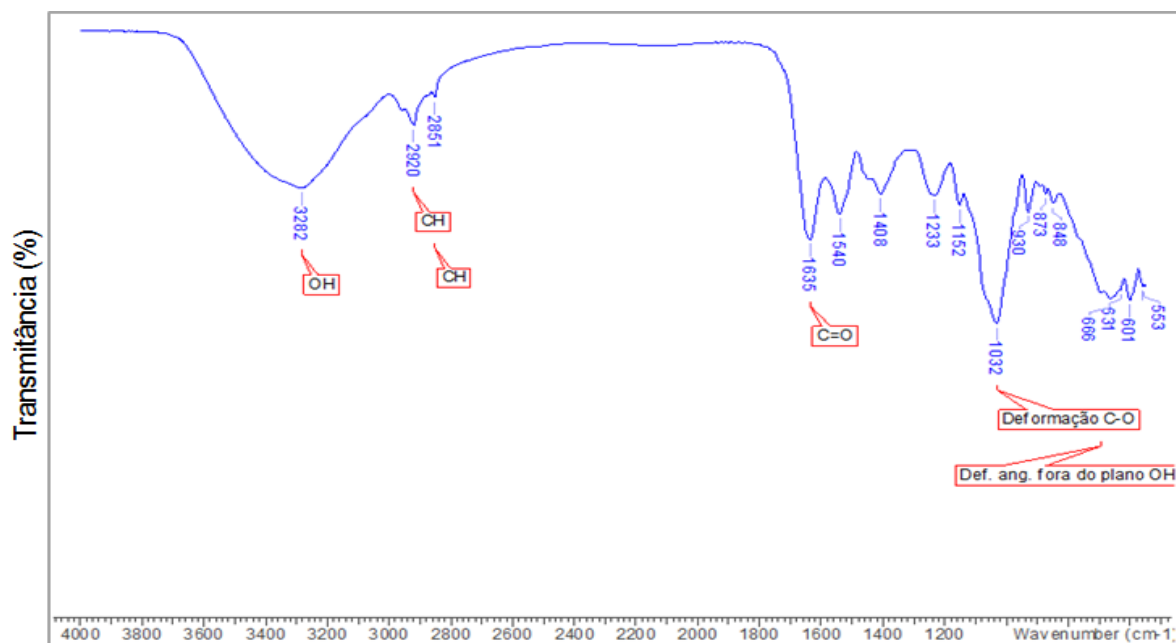
Figura 36 – Espectro de IV-TF da espécie *Spirogyra communis*



5.2.9 IV-TF da espécie *Spirulina platensis*

A figura 37 apresentou o espectro de IV-TF de *Spirulina platensis*, característico em 3282 cm^{-1} da ligação hidroxila -OH; entre 2920-2851 cm^{-1} presença da ligação de carbono sp^3 -CH₂-; 1635 cm^{-1} ligação alqueno não conjugada C=O; em 1032 cm^{-1} deformação C-O, e em 666 cm^{-1} deformação angular fora do plano de OH. Este espectro de IV-TF foi similar ao descrito por Silva et al. (2017) que cultivou *Spirulina* sp. em fotobiorreator na cidade de Santa Vitória do Palmar – RS sob condições não controladas de cultivo.

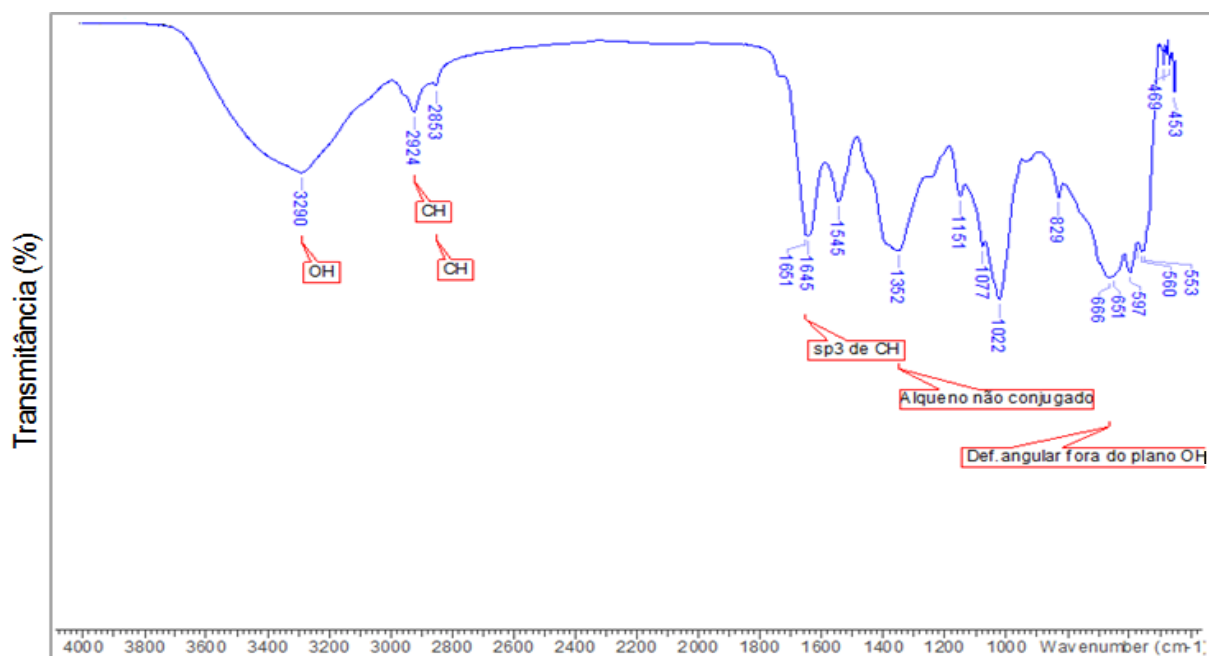
Figura 37 – Espectro de IV-TF da espécie *Spirulina platensis*



5.2.10 IV-TF da espécie *Synechococcus* sp.

Synechococcus sp. indicou em 3290 cm⁻¹ ligação de -OH; em 1645 cm⁻¹ deformação da ligação de carbono sp³ -CH₂-; em 1352 cm⁻¹ deformação alqueno não conjugado C=O e em 666 cm⁻¹ deformação angular fora do plano da ligação -OH (figura 38).

Figura 38 – Espectro de IV-TF da espécie *Synechococcus* sp.



5.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO SOXHLET E AGITAÇÃO MAGNÉTICA.

A microalga *Scenedesmus ecornis* foi utilizada nesta etapa devido a maior produção de biomassa possibilitando a identificação dos ácidos graxos produzidos. O perfil lipídico foi investigado através da extração direta dos triglicerídeos brutos por meio do método de Soxhlet e agitação magnética com o intuito de avaliar o melhor método para extração de lipídeos brutos presentes nessa microalga.

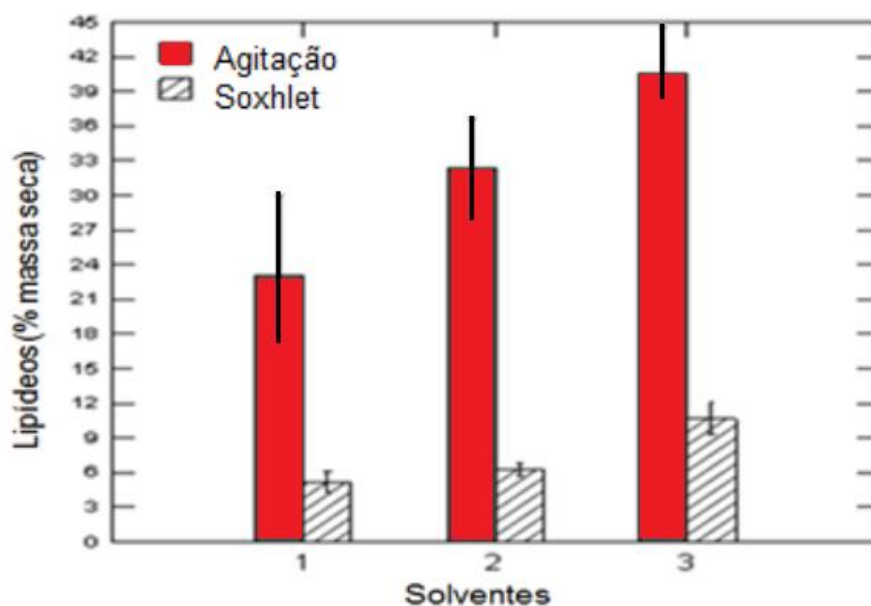
A alta extração lipídica é diretamente influenciada pela seleção do solvente, pois cada um tem seu potencial de extração. Solventes orgânicos como: clorofórmio e metanol, são facilmente dissolvidos nos lipídios presentes nas microalgas melhorando o rendimento da extração (ASHOKKUMAR et al., 2017).

A combinação de solventes pode facilitar a extração de uma composição particular lipídica, tendo em vista o grau de polaridade da mistura e sua biocompatibilidade (LI et al., 2014), levando em consideração a classificação das moléculas em lipídeos neutros e polares (SHIN et al., 2014; KUMAR; RAO, ARUMUGAM, 2015).

Diferenças significativas foram observadas entre os diferentes métodos de extração (agitação e Soxhlet) com todos os solventes utilizados. O método por agitação magnética foi o mais viável, pois conseguiu extrair uma maior quantidade de lipídeos totais. Cada um dos solventes apresenta polaridades diferentes: hexano (baixa polaridade), clorofórmio (alta polaridade) e uma mistura de ambos (polaridade intermediária) e isso influenciou diretamente na capacidade de extração.

Dessa forma, tanto o método de agitação magnética quanto por Soxhlet foram mais eficientes quando o solvente foi a mistura binária entre clorofórmio-hexano para extração de lipídeos brutos, sendo a agitação com maior significância rendendo 40.6 ± 3.03 de lipídeos a partir da biomassa seca, comparado a eficiência de hexano (32.16 ± 1.68) e clorofórmio (23.13 ± 1.02) sozinhos (Figura 39).

Figura 39 – Comparação entre os métodos Soxhlet e agitação magnética na extração de Lipídeos (%)



Legenda: 1. Clorofórmio; 2. Hexano; 3. Clorofórmio + hexano

Shin et al. (2014) relataram que na extração por Soxhlet utilizando hexano como solvente a uma temperatura de 80°C por 12h mostrou ser ineficiente, pois rendeu $5.9 \pm 0,2$ (%) de lipídeos da microalga *Scenedesmus* sp. Enquanto que, Esakkimuthu et al. (2016) descreveram o uso da mistura clorofórmio-metanol (2:1) como sendo mais eficiente na extração de lipídeos totais da microalga *Scenedesmus obliquus*.

5.4 IDENTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA COM ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

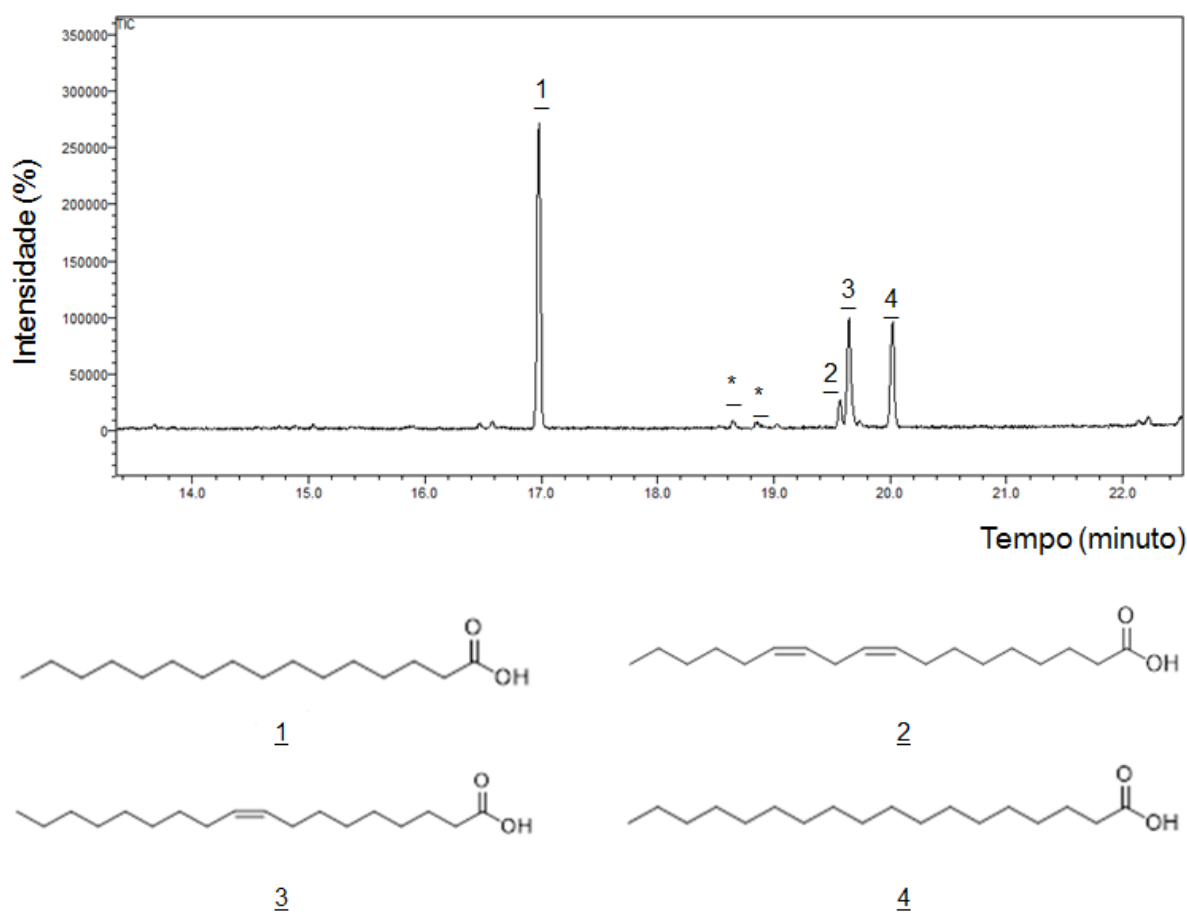
A técnica de espectrometria de massas é baseada na ionização de um composto, onde os íons são separados na base da razão massa/carga e o número de íons que correspondem a cada “unidade” de massa/carga é registrado na forma de espectro. Existem vários tipos de fontes de ionização e de analisadores de massas e são estes que determinam qual a aplicabilidade do método (PAVIA et al. 2010).

