

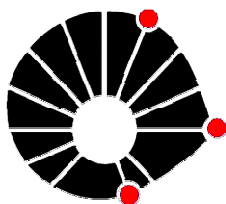
UNICAMP

ÉRIKA MARQUES REIS

**“TRANSESTERIFICAÇÃO *IN SITU* VIA ETANÓLISE DO ÓLEO DE LEVEDURA
PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL”**

CAMPINAS – SP

2013



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PROCESSOS**

ÉRIKA MARQUES REIS

**“TRANSESTERIFICAÇÃO *IN SITU* VIA ETANÓLISE DO ÓLEO DE LEVEDURA
PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL”**

Orientadora: Profa. Dra. Telma Teixeira Franco

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Química.

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química apresentada e aprovada pela banca examinadora em 30 de Outubro de 2013.

Profa. Dra. Telma Teixeira Franco

CAMPINAS – SP,

Outubro, 2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

R277t Reis, Érika Marques, 1987-
Transesterificação *in situ* via etanolise do óleo de levedura para a produção de biodiesel / Érika Marques Reis. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Telma Teixeira Franco.
Coorientador: Gustavo Paim Valença.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Biodiesel. 2. Transesterificação. 3. Levedura. 4. Óleo – Indústria. 5. Óleos e gorduras. I. Franco, Telma Teixeira, 1957-. II. Valença, Gustavo Paim, 1960-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: In situ transesterification by ethanolysis of yeast oil for biodiesel production

Palavras-chave em inglês:

Biodiesel
Transesterification
Yeast
Oil industry
Oils and fats

Área de concentração: Engenharia de Processos

Titulação: Mestra em Engenharia Química

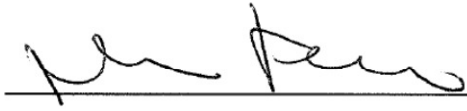
Banca examinadora:

Telma Teixeira Franco [Orientador]
Renato Grimaldi
Jamal da Silva Chaar

Data de defesa: 30-10-2013

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Érika Marques Reis e aprovada em 30 de Outubro de 2013 pela banca examinadora constituída pelos doutores (as)



Profª . Dra. Telma Teixeira Franco

Orientadora

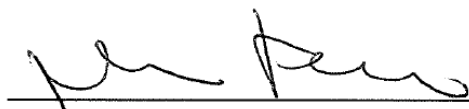


Dr. Renato Grimaldi



Prof Dr. Jamal Chaar

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida pela aluna Érika Marques Reis e aprovada em 30 de Outubro de 2013 pela comissão.

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and curves, positioned above a horizontal line.

Profa. Dra. Telma Teixeira Franco

困難や苦勞は喜んで受け止めるとき自分が
向上するチャンスとなる。

*Quando você lida com alegria diante das
dificuldades e sofrimentos, surge uma chance para
o seu crescimento pessoal.*

Ao Marcelo Shyuichi Koba

Dedico

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento principal é a Deus por todo cuidado, força, sabedoria e saúde que me proporcionou para o término deste trabalho.

A minha Família, Luzia Marques, Paulo Marques, Carol Correia e meu Noivo Marcelo Koba.

A minha orientadora Telma Teixeira Franco por toda orientação e confiança para a conclusão deste trabalho.

Ao meu amigo e colaborador Renato Grimaldi por todo o empenho para a execução deste trabalho.

Aos amigos do laboratório LEBBPOR da FEQ (Andrea, Renato, Michelle, Eulália, Alessandro, Lucy, Mônica, Bianca, Vinicius, Talita, Anna, Verônica e Liliana) pela amizade e companheirismo e aos amigos Laboratório de Óleos e Gorduras da FEA-LOG.

Ao Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração da FEQ, Adilson e Kelly.

Ao Prof. Jamal Chaar, Relem e aos amigos do Laboratório de Combustíveis da Universidade Federal do Amazonas pela as análises e amostra cedida.

Ao Professor Everson da FEQ pelo empréstimo do reator.

A secretária Rosângela da DEPRO/FEQ.