Os espectrômetros de massas são muito úteis na análise de compostos cujo espectro de massas é conhecido e na análise de compostos de estruturas totalmente desconhecida. No caso de compostos conhecidos, uma busca computadorizada compara o espectro de massas do composto em questão com uma biblioteca de

espectros de massas. A coincidência dos espectros é uma evidência convincente da identificação. Enquanto isso, no caso compostos desconhecidos, o íon molecular, a sequência de fragmentações e evidências de outros tipos de espectrometria (Ressonância Magnética Nuclear) pode levar a identificação de novos compostos (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012).

Os ácidos graxos identificados são apresentados no cromatograma da figura 40 juntamente com suas respectivas fórmulas estruturais, onde nota-se a eficiência da enzima CALB utilizada como catalisador na extração destes através da reação de hidrólise.

Figura 40 – Cromatograma do perfil dos etil-ésteres correspondentes aos ácidos graxos extraídos da reação com CALB analisados por CG-EM

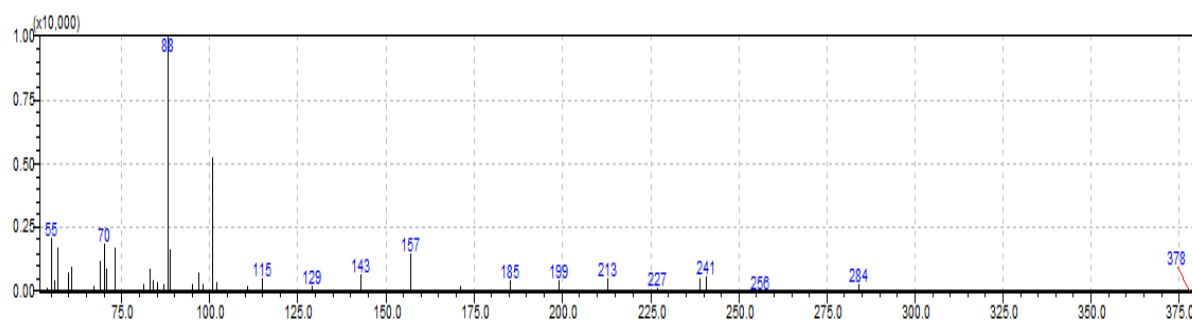


Legenda: 1: Ácido Palmítico; 2: Ácido Linoleico; 3: Ácido Oleico; 4: Ácido Estearico; *: Não identificado.

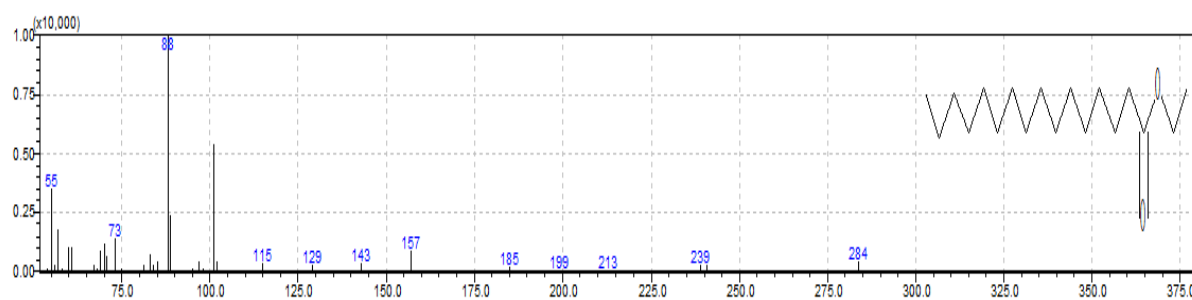
Os espectros de massa das análises foram comparados com o perfil de fragmentação encontrados na biblioteca do aparelho Shimadzu/GC 2010 para identificação dos seus constituintes de acordo com a figura 41.

Figura 41 – Espectros de massas dos etil-ésteres correspondentes aos ácidos graxos extraídos da reação com CALB analisados por CG-EM em comparação com os espectros da biblioteca do equipamento

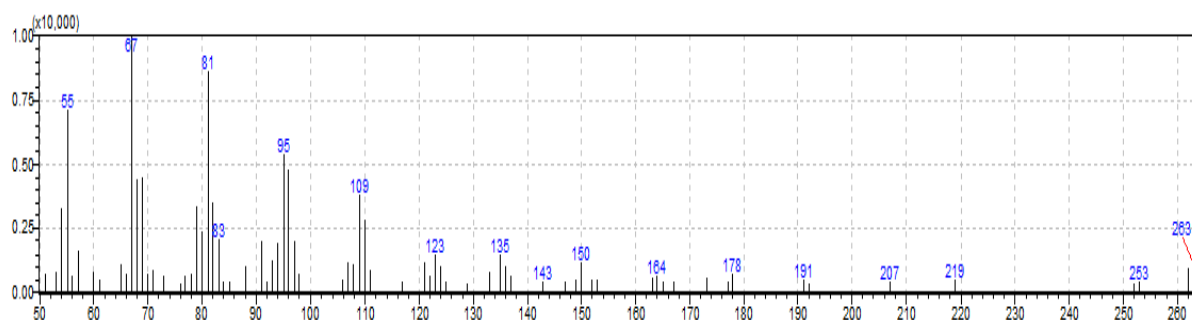
Substância 1: Ácido Palmítico (92%) – T.R.: 16.979



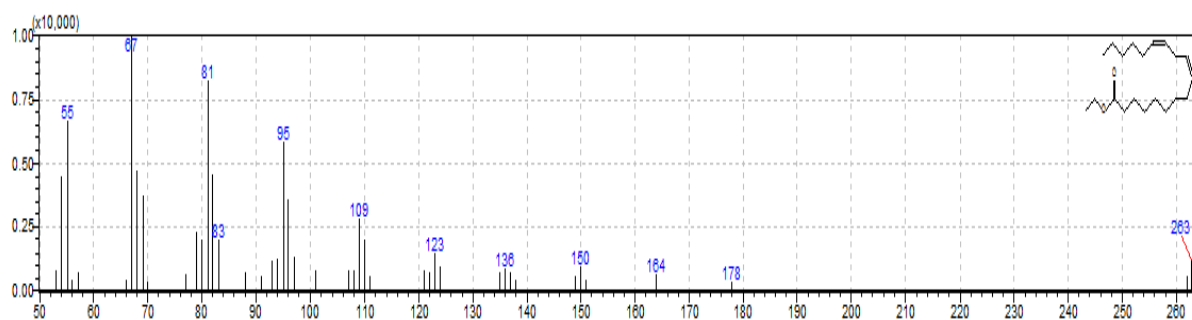
Espectro de massas da biblioteca relativo ao perfil de fragmentação da substância 1



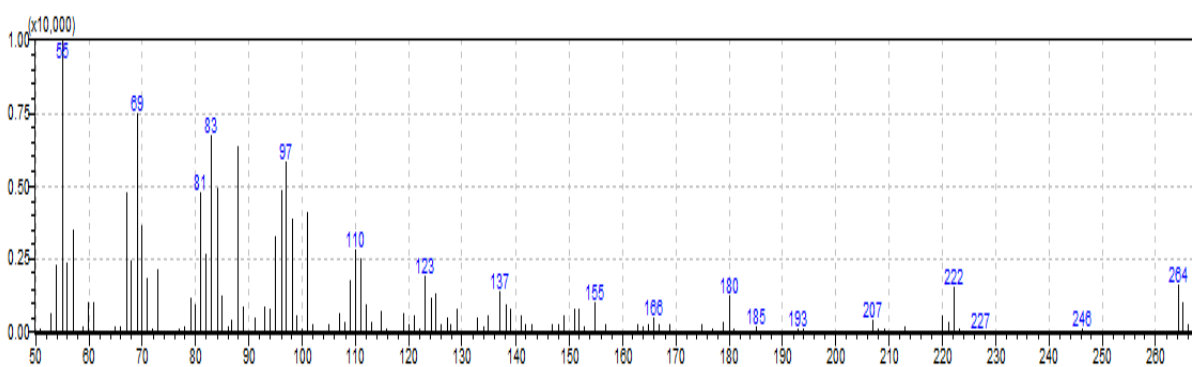
Substância 2: Ácido Linoleico (90%) – T.R.: 19.569



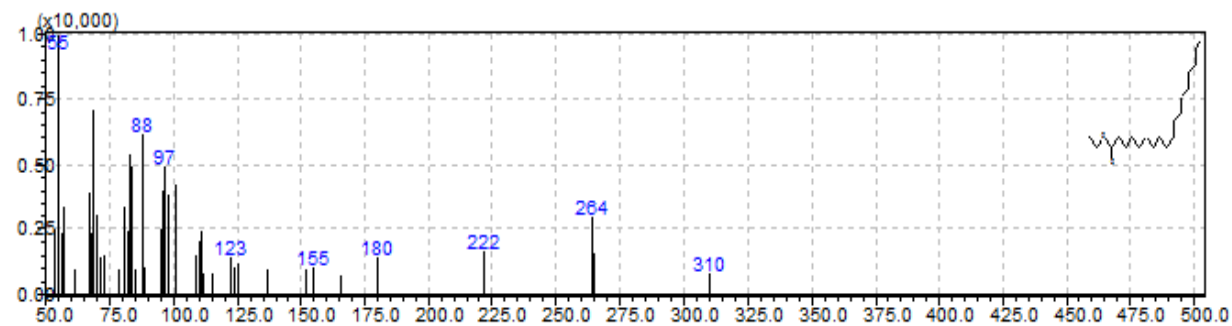
Espectro de massas da biblioteca relativo ao perfil de fragmentação da substância 2



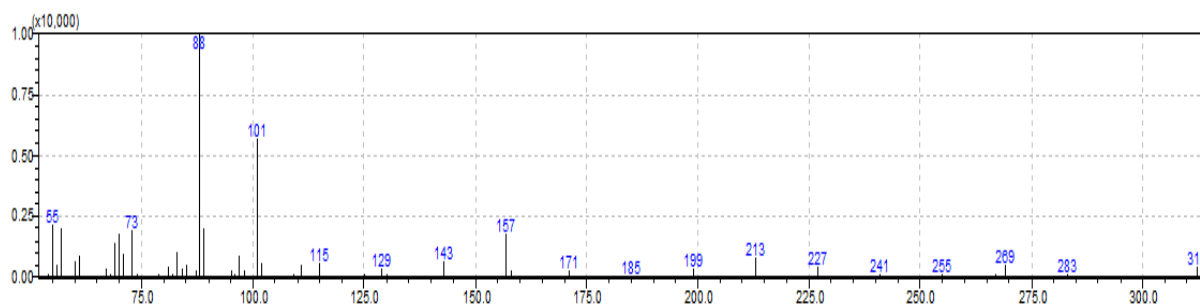
Substância 3: Ácido Oleico (93%) – T.R.: 19.646



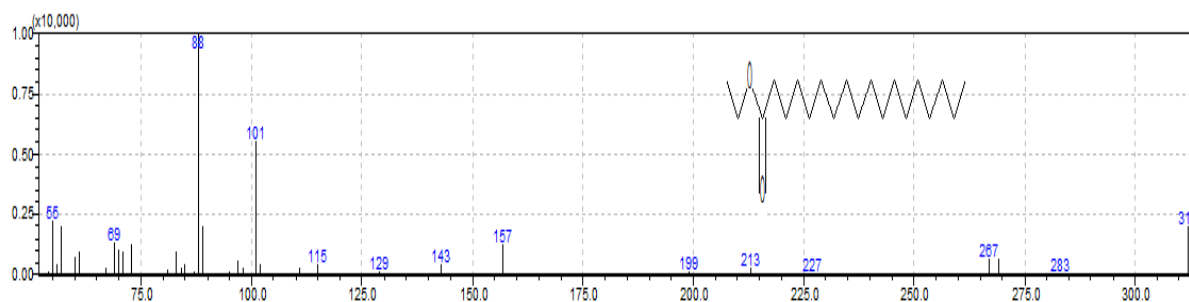
Espectro de massas da biblioteca relativo ao perfil de fragmentação da substância 3



Substância 4: Ácido Esteárico (92%) – T.R.: 20.019



Espectro de massas da biblioteca relativo ao perfil de fragmentação da substância 4



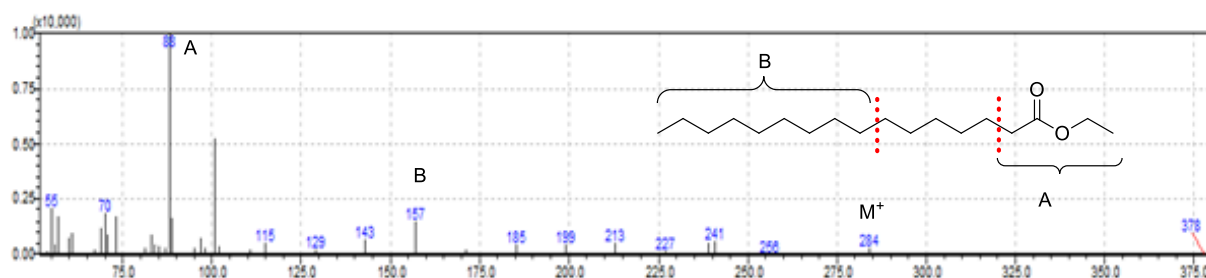
Os EEAG identificados estão descritos na tabela 8 e classificados de acordo com o seu grau de insaturação, são detalhadas também suas concentrações relativas e tempos de retenção. O ácido palmítico (54.40%), de cadeia saturada, e o ácido oleico (21.36%), monoinsaturado, são os compostos majoritários encontrados no óleo da espécie *Scenedesmus ecornis* o que corrobora com os estudos realizados por Sarpal et al. (2016) que indicam estes compostos como os principais apesar da espécie ser cultivada em meios de cultura diferentes propostos por Guillard 1972.

Tabela 8 – Determinação dos ésteres etílicos equivalentes aos ácidos graxos identificados por CG-EM extraídos por catálise enzimática (CALB) da biomassa de *Scenedesmus ecornis*

Ácidos graxos (n:i)	Picos	Tempo de retenção (min)	Teor (%)
Palmítico (16:0)	1	16.979	54.40
Linoleico (18:2)	2	19.569	4.57
Oleico (18:1)	3	19.646	21.36
Esteárico (18:0)	4	20.019	19.67
Σ. Insaturados	**	**	21.93
Σ. Saturados	**	**	74.07

Legenda: (n:i) nº de carbonos e insaturações.

Como o ácido palmítico foi o componente majoritário encontrado neste estudo, abaixo segue o perfil de fragmentação do éster palmitato de etila (Figura 42) produto da reação por esterificação.

Figura 42 – Perfil de fragmentação do éster palmitato de etila

Sabe-se que os elétrons que são removidos na etapa inicial do processo de ionização para fornecer o íon molecular (M^{+}) são aqueles localizados em orbitais moleculares de maior energia potencial. Assim, é mais fácil remover um elétron de um orbital não-ligante (n) do que tirar um elétron de um orbital π . Da mesma forma, é muito mais fácil remover um elétron de um orbital π em comparação com um orbital σ (PAVIA et al., 2010).

Seguindo esse princípio, acredita-se que o M^{+} para os produtos do éster palmitado de etila, sejam formados a partir da remoção de um elétron do orbital molecular n do oxigênio da carbonila e/ou do oxigênio do éster (PAVIA et al., 2010).

Os principais fragmentos de massas observados a partir do M^{+} foram o m/z 157 e o pico base com m/z 88, fragmento mais estável correspondente a molécula do palmitado de etila.

Ördög et al. (2013) observaram que espécies de *Scenedesmus* quando cultivadas sob condições estressantes de nitrogênio tem potencial para produzir altos teores de ácidos graxos na seguinte tendência ácido oleico > palmítico > linoleico > α -linolênico > esteárico > eicosenóico > palmitoleico > heptadecanóico, dentre estas espécies, *Scenedesmus ecornis* apresentou maior produtividade lipídica em área (21%) similar ao encontrado neste estudo (21.36%).

Em seus estudos, El-Baz, Abdo e Ali (2015) identificaram por meio da CG-EM o ácido palmítico (51.6%), o ácido oleico (22.2%) e o ácido linoleico (22.6%), dentre os ácidos graxos com maior porcentagem em concentração; o composto majoritário foi o ácido palmítico em ambos os casos de cultivo (controle, cultivo em batelada e escala semi-piloto) de *Scenedesmus obliquus*, mesmos sendo extraído pelo método Bligh & Dyer.

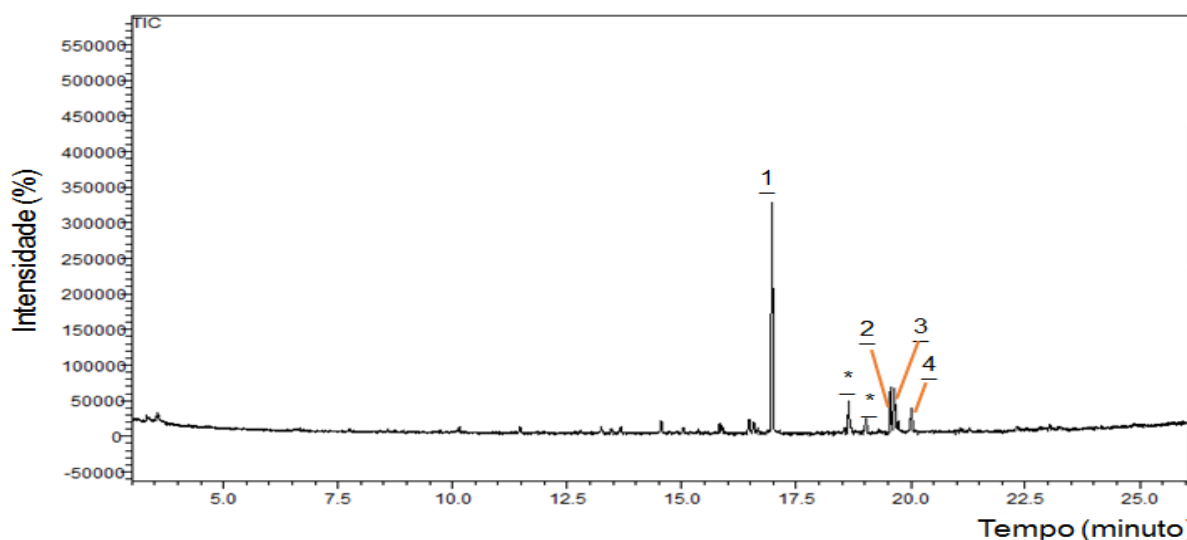
O perfil lipídico de *Scenedesmus quadricauda* foi ilustrado por apresentar ácido palmítico (16.36%), ácido oleico (15.60%) e ácido linoleico (11.67%) quando analisados por CG-EM após extração novamente pelo método Bligh & Dyer utilizando

clorofórmio/metanol como solventes (GOUR et al., 2016). Desse modo, pode-se inferir que a extração utilizando o biocatalisador CALB é eficaz, porque consegue extrair os mesmos ácidos e em quantidades (%) semelhantes quando a amostra é submetida a métodos clássicos.

Segundo Sarpal et al. (2015), os ácidos graxos presentes na composição das algas são semelhantes aos encontrados em óleos vegetais. No caso de *Scenedesmus ecornis*, os ácidos graxos com maior frequência encontrados em uma análise por CG-EM são os saturados (ácido palmítico e esteárico) e os insaturados (ácido linoleico e linolênico).

Com intuito de avaliar o melhor catalisador na extração de EEAG e comparar a eficiência da CALB frente ao H_2SO_4 , foi testado o óleo da espécie *Scenedesmus ecornis*, onde seus respectivos ácidos graxos podem ser visualizados no cromatograma apresentado na figura 43.

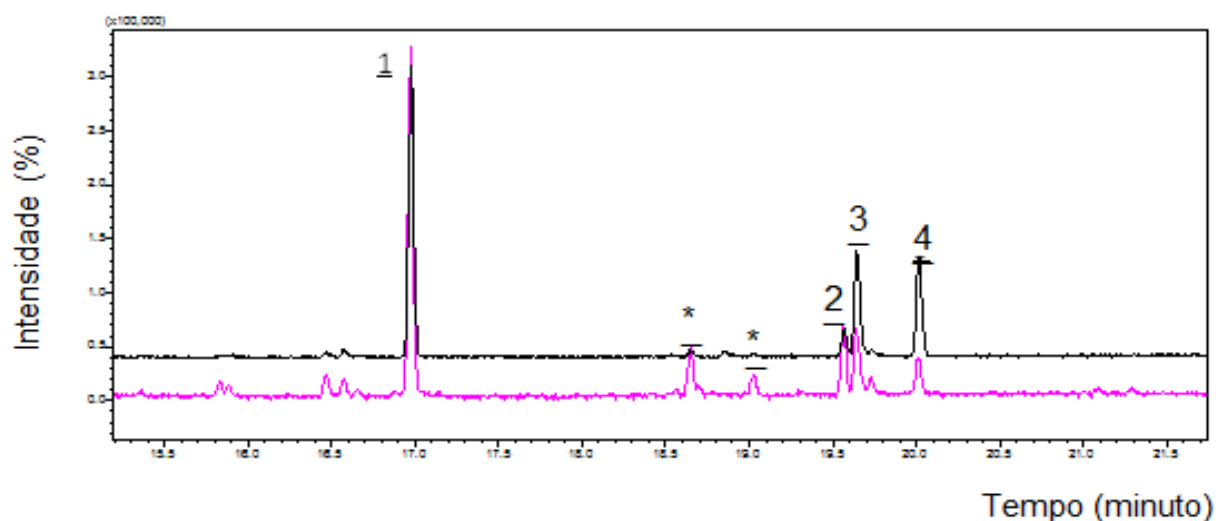
Figura 43 – Cromatograma do perfil dos etil-ésteres correspondentes aos ácidos graxos extraídos da reação com H_2SO_4 analisados por CG-EM



Legenda: 1: Ácido Palmítico; 2: Ácido Linoleico; 3: Ácido Oleico; 4: Ácido Esteárico; *: Não identificado.

O perfil cromatográfico da extração utilizando o biocatalisador CALB foi semelhante à catálise ácida com H_2SO_4 em relação aos ácidos graxos majoritários conforme ilustrado no cromatograma da figura 44.

Figura 44 – Cromatograma do perfil dos etil-ésteres correspondentes aos ácidos graxos extraídos pela reação com CALB e H₂SO₄ analisados por CG-EM



Legenda: ----: Em preto – Reação Utilizando a CALB; ----: Em rosa – Reação utilizando H₂SO₄.

Os EEAG extraídos pela catálise ácida apresentaram uma quantidade similar aos extraídos por catálise enzimática, conforme descrito na Tabela 9.