A todos os amigos da FEQ e FEA especialmente ao Erik Miyasaki e Camilia A. dos Santos.

Aos amigos Amazonenses e Paraenses pelos momentos de descontração e amizade: Cleyson, Max, Jack, Naime, Bruna, Hector, Luiza Martins, Debora Kono, John Rosi e Corina Sepeda.

Aos amigos de Campinas, Holiness, ABU especialmente a Érika Gomes e Pedro Ivo da Casa Douglas.

*Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser, mas graças a Deus, não somos o que éramos. **Martin Luther King***

RESUMO

A procura por combustíveis renováveis tem aumentado e o óleo vegetal transesterificado (biodiesel) surge como alternativa mais promissora em relação ao petróleo e seus derivados, superando problemas de matrizes energéticas e ambientais. A obtenção do biodiesel é de interesse estratégico, por sua viabilidade econômica e a fácil adaptação no mercado de combustíveis. As principais matérias-primas do biodiesel são espécies vegetais oleaginosas com diferentes níveis de produtividade e adaptação a cada região do Brasil. Além das plantas oleaginosas, leveduras, fungos e microalgas são capazes de acumular lipídios, desempenhando papel fundamental na substituição de biodiesel oriundo de vegetais. A Agência Nacional de Petróleo (ANP) permitiu a incorporação de 10% de biodiesel ao diesel promovendo grande aumento na demanda de biodiesel. O presente trabalho tem como proposta investigar a transesterificação convencional e *in situ* da levedura *Lipomyces starkeyi* por rota etílica na presença de catalisadores (NaOH e H₂SO₄) para obtenção de biodiesel. No presente estudo a concentração mássica de lipídios de *L. starkeyi* pelo método Bligh & Dyer (51,15% ± 1,48) e o efeito do solvente sobre a extração lipídica por Soxhlet de *L. starkeyi* (hexano 2,36%, clorofórmio: metanol (44,75%) e etanol (32,76%) e Butt (hexano 26,18%, clorofórmio: metanol (40,81%) e etanol (30,19%) foram estudados. A eficiência da extração está relacionada diretamente com a polaridade do solvente. A composição do óleo foi determinada pela esterificação a ésteres metílicos e analisados por cromatografia gasosa. O óleo de *L. starkeyi* é composto basicamente por seis ácidos graxos entre 14 e 18 carbonos, com baixo grau de insaturação, característica desejável para a produção de biodiesel. A caracterização do óleo foi determinada por métodos teóricos e experimentais. A determinação de acilgliceróis por cromatografia líquida de alta performance por exclusão de tamanho do óleo observou-se que o hexano e clorofórmio: metanol obtiveram maior concentração de triacilglicerídios que o etanol. As transesterificações *in situ* catálise ácida foi analisada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas

Palavras – chave: Biodiesel, transesterificação, levedura, *Lipomyces starkeyi*.

ABSTRACT

The demand for renewable fuels has increased and transesterified vegetable oil (biodiesel) emerges as a promising alternative to oil and its derivatives, overcoming problems of energy and environmental matrices. Obtaining biodiesel is of strategic interest for its economic viability and the easy adaptation of the fuel market. The main raw materials of vegetable oil biodiesel are species with different levels of productivity and adaptation to each region of Brazil. In addition to the oil plants, yeasts, microalgae and fungi are able to accumulate lipids, playing a key role in the replacement of biodiesel derived from vegetable. The National Petroleum Agency (ANP) has allowed the incorporation of 10 % biodiesel to diesel promoting large increase in demand for biodiesel . This paper aims to investigate the transesterification *in situ* and conventional yeast *Lipomyces starkeyi* by ethyl route in the presence of catalysts (NaOH and H₂SO₄) to obtain biodiesel . In this study the mass concentration of lipids of *L. starkeyi* method by Bligh & Dyer (51.15% ± 1.48) and the effect of solvent on the extraction of lipids by Soxhlet (2.36% hexane , chloroform : methanol (44.75%) and ethanol (32.76 %) and Butt (26.18% hexane , chloroform : methanol (40.81 %) and ethanol (30,19 %) were studied the extraction efficiency is directly related to the polarity of the solvent . The oil composition was determined by esterification to methyl esters and analyzed by gas chromatography. The oil *L. Starkeyi* is basically composed of six fatty acids between 14 and 18 carbons, with a low degree of unsaturation , a desirable characteristic for the production of biodiesel . The characterization of the oil was determined by theoretical and experimental methods. The determination of glycerides by liquid chromatography high performance size exclusion of the oil showed that the hexane and chloroform: methanol showed higher concentration of triacylglycerols that ethanol. The transesterifications *in situ* acid catalysis was analyzed by gas chromatography- mass spectrometry.