Tabela 9 – Determinação dos ésteres etílicos equivalentes aos ácidos graxos identificados por CG-EM extraídos por catálise ácida (H₂SO₄) da biomassa de *Scenedesmus ecornis*

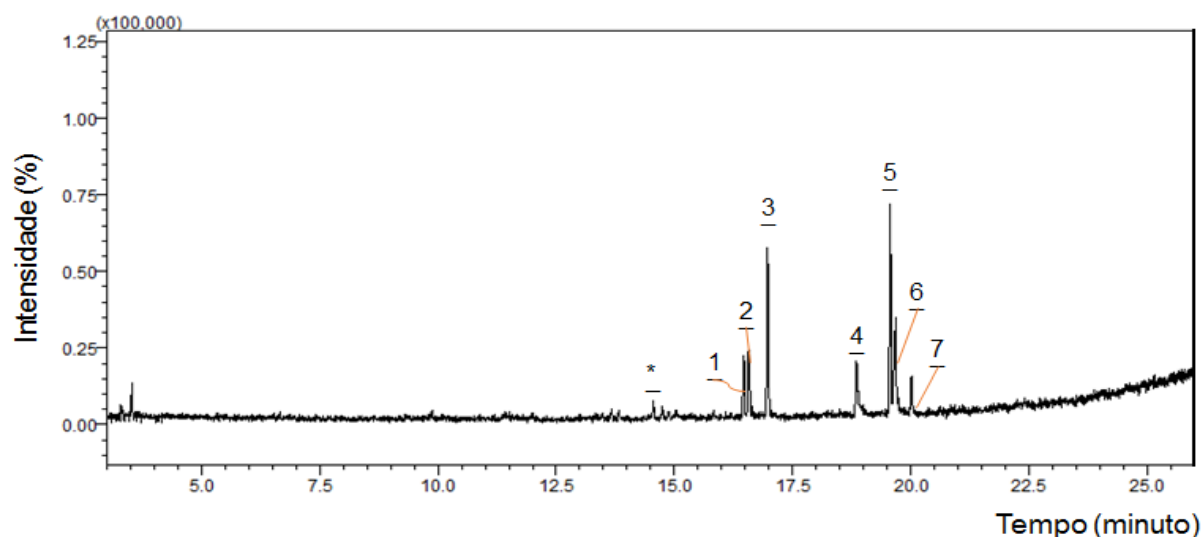
Ácidos graxos (n:i)	Picos	Tempo de retenção (min)	Teor (%)
Palmítico (16:0)	1	16.977	72,22
Linoleico (18:2)	2	19.570	12.69
Oleico (18:1)	3	19.647	10.48
Esteárico (18:0)	4	20.024	4.61
Σ. Insaturados	**	**	23.12
Σ. Saturados	**	**	76.83

Legenda: (n:i) n° de carbono e insaturações.

O ácido palmítico foi o componente majoritário (33.89%) extraído por catálise ácida encontrado na microalga *Scenedesmus dimorphus* que foi obtida da Coleção de Culturas de Algas da Universidade do Texas (CHNG; CHAN; LEE, 2016). O ácido palmítico (C16:0) também foi o mais significativo ácido graxo identificado por Schulze et al. (2016) da espécie isolada *Scenedesmus obtusiusculus* proveniente da Alemanha.

Em ambos os casos foi possível verificar que a mudança no catalisador não alterou significativamente o perfil de ácidos graxos extraídos. Assim, com o intuito de comparar a eficiência da CALB, o reuso da mesma foi proposto sob as mesmas condições do primeiro uso e seu grau de eficácia é visualizado conforme ilustra a figura 45.

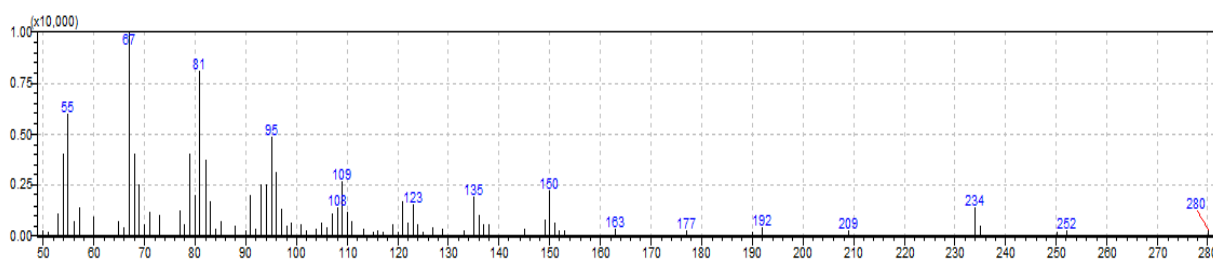
Figura 45 – Cromatograma do perfil dos etil-ésteres correspondentes aos ácidos graxos extraídos da reação com o reuso da CALB analisados por CG-EM



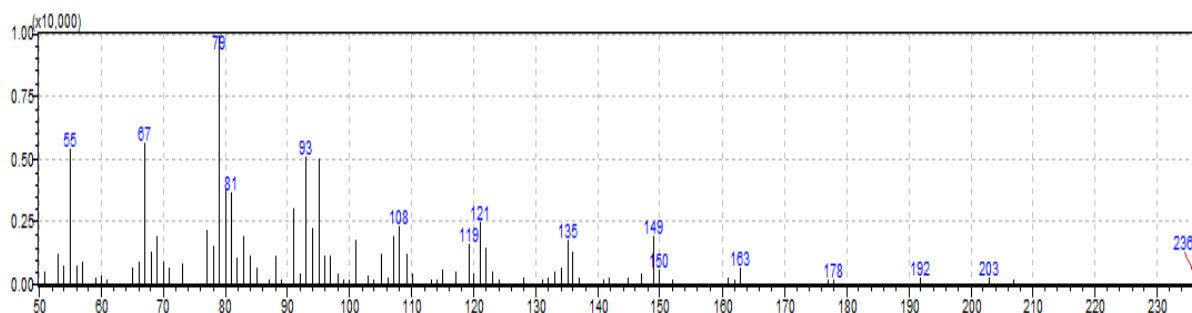
Os espectros de massas das análises foram equiparados com o perfil de fragmentação encontrados na biblioteca do aparelho Shimadzu/GC 2010 para identificação dos seus constituintes, no entanto, a substância detectada não correspondia ao que estava armazenado na biblioteca. Os compostos não foram identificados (figura 46). Abaixo segue apenas os espectros relativos a essas substâncias que não apareceram no primeiro uso do biocatalisador CALB.

Figura 46 – Espectros de massas dos etil-ésteres correspondentes aos compostos extraídos da reação com o reuso da CALB analisados por CG-EM

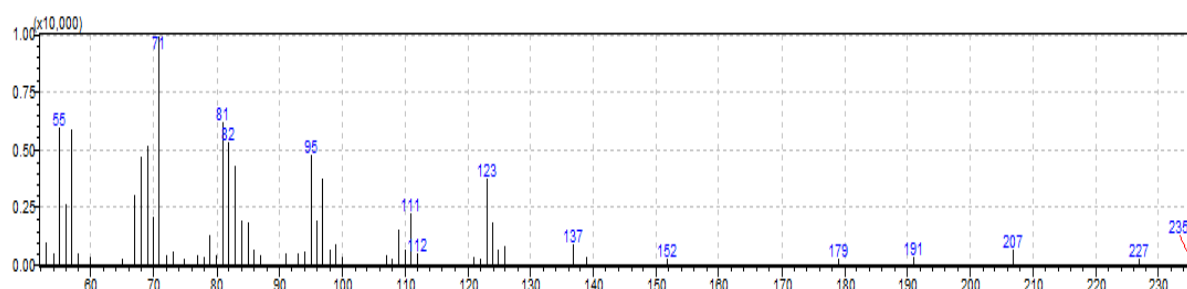
Substância 1: Não identificada – T.R.: 16.470



Substância 2: Não identificada – T.R.: 16.576



Substância 4: Não identificada – T.R.: 18.852



Os EEAG extraídos pela catálise enzimática após reuso da CALB apresentaram um perfil diferente em concentração aos extraídos no primeiro uso, conforme descrito na Tabela 10.

Tabela 10 – Determinação dos ésteres etílicos equivalentes aos ácidos graxos identificados por CG-EM extraídos por catálise enzimática no reuso do biocatalisador (CALB) da biomassa de *Scenedesmus ecornis*

Ácidos graxos (n:i)	Picos	Tempo de retenção (min)	Teor (%)
Não identificado	1	16.470	8.48
Não identificado	2	16.576	8.79
Palmítico (16:0)	3	16.975	24.61
Não identificado	4	18.852	9.97
Linoleico (18:2)	5	19.568	27.55
Oleico (18:1)	6	19.674	15.70
Esteárico (18:0)	7	20.016	4.89

Legenda: (n:i) n° de carbono e insaturações.

O rendimento de EEAG após a reação de hidrólise-esterificação a partir do reuso da CALB permaneceu o mesmo, no qual o volume de extrato lipídico foi de 83%

no primeiro uso e 78% na segunda utilização. Isso demonstra que a CALB é viável para reutilização em até dois ciclos.

Contudo, a esterificação com a CALB por hidrólise pode ser afetada por resíduos de água (H_2O) que comprometeram o sitio ativo da lipase devido ao desgaste da mesma, favorecendo a extração de outros agentes e a diminuição da porcentagem relativa de ácido oleico, alterando também a quantidade percentual dos outros ácidos extraídos.

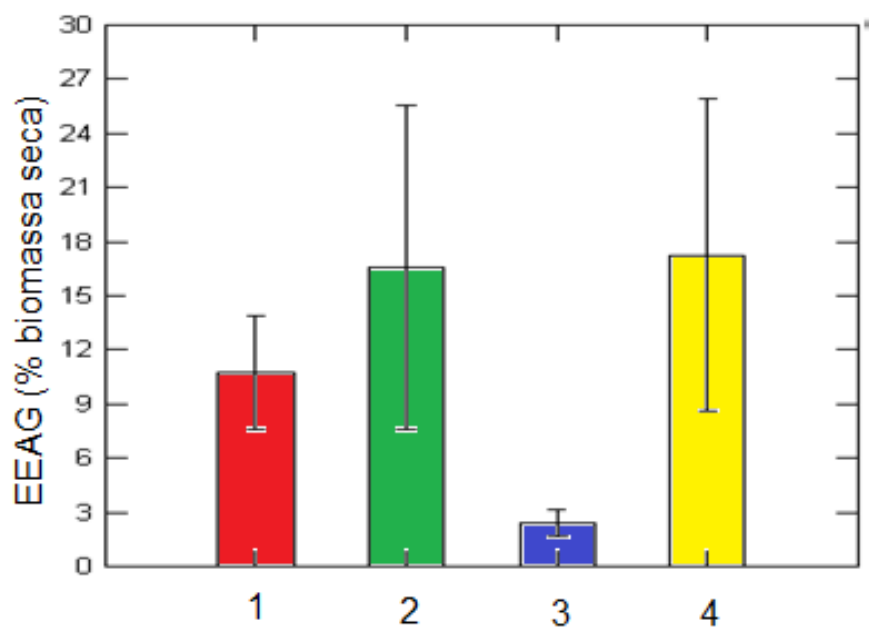
A hidroesterificação enzimática têm atraído muitas pesquisas recentemente por conta do valor dos produtos para a produção de biodiesel. O uso de t-butanol como co-solvente melhora a solubilidade dos óleos de plantas, em conjunto ao reuso da lipase CALB, foi detectado a eficácia desta por até 40 ciclos com pouco decréscimo na atividade enzimática (POURZOLFAGHAR et al., 2016). No entanto, estudos relatando a viabilidade do reuso relatam a influência na forma das lipases (livres ou imobilizadas) para o processo de síntese de ácidos graxos (GOG et al., 2012).

A otimização da lipase é dependente da quantidade de H_2O para manter sua conformação ativa. No caso de lipases imobilizadas, o controle de água deve ser realizado, pois quando presente em excesso, a água pode preencher os poros no suporte da enzima e reduzir a acessibilidade dos substratos hidrofóbicos ao sitio ativo da enzima (LU et al., 2009).

5.5 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

O rendimento final de EEAG a partir da biomassa seca de *Scenedesmus ecornis* foi significativamente influenciada pelo método aplicado, tanto pela transesterificação via agitação magnética e Soxhlet usando clorofórmio-hexano, quanto pela hidrólise-esterificação por catálise ácida e enzimática.

O rendimento de EEAG foi baixo quando a extração lipídica foi realizada por Soxhlet obtendo somente 2.43 ± 0.56 . O rendimento por hidrólise-esterificação via catálise ácida e enzimática foram 17.23 ± 6.54 e 16.56 ± 6.81 , respectivamente (Figura 47). Contudo, embora não haja diferenças significativas entre os rendimentos de EEAG ao utilizar estes catalisadores, o processo de hidrólise-esterificação por CALB apresentou maiores benefícios, como: maior produção de EEAG, seletividade de ácidos graxos saturados, reuso do catalisador sem perda significativa de rendimento do extrato lipídico e consequentemente redução.

Figura 47 – Produção de EEAG por diferentes métodos

Legenda: 1: Agitação Magnética (clorofórmio-hexano); 2: Catálise enzimática – CALB; 3: Soxhlet (clorofórmio-hexano); 4: Catálise ácida H₂SO₄.

6 CONCLUSÃO

Dentro dos objetivos propostos, foi possível realizar a coleta, o isolamento e a identificação de quatorze espécies de microalgas eucarióticas e cianobactérias (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris*, *Limnithrix limnetica*, *Monoraphidium contortum*, *Planktolyngbya limnetica*, *Pseudanabaena mucicola*, *Scenedesmus acuminatus*, *Scenedesmus baculiformes*, *Scenedesmus ecornis*, *Scenedesmus ovalternus*, *Spirogyra communis*, *Spirulina platensis* e *Synechococcus* sp.) pertencentes a ambientes aquáticos da cidade de Macapá-AP e cultivadas em laboratório com o meio BG-11 e NPK.

Dentre as quatorze espécies, apenas doze foram analisadas por IV-TF onde inferiu-se que todas as espécies isoladas possuem potencial para a produção de alguma molécula sejam estas, carboidratos, proteínas e/ou lipídeos baseado na presença de grupos funcionais característicos.

O cultivo laboratorial da espécie *Scenedesmus ecornis* é mais promissor, tendo em vista a alta produtividade em biomassa o que permitiu utilizá-la para a extração lipídica através dos métodos de agitação magnética, Soxhlet e hidrólise-esterificação por catálise ácida e enzimática.

A extração por agitação magnética e Soxhlet utilizando uma mistura de clorofórmio-hexano são eficazes para extrair lipídeos brutos da espécie *Scenedesmus ecornis*, seguidos da extração com hexano e clorofórmio. Contudo, pelo método de agitação o rendimento é significativamente maior (40.6 ± 3.03) quando comparado ao Soxhlet (10.66 ± 1.02) no uso da mistura clorofórmio-hexano.

A reação de hidrólise *in situ* seguida da esterificação e posterior transesterificação da biomassa de *Scenedesmus ecornis* tanto por catálise ácida quanto enzimática conseguiu extrair os ácidos graxos (palmítico, linoleico, oleico e esteárico). O ácido palmítico foi o componente majoritário na extração com ambos os catalisadores. Entretanto, ao comparar a catálise ácida com a enzimática se observou diferenças no percentual de concentração dos ácidos graxos, mas sem perdas bruscas.

A proposta de reuso do biocatalisador foi viável por até dois ciclos, pois o rendimento de EEAG foi de 83% no primeiro uso e 78% na segunda utilização. Apesar disso, os compostos extraídos no reuso foram em concentrações percentuais diferentes do primeiro uso e, ainda, foram encontrados três compostos que não foram

reconhecidos no primeiro uso caracterizado pelo comprometimento do sítio ativo da CALB associada a resíduos de água.

Portanto, a espécie *Scenedesmus ecornis* apresentou potencial para a produção de biodiesel e outros produtos importantes para a indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos, devido a produção de ésteres etílicos de ácidos graxos. O método de hidrólise-esterificação por catálise enzimática é sugerido para ser o método mais promissor na extração de lipídeos desta microalga. Diante disso, este estudo veio para contribuir sobre o potencial das microalgas e cianobactérias da região Amazônica elencando suas propriedades importantes ao meio científico.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Espera-se que a partir da elucidação dos compostos pertencentes ao metabolismo primário da microalga *Scenedesmus ecornis* possam ser realizados estudos aplicando tais substâncias em produtos farmacêuticos e cosméticos. Ainda, se sugere que futuramente possam ser isoladas as substâncias do metabolismo secundário, pois segundo a literatura a capacidade dessas substâncias desempenharem várias atividades que tragam benefícios a sociedade é promissora.

Além disso, levando em consideração o alto rendimento da biomassa de microalgas propõe-se analisar também o cultivo em larga escala para fins comerciais valorizando assim esse tipo de cultura que dispensa desmatar áreas aráveis para o seu desenvolvimento.

Portanto, a partir deste estudo a expectativa em relação a outras pesquisas que enalteçam as algas e aprofundem suas potencialidades aumentam progressivamente para que atendam às necessidades do meio científico.

REFERÊNCIAS

ADAM, F.; ABERT-VIAN, M.; PELTIER, G.; CHEMAT, F. "Solvent-free" ultrasound-assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: a green, clean and scalable process. **Bioresource Technol.** v. 114, p. 457-465, 2012.

AHMAD, A. L.; YASIN, N. H. M.; DEREK, C. J. C.; LIM, J. K. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review. **Renew Sust Energy Rev.** v. 15, n. 1, p. 584-593, 2011.

ALLEN, M. B. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. **J Appl Phycol.** Baltimore, v.4, p. 1-4, 1968.

AMARO, H. M.; GUEDES, A. C.; MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Appl Energ.** v. 88, n. 10, p. 3402-3410, 2011.

ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. **Microalgas de águas continentais: Potencialidades e Desafios do Cultivo.** Londrina: IAPAR, 2014.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Biodiesel: Introdução.** 2014. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=73292&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&1430275579994>>. Acesso em: 22 abr. 2015.

_____. **Resolução ANP nº 7, de 19 de março de 2008, D.O.U. de 20.03.2008.** Disponível em: <www.anp.gov.br>. Acesso em: 22 ago. 2014.

ARENAS, E. G.; PALACIO, M. C. R.; JUANTORENA, A. U.; FERNANDO, S. E. L.; SEBASTIAN, P. J. Microalgae as a potential source for biodiesel production: techniques, methods, and other challenges. **Int J Energy Res.** p. 1-29, 2016.

ASHOKKUMAR, V.; SALIM, M. R.; SALAM, Z.; SIVAKUMAR, P.; CHONG, C. T.; ELUMALAI, S.; SURESH, V.; ANI, F. N. Production of liquid biofuels (biodiesel and bioethanol) from brown marine macroalgae *Padina tetrastomatica*. **Energ Convers Manage.** v. 135, p. 351-361, 2017.

AZEREDO, V. B. S. **Produção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa de custos e perspectivas para o Brasil.** 2012. 171 f. Dissertação (Mestrado em Planejamento Energético) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

BALEN, R. E.; GERALDO JÚNIOR, E.; MARQUES, A. E. M. L.; CESTARI, M. M.; VARGAS, J. V. C.; CORRÊA, D. O.; MARIANO, A. B.; MEURER, F. Effect of defatted microalgae (*Scenedesmus obliquus*) biomass inclusion on growth performance of *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). **J Appl Ichthyol.** v. 31, n. S4, p. 98-101, nov. 2015.

BARCELLOS, A. D.; BARRETO, A. G. S. S.; MACHADO, B. A. S.; DRUZIAN, J. I. Microalgas e seu potencial de uso. **Cadernos de Prospecção**, v. 5, n. 4, p. 178, 2012.

BARRETT, K. E.; BARMAN, S. M.; BOITANO, S.; BROOKS, H. L. **Fisiologia médica de Ganong**. 24 ed. Amgh, 2014. 768p.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology**. 2 ed. CRC Press: Pisa (Italy), 2014.

BATISTA, G. **Extração de ácidos graxos de *Chlorella pyrenoidosa* assistida por pressurização cíclica: estudo de equilíbrio e caracterização dos extratos**. 2016. 112 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016

BAUMGARTNER, T. R. S.; BURAK, J. A. M.; KOGIKOSKI, M. E.; SEBASTIEN, N. Y.; ARROYO, P. A. Avaliação da produtividade da microalga *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat em diferentes meios de cultivo. **R Bras Bioci.** v. 11, n. 2, 2013.

BERRY, J. P.; GANTAR, M.; PEREZ, M. H.; BERRY, G.; NORIEGA, F. G. Cyanobacterial toxins as allelochemicals with potential applications as algaecides, herbicides and insecticides. **Mar Drugs**. v. 6, n. 2, p. 117-146, 2008.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições**. 2 ed. São Carlos: RiMa, 2006. 502p.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J Biochem Phys.** v. 37, n. 1, p. 911-917, 1959.

BOGEN, C.; KLASSEN, V.; WICHMANN, J.; LA RUSSA, M.; DOEBBE, A.; GRUNDMANN, M.; URONEN, P.; KRUSE, O.; MUSSGNUNG, J. H. Identification of *Monoraphidium contortum* as a promising species for liquid biofuel production. **Bioresource Technol.** v. 133, p. 622-626, 2013.

BRASIL. Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005. Aprova o **"Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal"**. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_270_2005.pdf/c27660a1-b6ac-4a38-aadc-956929c80b7b>. Acesso em: 04 dez. 2016.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae – a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renew Sust Energ Rev.** v. 14, n. 2, p. 557-577, 2010.

CAPELLI, B.; CYSEWSKI, G. R. Potential health benefits of *Spirulina* microalgae. **Nutrafoods.** v. 9, n. 2, p. 19-26, 2010.

CAROLINO, L. R. V. **Cultivo de microalgas unicelulares para determinação da produção lipídica e sequestro de carbono.** 2011. 91 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia) - Departamento de Biologia Vegetal, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2011.

CEBIN, C. F. S.; COLONELLI, T. A. S.; RASPE, D. T.; SILVA, C. Esterificação heterogênea de ácidos graxos livres em óleos residuais de fritura. **Ambiência Guarapuava.** v. 8, n. 3, p. 901-908, 2012.

CEMIG - COMPANHIA ENERGÉTICA DE MINAS GERAIS. **Alternativas Energéticas: uma visão Cemig.** Belo Horizonte: Cemig, p. 369, 2012.

CHAMPE, P. C; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica ilustrada.** 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 528p.

CHATSUNGNOEN, T.; CHISTI, Y. Harvesting microalgae by flocculation–sedimentation. **Algal Res.** v. 13, p. 271-283, 2016.

CHEN, Y.; LIU, X.; XIAO, Z.; HUANG, Y.; LIU, B. Antioxidant activities of polysaccharides obtained from *Chlorella pyrenoidosa* via different ethanol concentrations. **Int J Biol Macromolec.** v. 91, p. 505-509, 2016.

CHIURCHIÙ, V.; MACCARRONE, M. Bioactive lipids as modulators of immunity, inflammation and emotions. **Curr Opin Pharmacol.** v. 29, p. 54-62, 2016.

CHNG, L. M.; CHAN, D. J. C.; LEE, K. T. Sustainable production of bioethanol using lipid-extracted biomass from *Scenedesmus dimorphus*. **J Clean Prod.** v. 130, p. 68-73, 2016.

COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. E. **A célula: Uma abordagem molecular**. 3 ed. Artmed, 2007.

CÓRDOBA-CASTRO, N. M.; ACERO-REYES, N. L.; DUQUE-BUITRAGO, L. F.; JIMÉNEZ-AGUILAR, L. J.; SERNA-JIMÉNEZ, J. A. Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga *Haematococcus pluvialis*. **UGCiencia**. v. 21, p. 73-82, 2015.

COSTA, J. A. V.; RADMANN, E. M.; CERQUEIRA, V. S.; SANTOS, G. C.; CALHEIROS, M. N. Fatty acids profile the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Chlorella minutissima* grown under different conditions. **Alim Nutr.** Araraquara, v.17, n.4, p. 429-436, out./dez. 2006.

CUNHA, E. D. S. **Levantamento florístico, dinâmica espaço-temporal e quantificação da biomassa do fitoplâncton dos Rios Araguari e Falsino (Amapá-Brasil)**. 2012. 74 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical) - Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2012.

DA RÓS, P. C. M. **Avaliação de óleos de cianobactérias como matéria-prima para a síntese de biodiesel pela rota etílica**. 2012. 175 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial na área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

DE OLIVEIRA, J. R. **BIOFÍSICA: para ciências biomédicas**. Edipucrs, 2014.

DEAN, A. P.; SIGEE, D. C.; ESTRADA, B.; PITTMAN, J. K. Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. **Bioresource Technol.** v. 101, n. 12, p. 4499-4507, 2010.

D'OCA, M. G. M.; VIÊGAS, C. V.; LEMÕES, J. S.; MIYASAKI, E. K.; MORÓN-VILLARREYES, J. A.; PRIMEL, E. G.; ABREU, P. C. Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. **Biomass Bioenerg.** v. 35, n. 4, p. 1533-1538, 2011.

DUBEY, S. K.; DUBEY, J.; MEHRA, S.; TIWARI, P.; BISHWAS, A. J. Potential use of cyanobacterial species in bioremediation of industrial effluents. **Afr J Biotechnol.** v. 10, n. 7, p. 1125-1132, 2011.

DUYGU, D. Y.; UDOH, A. U.; OZER, T. B.; AKBULUT, A.; ERKAYA, I. A.; YILDIZ, K.; GULER, D. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for identification of *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890 and *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing 1833. **Afr J Biotechnol**. v. 11, n. 16, p. 3817-3824, 2012.

EL-BAZ, F. K.; SAYEDA, A. M.; ALI, G. H. Enhancement of oil accumulation in microalga *Scenedesmus obliquus*. **Int J Pharm Sci Rev Res**. v. 35, p. 21-115, 2015.

ESAKKIMUTHU, S.; KRISHNAMURTHI, V.; GOVINDARAJAN, R.; SWAMINATHAN, K. Augmentation and starvation of calcium, magnesium, phosphate on lipid production of *Scenedesmus obliquus*. **Biomass Bioenerg**. v. 88, p. 126-134, 2016.