Words - Keys: Biodiesel, transesterification , yeast , *Lipomyces starkeyi* .

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	xxvii
ÍNDICE DE FIGURAS	xxix
CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO.....	1
1. OBJETIVOS	2
1.1 Objetivo Geral.....	2
1.2 Objetivos Específicos.....	2
CAPÍTULO 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Produção de Biocombustíveis.....	3
2.2 Fontes Microbianas.....	4
2.3 Estrutura e Composição Química de Óleos e Gorduras	5
2.4 Métodos de Extração de Lipídios: Soxhlet versus Bligh & Dyer.....	6
2.5 Produção de Biodiesel	7
2.6 Vias Catalíticas para a Transesterificação Convencional de Óleos com Álcool Etílico	9
2.6.1 Catálise Ácida.....	9
2.6.2 Catálise Básica	10
2.7 Transesterificação <i>in situ</i>	12
2.8 Propriedades Físico-Químicas de Óleos e Gorduras.....	13
2.8.1 Teor de Umidade	13
2.8.2 Índice de Acidez.....	14
2.8.3 Índice de lodo	14
2.8.4 Índice de Saponificação.....	14

CAPÍTULO 3- EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE <i>L. starkeyi</i>	15
3.1 Introdução	15
3.2 Material	18
3.2.1 Reagentes	18
3.3 Procedimento Experimental de Extração de Lipídios.....	18
3.3.1 Biomassa	18
3.3.2 Bligh & Dyer.....	18
3.3.3 Soxhlet.....	19
3.3.4 Butt	19
3.3.5 Extração por Hidrolise Celular em Autoclave.....	19
3.3.6 Cálculo da Polaridade dos Solventes	20
3.3.7 Análise das células de <i>L. starkeyi</i> em Microscopia Eletrônica de Varredura com Energia Dispersiva (MEV/EDS).....	21
3.4 Procedimento Experimental Análises e Caracterizações do Óleo	22
3.4.1 Determinação de Triacilgliceróis, Diacilgliceróis e Monoacilgliceróis por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho por Exclusão de Tamanho.	22
3.4.2 Determinação da Composição de Triacilgliceróis (TAGs).....	22
3.4.3 Composição em Ácidos Graxos do Óleo	23
3.4.4 Cálculo da Massa Molar do Óleo	24
3.4.5 Índice de Acidez.....	25
3.4.6 Cálculo do Índice de Iodo	25
3.4.7 Cálculo do Índice de Saponificação	26
3.4.8 Determinação do Conteúdo de Fósforo	26
3.4.9 Viscosidade	27
3.4.10 Densidade.....	28

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS.....	29
3.5.1 Análise das células de <i>L. starkeyi</i> em Microscopia Eletrônica de Varredura com Energia Dispersiva (MEV/EDS).....	31
3.6. RESULTADOS E DISCUSSÃO CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO	35
3.6.1 Composição do óleo	35
3.6.2 Determinação de Triacilgliceróis (TAG), Diacilgliceróis (DAG) e Monoacilgliceróis (MAG) no óleo de levedura por Cromatografia Líquida de Alta Performance por exclusão de tamanho	36
3.6.3 Determinação da Composição de Triacilgliceróis (TAGs).....	37
3.6.4 Análises Físico-Químicas do Óleo	41
3.7 Conclusão	44
CAPÍTULO 4- OBTENÇÃO DO BIODIESEL DE <i>L. starkeyi</i>	45
4.1 Introdução	45
4.2 Material	46
4.2.1 Reagentes	46
4.3 Procedimento Experimental	46
4.3.1 Transesterificação In Situ Metílica	46
4.3.2 Transesterificação In Situ Etílica.....	46
4.3.3 Transesterificação Etílica Convencional do Óleo Previamente Extraído Por Bligh&Dyer.....	47
4.3.4 Transesterificação Etílica Convencional do Óleo Previamente Extraído Por Butt	48
4.3.5 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	49
4.3.6 Identificação dos Produtos de Reação e dos Compostos Presentes na Biomassa e Óleo por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	50