FELLER, R.; MATOS, A. P.; MOECKE, E. H. S.; CARVALHO JR, R. M.; LOPES, R. G.; CAMARGO, C. P. A.; SANT'ANNA, E. S.; DERNER, R. B.; OLIVEIRA, J. V.; FURIGO, A. Comparative study of biochemical composition of five microalgae for biodiesel/bioproducts application. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 1499-1506, 2015.

FERREIRA, S. P.; SOUZA-SOARES, L.; COSTA, J. A. V. Revisão: microalgas: uma fonte alternativa na obtenção de ácidos gordos essenciais. **Revista de Ciências Agrárias**. v. 36, n. 3, p. 275-287, 2013.

FERREIRA, I. M.; GANZELI, L. S.; ROSSET, I. G.; YOSHIOKA, S. A.; PORTO, A. L. M. Ethylic biodiesel production using lipase Immobilized in silk fibroin-alginate spheres by encapsulation. **Catal Lett**. v. 146, p. 12, 2016.

FERREIRA, V. S.; SANT'ANNA, C. Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. **World J Microb Biot**. v. 33, n. 1, p. 20, 2017.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Os lipídeos e suas principais funções. **Revista Fi**. n., 37, p. 55-61, 2016

FU, C. C.; HUNG, T.; CHEN, J.; SU, C.; WU, W. Hydrolysis of microalgae cell walls for production of sugar and lipid extraction. **Bioresource Technol**. v. 101, n. 22, p. 8750-8754, 2010.

FUJII, K. Isolation of astaxanthin-producing microalgae and potential biotechnological applications. **Curr Biotechnol**. v. 4, n. 4, p. 492-498, 2015.

GAGO, A. S. **Compostos bioativos de microalgas com interesse no tratamento da diabetes**. 2016. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Microbiana) - Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve, 2016.

GANDOLA, E.; ANTONIOLI, M.; TRAFICANTE, A.; FRANCESCHINI, S.; SCARDI, M.; CONGESTRI, R. ACQUA: Automated Cyanobacterial Quantification Algorithm for toxic filamentous genera using spline curves, pattern recognition and machine learning. **J Microbiol Methods**. v. 124, p. 48-56, 2016.

GANTAR, M.; SIMOVIC, D.; DJILAS, S.; GONZALEZ, W. W.; MIKSOVSKA, J. Isolation, characterization and antioxidative activity of C-phycocyanin from *Limnothrix* sp. strain 37-2-1. **J Biotechnol**. v. 159, n. 1, p. 21-26, 2012.

GARCIA, A. N. **Estudo químico e de toxicidade subcrônica da cianobactéria *Pseudanabaena galeata***. 2014. 93 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica da Secretaria de Meio Ambiente, São Paulo, 2014.

GERPEN, J. V. Biodiesel processing and production. **Fuel Process Technol**. v. 86, n. 10, p. 1097-1107, 2005.

GOG, A.; ROMAN, M.; TOSA, M.; PAIZS, C.; IRIMIE, F. D. Biodiesel production using enzymatic transesterification – Current state and perspectives. **Renew Energy**. v. 39, n. 1, p. 10-16, 2012.

GOMES, A. F. **Extração e análise da fração lipídica da microalga *Monoraphidium* sp., síntese e caracterização do seu biodiesel**. 2013. 80 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; MAHDY, A.; BALLESTEROS, I.; BALLESTEROS, M. Impact of temperature and photoperiod on anaerobic biodegradability of microalgae grown in urban wastewater. **Int Biodeterior Biodegradation**. v. 106, p. 16-23, 2016.

GOUR, R. S.; CHAWLA, A.; SINGH, H.; CHAUHAN, R. S.; KANT, A. Characterization and Screening of Native *Scenedesmus* sp. Isolates Suitable for Biofuel Feedstock. **PloS one**, v. 11, n. 5, p. e0155321, 2016.

GUDMUNDSSON, S.; NOGALES, J. Cyanobacteria as photosynthetic biocatalysts: a systems biology perspective. **Mol BioSyst**. v. 11, n. 1, p. 60-70, 2015.

GURR, M. I.; HARWOOD, J. L.; FRAYN, K. N.; MURPHY, D. J.; MICHELL, R. H. **Lipids: biochemistry, biotechnology and health**. 6 ed. Wiley Blackwell, 2016.

HAKALIN, M. L. S. **Otimização das condições de cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. para a produção de biodiesel**. 2014. 155 f. Tese. (Doutorado em Biologia Molecular) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2014.

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

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

HAMED, I. The evolution and versatility of microalgal biotechnology: A Review. **Comp Rev Food Sci Food Saf.** v. 15, p. 1104-1123, 2016.

HARISKOS, I.; POSTEN, C. Biorefinery of microalgae - opportunities and constraints for different production scenarios. **Biotechnol J.** v. 9, n. 6, p. 739-752, 2014.

HERRERO, M.; SÁNCHEZ-CAMARGO, A. P.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. **TrAC Trends Anal Chem.** v. 71, p. 26-38, 2015.

HONG, J. W.; JO, S.; KIM, O. H.; JEONG, M. R.; KIM, H.; PARK, K. M.; LEE, K. I.; YOON, H. Characterization of a Korean Domestic Cyanobacterium *Limnathrix* sp. KNUA012 for Biofuel Feedstock. **J Life Sci.** v. 26, n. 4, p. 460-467, 2016.

HOUNSLOW, E.; NOIREL, J.; GILMOUR, D. J.; WRIGHT, P. C. Lipid quantification techniques for screening oleaginous species of microalgae for biofuel production. **Eur J Lipid Sci Tech.** v. 118, p. 1-24, 2016.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **Plant J.** v. 54, n. 4, p. 621-639, 2008.

HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Appl Energy.** v. 87, p. 38-46, 2010.

IBÁÑEZ, E.; HERRERO, M.; MENDIOLA, J. A.; CASTRO-PUYANA, M. Extraction and characterization of bioactive compounds with health benefits from marine resources: macro and micro algae, cyanobacteria, and invertebrates. In: HAYES, M. **Marine bioactive compounds: sources, characterization and applications**. Springer Science+Business Media, LLC 2012. p. 55-98.

ISHAQ, A. G.; MATIAS-PERALTA, H. M.; BASRI, H.; MUHAMMAD, M. N. Antibacterial activity of freshwater microalga *Scenedesmus* sp. on foodborne pathogens *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* sp. **J Sci Technol**. v. 7, n. 2, p. 21-32, 2016.

JAKUBOWSKA, N.; ZAGAJEWSKI, P.; GOŁDYN, R. Water blooms and cyanobacterial toxins in lakes. **Pol J Environ Stud**. v. 22, n. 4, p. 1077-1082, 2013.

JORGE, T. B. F. **Farinha de microalga *Schizochytrium* sp., como fonte de ômega 3, em dieta para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na fase adulta**. 2016. 65 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2016.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2012.

KHATTAR, J. I. S.; SINGH, D. P.; JINDAL, N.; KAUR, N.; SINGH, Y.; RAHI, P.; GULATI, A. Isolation and characterization of exopolysaccharides produced by the cyanobacterium *Limnothrix redekei* PUPCCC 116. **Appl Biochem Biotechnol**. v. 162, n. 5, p. 1327-1338, 2010.

KLING, H. J.; IV, H. D. L.; SMARDA, J.; KOMÁREK, J.; ACREMAN, J.; BRUUN, K.; WATSON, S. B.; CHEN, F. A new red colonial *Pseudanabaena* (Cyanoprokaryota, Oscillatoriales) from North American large lakes. **Fottea**. v. 12, n. 2, p. 327-339, 2012.

KOMÁREK, J.; KOMÁRKOVÁ-LEGNEROVÁ, J. Contribution to the knowledge of planktic cyanoprokaryotes from central Mexico. **Preslia**. v. 74, p. 207-233, 2002.

KREMMYDA, L.; TVRZICKA, E.; STANKOVA, B.; ZAK, A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease – a review. Part 2: fatty acid physiological roles and applications in human health and disease. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**. v. 155, n. 3, p. 195-218, set. 2011.

KUMAR, J.; DHAR, P.; TAYADE, A. B.; GUPTA, D.; CHAURASIA, O. P.; UPRETI, D. K.; TOPPO, K.; ARORA, R.; SUSEELA, M. R.; SRIVASTAVA, R. B. Chemical composition and biological activities of Trans-Himalayan alga *Spirogyra porticalis* (Muell.) Cleve. **Plos One**. v. 10, n. 2, p. e0118255, 2015.

KUMAR, R. R.; RAO, P. H.; ARUMUGAM, M. Lipid extraction methods from microalgae: a comprehensive review. **Front Energy Res**. v. 2, p. 61, 2015.

KUMAR, A. R. U. N.; SINGH, J. S. Microalgae and cyanobacteria biofuels: a sustainable alternate to crop-based fuels. **Microbes Environ Manage**. p. 1-21, 2016.

KUMAR, S. P. J. GARLAPATI, V. K.; DASH, A.; SCHOLZ, P.; BANERJEE, R. Sustainable green solvents and techniques for lipid extraction from microalgae: A review. **Algal Res**. v. 21, p. 138-147, 2017.

LEBLOND, J.; DAHMEN, J. Editorial: Recent Advances and Technologies in Algal Lipid Biology. **Front Plant Sci**. v. 7, p. 1-2, set. 2016.

LEE, Y.; CHANG, S. The biosorption of heavy metals from aqueous solution by *Spirogyra* and *Cladophora* filamentous macroalgae. **Bioresource Technol**. v. 102, n. 9, p. 5297-5304, 2011.

LEE, Y.; SHEN, H. Basic culturing techniques. In: RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied Phycology**. Blackwell Publishing, p. 40-56, 2004.

LEE, R. E. **Phycology**. 4 ed. Cambridge University Press, Cambridge, 2008.

LI, Y.; NAGHDI, F. G.; GARG, S.; ADARME-VEGA, T. C.; THURECHT, K. J.; GHAFOR, W. A.; TANNOCK, S.; SCHENK, P. M. A comparative study: the impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research. **Microb Cell Fact**. v. 13, n. 1, p. 14, 2014.

LI, C.; YU, Y.; ZHANG, D.; LIU, J.; REN, N.; FENG, Y. Combined effects of carbon, phosphorus and nitrogen on lipid accumulation of *Chlorella vulgaris* in mixotrophic culture. **J Chem Technol Biotechnol**. v. 91, n. 3, p. 680-684, 2016.

LI-BEISSON, Y.; NAKAMURA, Y.; HARWOOD, J. Lipids: From Chemical Structures, Biosynthesis, and Analyses to Industrial Applications. In: **Lipids in Plant and Algae Development**. Springer International Publishing. p. 1-18, 2016.

LIU, J.; VANORMELINGEN, P.; VYVERMAN, W. Fatty acid profiles of four filamentous green algae under varying culture conditions. **Bioresource Technol.** v. 200, p. 1080-1084, 2016.

LIU, J.; QIU, W.; SONG, Y.; PENG, H.; ZHAO, Y. The growth and lipid productivity of *Chlorella pyrenoidosa* enhanced by plant hormones under ammonium stress. **Environ Prog Sustain Energy.** p. 1-7, 2017.

LÓPEZ, E. N.; MEDINA, A. R.; CERDÁN, L. E.; MORENO, P. A. G.; SÁNCHEZ, M. D. M.; GRIMA, E. M. Fatty acid methyl ester production from wet microalgal biomass by lipase-catalyzed direct transesterification. **Biomass Bioenerg.** v. 93, p. 6-12, out. 2016.

LOURES, C. C. A. **Otimização do processo de cultivo da microalga *Chlorella minutissima* como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel.** 2016. 153 f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá da Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2016.

LU, J.; CHEN, Y.; WANG, F.; TAN, T. Effect of water on methanolysis of glycerol trioleate catalyzed by immobilized lipase *Candida* sp. 99–125 in organic solvent system. **J Mol Cat B: Enzym.** v. 56, n. 2–3, p. 122-125, 2009.

LUCKEY, M. **Membrane structural biology: with biochemical and biophysical foundations.** 2 ed. Cambridge University Press, 2014.

MAPA – Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2014). Departamento da cana-de-açúcar e agroenergia. **Produção brasileira de etanol.** Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 22 abr. 2015.

MARKIEVICZ, M.; LAJOLO, F. M.; MARTINS, F. O.; ANDRE, M. F.; BARROS, K. V.; SILVEIRA, V. L. F. **Ácidos graxos poli-insaturados: Impactos na Saúde.** ILSI Brasil Internacional (Life Sciences Institute do Brasil): São Paulo, 2016.

MARTINS, G. B.; FERNANDES, V. O. Efeitos da depleção de nitrogênio sobre a biomassa e produção lipídica de três espécies de microalgas. **Iheringia. Série Botânica.** v. 71, n. 2, p. 117-123, 2016.

MATHIMANI, T.; UMA, L.; PRABAHARAN, D. Homogeneous acid catalysed transesterification of marine microalga *Chlorella* sp. BDUG 91771 lipid–An efficient biodiesel yield and its characterization. **Renew Energy.** v. 81, p. 523-533, 2015.

MCKENNEDY, J.; ÖNENC. S.; PALA, M.; MAGUIRE, J. Supercritical carbon dioxide treatment of the microalgae *Nannochloropsis oculata* for the production of fatty acid methyl esters. **J Supercrit Fluids**. v. 116, p. 264-270, 2016.

MENDES, M. C. D. Q.; GONZALEZ, A. A. C.; MENEZES, M.; NUNES, J. M. D. C.; PEREIRA, S.; NASCIMENTO, I. A. Collection of microalgae from natural freshwater environments of Bahia, Brazil, as a potential source for biofuel production: a taxonomic approach. **Acta Bot Bras**. v. 26, n. 3, p. 691-696, 2012.

MENDES, L. B. B.; VERMELHO, A. B. Allelopathy as a potential strategy to improve microalgae cultivation. **Biotechnol Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1, 2013.

MERCER, P.; ARMENTA, R. E. Developments in oil extraction from microalgae. **Eur J Lipid Sci Technol**. v. 113, p. 539-547, 2011.

MERCHANT, S. S.; KROPAT, J.; LIU, B.; SHAW, J.; WARAKANONT, J. TAG, You're it! *Chlamydomonas* as a reference organism for understanding algal triacylglycerol accumulation. **Curr Opin Biotech**. v. 23, n. 3, p. 352-363, dez. 2012.

MIRANDA, S. V. In: GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. 2016. **AlgaeBase**. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível em: <<http://www.algaebase.org>>. Acesso em: 09 nov. 2016.

MISHRA, S. K.; SHRIVASTAV, A.; MAURYA, R. R.; PATIDAR, S. K.; HALDAR, S.; MISHRA, S. Effect of light quality on the C-phycoerythrin production in marine cyanobacteria *Pseudanabaena* sp. isolated from Gujarat coast, India. **Protein Expr Purif**. v. 81, n. 1, p. 5-10, jan. 2012.

MORIOKA, L. R. I.; MATOS, A. P.; OLIVO, G.; SANT'ANNA, E. S. Floculação de *Chlorella* sp. produzida em concentrado de dessalinização e estudo de método de extração de lipídeos intracelulares. **Quim Nova**. v. 37, n. 1, p. 44-49, set. 2014.

MULBRY, W.; KONDRAD, S.; BUYER, J.; LUTHRIA, D. L. Optimization of an oil extraction process for algae from the treatment of manure effluent. **J Am Oil Chem Soc**. v. 86, n. 9, p. 909-915, 2009.

MURDOCK, J. N.; WETZEL, D. L. FT-IR microspectroscopy enhances biological and ecological analysis of algae. **Appl Spectrosc Rev**. v. 44, n. 4, p. 335-361, 2009.

MUSSGNUG, J. H.; KLASSEN, V.; SCHLÜTER, A.; KRUSE, O. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. **J Biotechnol.** v. 150, p. 51-56, 2010.

MUTANDA, T.; RAMESH, D.; KARTHIKEYAN, S.; KUMARI, S.; ANANDRAJ, A.; BUX, F. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. **Bioresource Technol.** v. 102, n. 1, p. 57-70, jan. 2011.

NABAVI, S. F.; NABAVI, S. M.; EBRAHIMZADEH, M. A.; JAFARI, N.; YAZDANPANA, S. Biological activities of freshwater algae, *Spirogyra singularis* Nordstedt. **J Aquat Food Prod T.** v. 22, n. 1, p. 58-65, 2013.

NAIK, A. A.; HEMAVANI, C.; THIPPESWAMY, B. Evaluation of antimicrobial property of *Spirogyra* species. **Int Multidiscip Res J.** v. 2, p. 13-15, 2012.

NAJDENSKI, H. M.; GIGOVA, L. G.; ILIEV, I. I.; PILARSKI, P. S.; LUKAVSKÝ, J.; TSVETKOVA, I. V.; NINOVA, M. S.; KUSSOVSKI, V. K. Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. **Int J Food Sci Tech.** v. 48, n. 7, p. 1533-1540, 2013.

NAUTIYAL, P.; SUBRAMANIAN, K. A.; DASTIDAR, M. G. Production and characterization of biodiesel from algae. **Fuel Process Technol.** v. 120, p. 79-88, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** 6 ed. Artmed: Porto Alegre, 2014.

NOGUEIRA, I. S.; GAMA JÚNIOR, W. A.; D'ALESSANDRO, E. B. Planktonic cyanobacteria from an artificial urban lake in the city of Goiânia, Goiás State. **Rev Bras Bot.** v. 34, n.4, p. 575-592, 2011.

OLIVEIRA, F. C. C.; SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS, W. L. P. Biodiesel: possibilidades e desafios. **QNEsc.** v. 28, p. 3-8, 2008.

ONYANCHA, D.; MAVURA, W.; NGILA, J.C.; ONGOMA, P.; CHACHA, J. Studies of chromium removal from tannery wastewaters by algae biosorbents, *Spirogyra condensata* and *Rhizoclonium hieroglyphicum*. **J Hazard Mater.** v. 158, p. 605–614, 2008.

ÖRDÖG, V.; STIRK, W. A.; BÁLINT, P.; LOVÁSZ, C.; PULZ, O.; STADEN, J. Lipid productivity and fatty acid composition in *Chlorella* and *Scenedesmus* strains grown in nitrogen-stressed conditions. **J Appl Phycol.** v. 25, n. 1, p. 233-243, 2013.

OSAKI, M.; BATALHA, M. O. Produção de biodiesel e óleo vegetal no Brasil: realidade e desafio. **Organizações Rurais & Agroindustriais.** Lavras, v. 13, n. 2, p. 227-242, 2011.

PANDIT, N. K. **Introdução às ciências farmacêuticas.** Artmed, 2008.

PARULEKAR, G. T. Antioxidant activity of the freshwater microalga *Chlamydomonas* sp. **Int J Pure App Biosci.** v. 4, n. 5, p. 55-58, 2016.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução a Espectroscopia.** Tradução de: BARROS, Pedro. 4. ed. São Paulo, 2010.

PENTEADO, R. R. **Desenvolvimento de controlador para cultivo de microalgas em lagoas tipo raceway.** 2014. 90 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

PHUKAN, M. M.; CHUTIA, R. S.; KONWAR, B. K.; KATAKI, R. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. **Appl Energ.** v. 88, n. 10, p. 3307-3312, 2011.

PINHEIRO, D. M.; PORTO, K. R. A.; MENEZES, M. E. S. A Química dos alimentos: carboidratos, lipídeos, proteínas, vitaminas e minerais. EDUFAL, 2005, 52p.

PINHO, D. M. M.; SUAREZ, P. A. Z. A hidrogenação de óleos e gorduras e suas aplicações industriais. **Rev Virtual Quim.** v. 5, n. 1, p. 47-62, 2013.

POL, A.; GROSS, S. P.; PARTON, R. G. Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: Lipids, proteins, and sites. **J Cell Biol.** v. 204, n. 5, p. 635-646, 2014.

POURZOLFAGHAR, H.; ABNISA, F.; DAUD, W. M. A. W.; AROUA, M. K. A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production. **Renew Sust Energy Rev.** v. 61, p. 245-257, 2016.

PRABAKARAN, P.; RAVINDRAN, A. D. A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. **Lett Appl Microbiol.** v. 53, n. 2, p. 150-154, 2011.

PRATAMA, W.; DEWI, S. C.; SARI, I. Z. R.; HARDIYATI, A.; WAJONG, A. E. Distribution and abundance of macroalgae in intertidal zone of drini beach, Gunungkidul, Diy. **KnE Life Sciences**, v. 2, n. 1, p. 514-517, 2015.

PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Commercial and industrial applications of microalgae – A review. **J Algal Biomass Utln**. v. 3, n. 4, p. 89-100, 2012.

RAMÍREZ-MÉRIDA, L. G.; MENEZES, C. R.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E. Microalgas: potencial para la producción de compuestos bioactivos nanoencapsulados. **Ciência e Natura**. v. 37, p. 07-17, dez. 2015.

RAMLUCKAN, K.; MOODLEY, K. G.; BUX, F. An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method. **Fuel**. v. 116, p. 103-108, 2014.

RAMOS, G. J. P.; BICUDO, C. E. M.; GOÉS NETO, A.; MOURA, C. W. N. *Monoraphidium* and *Ankistrodesmus* (Chlorophyceae, Chlorophyta) from Pantanal dos Marimbus, Chapada Diamantina, Bahia State, Brazil. **Hoehnea**. v. 39, n. 3, p. 421-434, 2012.

RAVEH, A.; CARMELI, S. Aeruginazole A, a novel thiazole-containing cyclopeptide from the cyanobacterium *Microcystis* sp. **Org Lett**. v. 12, n. 15, p. 3536-3539, 2010.

REN, H.; LIU, B.; MA, C.; ZHAO, L.; REN, N. A new lipid-rich microalga *Scenedesmus* sp. strain R-16 isolated using Nile red staining: effects of carbon and nitrogen sources and initial pH on the biomass and lipid production. **Biotechnol Biofuels**. v. 6, n. 1, p. 1, 2013.

RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. 566p.

RODOLFI, L.; ZITTELLI, G. C.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. R. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipids synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnol Bioeng**. v. 102, n. 1, p. 100-112, jan. 2009.

RODWELL, V. W.; BENDER, D. A.; BOTHAM, K. M.; KENNELLY, P. J.; WEIL, P. A. **Bioquímica Ilustrada de Harper**. 30 ed. Porto Alegre: McGraw Hill Brasil, 2016.

ROSINI, E. F.; SANT'ANNA, C. L.; TUCCI, A. Scenedesmaceae (Chlorococcales, Chlorophyceae) de pesqueiros da Região Metropolitana de São Paulo, SP, Brasil: levantamento florístico. **Hoehnea**. v. 40, n. 4, p. 661-678, 2013.

ROSSET, I. G.; TAVARES, M. C. H.; ASSAF, E. M.; PORTO, A. L. M. Catalytic ethanolysis of soybean oil with immobilized lipase from *Candida antarctica* and ¹H NMR and GC quantification of the ethyl esters (biodiesel) produced. **Appl Catal., A**. v. 392, p. 136-142, 2011.

ROSSET, I. G.; CAVALHEIRO, M. C. H. T.; ASSAF, E. M.; PORTO, A. L. M. Enzymatic esterification of oleic acid with aliphatic alcohols for the biodiesel production by *Candida antarctica* lipase. **Catal Lett**. v. 143, p. 863-872, 2013.

RUFFING, A. M. Improved free fatty acid production in cyanobacteria with *Synechococcus* sp. PCC 7002 as host. **Front Bioeng Biotechnol**. v. 2, p. 17, 2014.

SAKARIKA, M.; KORNAROS, M. Effect of pH on growth and lipid accumulation kinetics of the microalga *Chlorella vulgaris* grown heterotrophically under sulfur limitation. **Bioresource Technol**. v. 219, p. 694-701, 2016.

SALEH, J.; TREMBLAY, A. Y.; DUBÉ, M. A. Glycerol removal from biodiesel using membrane separation technology. **Fuel**. v. 89, n. 9, p. 2260-2266, 2010.

SANI, Y. M.; DAUD, W. M. A. W.; AZIZ, A. R. A. Biodiesel feedstock and production technologies: successes, challenges and prospects. **InTech**. v. 4, p. 77-101, 2013.

SANTANA, A.; JESUS, S.; LARRAYOZ, M. A.; FILHO, R. M. Supercritical carbon dioxide extraction of algal lipids for the biodiesel production. **Procedia Eng**. v. 42, p. 1755-1761, 2012.

SANT'ANNA, C. L.; MELCHER, S. S.; CARVALHO, M. C.; GEMELGO, M. C. P.; AZEVEDO, M. T. P. Planktic Cyanobacteria from Upper Tietê Basin Reservoirs, São Paulo, **Brazil Braz J Bot**. v. 30, n. 1, p. 1-17, 2007.

SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P.; WERNER, V. R.; DOGO, C. R.; RIOS, F. R.; CARVALHO, L. R. Review of toxic species of cyanobacteria in Brazil. **Algol Stud**. v. 126, p. 251-265, abr. 2008.