4.3.7 Identificação dos Ésteres Etílicos Obtidos Por Cromatografia Gasosa com Detector de Massas.....	53
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.4.1 Identificação e Quantificação dos Produtos de Reação por FT-IR	53
4.4.2 Identificação dos Ésteres Etílicos Obtidos Por Cromatografia Gasosa com Detector de Massas.....	62
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
7. ANEXO.....	76
7.1 Cromatogramas dos Perfis TAG.....	76
7.2 Cromatogramas HPSEC	82
7.3 Cromatograma CG-EM	90
7.4 Cromatografia em Camada Delgada.....	98

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Principais origens de óleos.	3
Tabela 2. Composição em Ácidos Graxos de Alguns Microrganismos.....	4
Tabela 3. Composição típica de alguns óleos vegetais (%).	6
Tabela 4. Materiais empregados na reação de transesterificação <i>in situ</i>	13
Tabela 5. Valores de polaridades utilizadas no cálculo da mistura de solventes.....	21
Tabela 6. Representação dos ácidos graxos utilizados na identificação dos grupos de TAG.....	23
Tabela 7. Massas molares dos ácidos graxos utilizados no cálculo da MMM_{LV}	24
Tabela 8. Efeito do solvente sobre a extração lipídica de <i>L. starkeyi</i>	29
Tabela 9. Perfil qualitativo de MEV/EDS da biomassa de <i>Lipomyces starkeyi</i> em base seca.....	34
Tabela 10. Composição em ácidos graxos (%) da <i>L. starkeyi</i>	35
Tabela 11. Composição percentual dos acilgliceróis da <i>L. starkeyi</i> pelos métodos Soxhlet, Butt e Hidrólise Celular em Autoclave.	36
Tabela 12. Composição percentual dos TAGs da <i>L. starkeyi</i> por diferentes solventes de extração (contínua).....	38
Tabela 13. Composição percentual dos TAGs da <i>L. starkeyi</i> por diferentes solventes de extração (conclusão).	39
Tabela 14. Caracterização do óleo <i>L. starkeyi</i>	42
Tabela 15. Condições utilizadas nas reações.....	47
Tabela 16. Condições utilizadas na reação de esterificação do óleo.....	49
Tabela 17. Dados para construção da curva de calibração FT-IR.....	50
Tabela 18. Dados obtidos por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).	54
Tabela 19. Principais regiões identificadas no FTIR.....	56
Tabela 20. Perfil em ácidos graxos etílico.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Molécula de triglicerídeo composta (a) de um ácido graxo monoinsaturado e (b) exclusivamente, de ácidos graxos saturados (WUST, 2004).	5
Figura 2. Fluxograma do processo de produção do biodiesel. Adaptado de (PARENTE, 2003).	8
Figura 3. Representação do mecanismo das etapas envolvidas na transesterificação de óleos vegetais com etanol, considerando-se a catálise ácida. R', R'' e R''', grupos alquila; HX, ácido prótico (catalisador) Fonte: (SILVA, 2005).	10
Figura 4. Representação do mecanismo da reação de transesterificação com óleo vegetal e etanol via catalise básica para obtenção do biodiesel. R', R'' e R''', grupos alquilas; B, base (catalisador). Fonte: (SILVA, 2005).	11
Figura 5. Composição e estrutura da parede celular (OSUMI, 1998).	17
Figura 6. Fluxograma geral do método de extração de lipídios por hidrólise celular em autoclave.	20
Figura 7. Biomassa sem nenhum processo de extração em 600, 2000 e 6000x (a), (b) e (c); Clorofórmio:Metanol em 2000, 6000 e 12000x (d), (e) e (f); Hexano em 2000, 6000 e 12000x (g), (h) e (i); Etanol em 2000, 6000 e 12000x (j), (l) e (m).	32
Figura 8. Biomassa após o tratamento ácido em autoclave (a) .Biomassa após a extração e recuperação do hexano (b).	33
Figura 9. Espectros de FTIR para a curva padrão.	51
Figura 10. Espectros de FTIR das amostras H1, H2, H3, H4, H5.	57
Figura 11. Espectros de FTIR das amostras O ₁ , O ₂ e A ₀₁ ,	58
Figura 12. Espectros de FTIR das amostras <i>in situ</i> metílica e etílica.	59
Figura 13. Espectros do óleo e da biomassa.	61
Figura 14. H ₁ , H ₂ , H ₃ , H ₄ e H ₅ transesterificação <i>in situ</i> variando temperatura (70-80 °C) e H ₂ SO ₄ (1 -2%); P ₂ : Padrão ácido oleico; P ₄ : Padrão de metil heptadecanoato	98
Figura 15. 5A E 2A: Amostra extraída por Bligh Dyer (2% H ₂ SO ₄ á 70 ° C); <i>In situ</i> 1,2e 3 transesterificação <i>in situ</i> 70°C com 100% H ₂ SO ₄ P ₂ : Padrão ácido oleico; P ₄ : Padrão de metil heptadecanoato.	99

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO

Devido ao possível esgotamento das reservas mundiais de petróleo ainda neste século e às preocupações ambientais crescentes, há grande demanda por fontes não convencionais de combustível para os motores movidos a diesel e gasolina (origem fóssil). O biodiesel foi recentemente considerado o melhor candidato para a substituição do diesel por ser utilizado em qualquer motor de ignição por compressão, sem necessidade de modificação (LEUNG; WU; LEUNG, 2010). No Brasil, o Programa Nacional do Álcool (PROALCOOL) foi criado com o intuito de prover alternativa para frota leve, entretanto os veículos pesados, como caminhões e ônibus, ainda utilizam o diesel como combustível.

A instabilidade das grandes regiões exportadoras de petróleo provocou o aumento do preço para os combustíveis fósseis e seus derivados. Além disso, grandes quantidades de CO₂ são emitidas pela combustão dos mesmos. Por razões ambientais e econômicas, a obtenção de biocombustíveis a partir de biomassa é considerada uma possibilidade de integrar essas tecnologias nas plantas industriais existentes (STAMENKOVIĆ; VELIČKOVIĆ; VELJKOVIĆ, 2011).

Os óleos de microrganismos constituem uma alternativa promissora para a produção de biodiesel, pois, dependendo da cepa microbiana, altos níveis de lipídios podem ser alcançados. Além disso, a produção destes microrganismos não necessariamente compete com a produção de alimentos, visto que resíduos diversos podem ser utilizados como fontes de carbono (LONG et al., 2013; SAIDUR et al., 2011; VICENTE et al., 2009).

Nas leveduras os lipídios são acumulados dependendo das condições de cultivo, variando na concentração e sua composição. Este trabalho visa estudar a produção de biodiesel por via etílica utilizando a levedura oleaginosa *Lipomyces starkeyi*. Propondo a reação de transesterificação *in situ* etílica que elimina o processo de extração do óleo com solvente.

Essa dissertação está dividida em 7 capítulos: Capítulo 1: Introdução; Capítulo 2: Revisão Bibliográfica; Capítulo 3: Extração de Lipídios de *L. starkeyi* e Caracterização

do Óleo; Capítulo 4: Processos de Obtenção do Biodiesel; Capítulo 5: Conclusões e Trabalhos Futuros; Capítulo 6: Referências Bibliográficas e Capítulo 7: Anexos.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

- Avaliar a produção de biodiesel microbiano por transesterificação etílica.