SANTOS, R. D.; GAGLIARDI, A. C. M.; XAVIER, H. T.; MAGNONI, C. D.; CASSANI, R.; LOTTENBERG, A. M. P.; CASELLA FILHO, A.; ARAÚJO, D. B.; CESENA, F. Y.; ALVES, R. J.; FENELON, G.; NISHIOKA, S. A. D.; FALUDI, A. A.; GELONEZE, B.; SCHERR, C.; KOVACS, C.; TOMAZZELA, C.; CARLA, C.; BARRERA-ARELLANO,

D.; CINTRA, D.; QUINTÃO, E.; NAKANDAKARE, E. R.; FONSECA, F. A. H.; PIMENTEL, I.; SANTOS, J. E.; BERTOLAMI, M. C.; ROGERO, M.; IZAR, M. C. O.; NAKASATO, M.; DAMASCENO, N. R. T.; MARANHÃO, R.; CASSANI, R. S. L.; PERIM, R.; RAMOS, S. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. **Arq Bras Cardiol.** v. 100, n. 1, p. 1-40, jan. 2013.

SARAVANAN, R.; MADHIVANAN, N.; SARAVANANE, R. Studies on microalgae bioengineering: From CO₂ fixation to lipid extraction. **J Eng Technol** v. 3, n. 4, p. 1884-1887, abr. 2016.

SARPAL, A. S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; SILVA, P. R. M.; LIMA, G. M.; SILVA, S. R.; MONTEIRO, T. V.; CUNHA, V. S.; DARODA, R. J. Determination of lipid content of oleaginous microalgal biomass by NMR spectroscopic and GC–MS techniques. **Anal Bioanal Chem.** v. 407, n. 13, p. 3799-3816, 2015.

SARPAL, A. S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; SILVA, P. R. M.; MONTEIRO, T. V. C.; SILVA, J. I.; CUNHA, V. S.; DARODA, R. J. NMR techniques for determination of lipid content in microalgal biomass and their use in monitoring the cultivation with biodiesel potential. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 100, n. 5, p. 2471-2485, 2016.

SCHLAGERMAN, P.; GÖTTLICHER, G.; DILLSCHNEIDER, R.; ROSELLO-SASTRE, R.; POSTEN, C. Composition of algal oil and its potential as biofuel. **J Combust.** v. 2012, p. 1-14, 2012.

SCHULZE, C.; REINHARDT, J.; WURSTER, M.; ORTIZ-TENA, J. G.; SIEBER, V.; MUNDT, S. A one-stage cultivation process for lipid-and carbohydrate-rich biomass of *Scenedesmus obtusiusculus* based on artificial and natural water sources. **Bioresource Technol.** v. 218, p. 498-504, 2016.

SFRISO, A. A.; MARCHETTO, D.; GALLO, M.; BALDI, F. Biochemical characterization of some cyanobacterial strains from salt marshes of the Venice Lagoon. **J Appl Phycol.** v. 26, n. 1, p. 273-278, 2014.

SHIN, H.; RYU, J.; BAE, S.; CROFCHECK, C.; CROCKER, M. Lipid extraction from *Scenedesmus* sp. microalgae for biodiesel production using hot compressed hexane. **Fuel.** v. 130, p. 66-69, 2014.

SILVA, J. B.; RODRIGUES, J. A. J.; NONO, M. C. A. **Caracterização de materiais catalíticos.** 2008. Qualificação (Doutorado em Engenharia e Tecnologia Espaciais/Ciência e Tecnologia de Materiais e Sensores) - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), São José dos Campos - SP, 2008.

SILVA, J. C.; SILVA, J.; MENDONÇA, S.; FERNANDES, M. Caracterização de *Chlorella vulgaris* produzida na algafarm e suas potencialidades como suplemento alimentar. In: CONGRESSO DE NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO, 14., 2015, Lisboa. **Resumos...** Lisboa: Acta Portuguesa de Nutrição, 2015. p. 44.

SILVA, J. M.; FARIAS, B. S.; GRÜNDMANN, D. D. R.; CADAVAL JR., T. R. S.; MOURA, J. M.; DOTTO, G. L.; PINTO, L. A. A. Development of chitosan/*Spirulina* bio-blend films and its biosorption potential for dyes. **J. Appl Polym Sci.** v. 134, n. 11, p. 1-8, 2017.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Espectrometria no Infravermelho. In: SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; IBARRA, L. C. C.; FIORESI, T. B. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) em laboratório utilizando meio chu₁₂ e de macrófita com NPK. **B Inst Pesca.** v. 35, p. 111-118, 2009.

SIZER, F.; WHITNEY, E. **Nutrição: "conceitos e controvérsias"** Manole: Barueri-SP, 2003, p. 502-504.

SMITH, V. H.; STURM, B. S. M.; DENOYELLES, F. J.; BILLINGS, S. A. The ecology of algae biodiesel production. **Trends Ecol Evol.** v. 25, n. 5, p. 301-309, 2010.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica.** 10 ed. John Wiley & Sons, 2011.

SOUZA, M. F.; RODRIGUES, M. A.; BON, E. P. S.; FREITAS, S. P. Cultivo e hidrólise enzimática da microalga *Chlorella sorokiniana*. In: Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 12., 2016, Rio Grande do Sul. **Resumos...** Enzitec, 2016.

STEHFEST, K.; TOEPEL, J.; WILHELM, C. The application of micro-FTIR spectroscopy to analyze nutriente stress-related changes in biomass composition of phytoplankton algae. **Plant Physiol Biochem.** v. 43, p. 717-726, 2005.

STILLWELL, W. **An introduction to biological membranes: from bilayers to rafts.** Elsevier: San Diego, 2013.

SUALI, E.; SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. **Renew Sust Energy Rev.** v. 16, n. 6, p. 4316-4342, 2012.

SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P. **Parâmetros físico-químicos para os processos de produção de biodiesel**. Brasília, DF: CNPq, 2015. 216 p.

SYDNEY, E. B.; DA SILVA, T. E.; TOKARSKI, A.; NOVAK, A. C.; DE CARVALHO, J. C.; WOICIECOHWSKI, A. L. Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. **Appl Energ.** v. 88, n. 10, p. 3291-3294, 2011.

TANG, D.; HAN, W.; LI, P.; MIAO, X.; ZHONG, J. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. **Bioresource Technol.** v. 102, n. 3, p. 3071-3076, 2011.

TEIXEIRA, C. M. **Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel**. 2006. Disponível em:
<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/agroenergia+_PDeI_Biodiesel_Al gas_000g6f3kcwr02wx5ok0o71pxt430fm5w.pdf>. Acesso em: 25 maio 2015.

THORMAR, H. **Lipids and essential oils as antimicrobial agents**. John Wiley & Sons, 2011.

TIAN, K.; LI, Z. High-yielding, one-pot, and green production of biodiesel from waste grease using wet cells of a recombinant *Escherichia coli* strain as catalyst. **Biochem Eng J.** v. 115, p. 30-37, 2016.

TINOCO, N. A. B.; UEKANE, T. M.; TSUKUI, A.; AGUIAR, P. F.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; REZENDE, C. M. Generation of volatile compounds from carotenoids of *Dunaliella bardawil* algae by water bath heating and microwave irradiation. **J Braz Chem Soc.** v. 27, n. 8, p. 1452-1458, 2016.

TRIANA, J.; MONTAGUDT, A.; SIURANA, M.; FUENTE, D.; URCHUEGUÍA, A.; GAMERMANN, D.; TORRES, J.; TENA, J.; CÓRDOBA, P. F.; URCHUEGUÍA, J. F. Generation and evaluation of a genome-scale metabolic network model of *Synechococcus elongatus* PCC7942. **Metabolites.** v. 4, n. 3, p. 680-698, 2014.

TRINCONE, A. Marine biocatalysts: enzymatic features and applications. **Mar Drugs.** v. 9, n. 4, p. 478-499, 2011.

VANTHOOR-KOOPMANS, M.; WIJFFELS, R. H.; BARBOSA, M. J.; EPPINK, M. H. M. Biorefinery of microalgae for food and fuel. **Bioresource Technol.** v. 135, p. 142-149, 2013.

VEILLETTE, M.; GIROIR-FENDLER, A.; FAUCHEUX, N.; HEITZ, M. Esterification of free fatty acids with methanol to biodiesel using heterogeneous catalysts: from model acid oil to microalgae lipids. **Chem Eng J.** v. 308, p. 101-109, 2017.

VIDAL JUNIOR, E. A. **Obtenção de óleo extraído da microalga *Chlorella* sp.** 2014. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

VIÊGAS, C. C. **Extração e caracterização dos lipídeos da microalga *Chlorella pyrenoidosa* visando à produção de ésteres graxos.** 2010. 89 f. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) - Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2010.

VISÃO. **Aventura Creoula [18]: A lenda das algas.** (2013). Disponível em: <<http://visao.sapo.pt/ambiente/opiniaoverde/aexpansoportugalseculoxxi/aventura-creoula-18-a-lenda-das-algas=f743899>>. Acesso em: 08 mar. 2017.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica.** 4 ed. Porto Alegre, Artmed, 2013.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica: A vida em nível molecular.** Artmed, 2014.

WAGNER, I.; STEINWEG, C.; POSTEN, C. Mono-and dichromatic LED illumination leads to enhanced growth and energy conversion for high-efficiency cultivation of microalgae for application in space. **Biotechnol J.** v. 11, p. 1060-1071, 2016.

WANG, B.; WANG, J.; ZHANG, W.; MELDRUM, D. R. Application of synthetic biology in cyanobacteria and algae. **Front Microbiol.** v. 3, p. 1-15, set. 2012.

WARDLAW, G. M.; SMITH, A. M. **Nutrição contemporânea.** AMGH Editora, 2013.

WIJFFELS, R. H.; KRUSE, O.; HELLINGWERF, K. J. Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. **Curr Opin Biotechnol.** v. 24, n. 3, p. 405-413, 2013.

WOJCIECHOWSKI, J.; STRAUBE, A.; CAVALCANTE, K. P.; MIRANDA, F. E. **Isolamento e cultivo de microalgas.** 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/270452268_Isolamento_e_cultivo_de_microalgas>. Acesso em: 28 nov. 2016.

WU, H.; MIAO, X. Biodiesel quality and biochemical changes of microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* in response to nitrate levels. **Bioresource Technol.** v. 170, p. 421-427, 2014.

XAVIER, H. T.; IZAR, M. C.; FARIA NETO, J. R.; ASSAD, M. H.; ROCHA, V. Z.; SPOSITO, A. C.; FONSECA, F. A.; DOS SANTOS, J. E.; SANTOS, R. D.; BERTOLAMI, M. C.; FALUDI, A. A.; MARTINEZ, T. L. R.; DIAMENT, J.; GUIMARÃES, A.; FORTI, N. A.; MORIGUCHI, E.; CHAGAS, A. C. P.; COELHO, O. R.; RAMIRES, J. A. F. Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arq Bras Cardiol.** v. 101, n. 4, p. 1-22, out. 2013.

XIA, L.; LI, H.; SONG, S. Cell surface characterization of some oleaginous green algae. **J Appl Phycol.** v. 28, n. 4, p. 2323-2332, 2016.

XU, Y.; ZHENG, X.; YU, H.; HU, X. Hydrothermal liquefaction of *Chlorella pyrenoidosa* for bio-oil production over Ce/HZSM-5. **Bioresource Technol.** v. 156, p. 1-5, 2014.

YAO, L.; LEE, S.; WANG, T.; GERDE, J. A. Comparison of lipid extraction from microalgae and soybeans with aqueous isopropanol. **J Am Oil Chem Soc.** v. 90, n. 4, p. 571-578, 2013.

YU, X.; ZHAO, P.; HE, C.; LI, J.; TANG, X.; ZHOU, J.; HUANG, Z. Isolation of a novel strain of *Monoraphidium* sp. and characterization of its potential application as biodiesel feedstock. **Bioresource Technol.** v. 121, p. 256-262, 2012.

ZERAATKAR, A. K.; AHMADZADEH, H.; TALEBI, A. F.; MOHEIMANI, N. R.; MCHENRY, M. P. Potential use of algae for heavy metal bioremediation, a critical review. **J Environ Manage.** v. 181, p. 817-831, 2016.

ZHAO, X. Q.; XU, X. N.; CHEN, L. Y. Chapter Seven-Production of Enzymes from Marine Actinobacteria. **Adv Food Nutr Res.** v. 78, p. 137-151, 2016.

ZHENG, J.; INOBUCHI, T.; SASAKI, S.; MAEDA, Y.; MCCARTY, M. F.; FUJII, M.; IKEDA, N.; KOBAYASHI, K.; SONODA, N.; TAKAYANAGI, R. Phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis* protect against diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v. 304, n. 2, p. R110-R120, 2013.

ZUORRO, A.; MIGLIETTA, S.; FAMILIARI, G.; LAVECCHIA, R. Enhanced lipid recovery from *Nannochloropsis* microalgae by treatment with optimized cell wall degrading enzyme mixtures. **Bioresource Technol.** v. 212, p. 35-41, 2016.