1.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o óleo de levedura quanto a sua viabilidade de utilização como matéria prima para a produção de biodiesel;
- Avaliar e comparar a conversão das reações de transesterificação *in situ* e convencional;
- Estudar o efeito do etanol sobre o rendimento e o tempo de conclusão da reação de transesterificação;
- Estimar o rendimento dos ésteres etílicos obtidos na reação de transesterificação por infravermelho próximo;
- Determinar o perfil dos ésteres etílicos por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectroscopia de massas (CG-EM).

CAPÍTULO 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS

A produção mundial de biocombustíveis tem aumentado, principalmente devido às preocupações com segurança energética e mudanças climáticas (SAIDUR et al., 2011; SANTORI et al., 2012; TAKESHITA, 2011). Os lipídios, incluindo as gorduras animais e óleos vegetais, são as principais matérias-primas para produção de biodiesel. Os animais e microrganismos são capazes de sintetizá-los com o armazenamento compacto de energia e gordura, enquanto respiram, liberando certa quantidade de CO₂ (XIONG et al., 2010).

As gorduras de animais, embora mencionadas com frequência, não têm sido estudadas na mesma intensidade que os óleos vegetais. Elas contêm maior concentração de ácidos graxos saturados e, portanto, são sólidas à temperatura ambiente (SINGH; SINGH, 2010). As fontes mais comuns de biodiesel estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Principais origens de óleos.

Óleos Vegetais	Óleos não-comestíveis	Gorduras de Animais	Outras Fontes
Amendoim			
Arroz			Algas
Canola		Banha	Bactérias
Cevada	Andiroba	Gordura de Aves	Fungos
Coco	Babaçu	Óleo de peixe	Látex
Girassol	Cumarú	Sebo	Microalgas
Sementes de algodão			Óleo de cozinha usado
Soja			
Babaçu			

Fonte: Adaptada de SINGH; SINGH (2010).

Muitas críticas surgiram em relação aos biocombustíveis de primeira geração por concorrerem com a produção de alimentos, elevando o consumo de água, degradando o solo, reduzindo a biodiversidade e liberando pouca energia (RAWAT et al., 2013; TAKESHITA, 2011). Os óleos comestíveis representam mais de 95% das matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel, o que aumenta o custo dos óleos e do biodiesel. Para superar estas desvantagens, pesquisadores estão interessados em fontes não-comestíveis de óleos (LEUNG et al., 2010).

A indústria de biodiesel compete com a indústria de alimentos (plantas oleaginosas) devido à grande quantidade de terra necessária para alcançar a produção industrial de biocombustíveis (soja ou girassol). É necessário explorar novas matérias-primas que reduzam o preço do biodiesel, sem competir com a produção de alimentos (VICENTE et al., 2009).

2.2 FONTES MICROBIANAS

Assim como os óleos vegetais, os de origem microbiana começaram a ser estudados devido à semelhança na estrutura e composição dos ácidos graxos. Em microrganismos, o acúmulo e a composição de lipídios é influenciado pela constituição genética e por fatores como condições de cultura (temperatura, pH, tempo, etc) e composição do meio, etc. (Tabela 2) (MENG et al., 2009).

Tabela 2. Composição em Ácidos Graxos de Alguns Microrganismos.

Microrganismos	Composição em Ácidos Graxos (%)					
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Microalgas	12–21	55–57	1–2	58–60	4–20	14–30
Leveduras	11–37	1–6	1–10	28–66	3–24	1–3
Fungos	7–23	1–6	2–6	19–81	8–40	4–42
Bacteria	8–10	10–11	11–12	25–28	14–17	--

Fonte: (MENG et al., 2009).

Óleos microbianos podem ter grande potencial na produção de biodiesel devido à composição de ácidos graxos. Bactérias, leveduras, fungos e algas capazes de

acumular mais de 20% de lipídios (peso seco) são classificados como oleaginosos (AGEITOS et al., 2011; KARATAY; DÖNMEZ, 2011). Microrganismos também produzem óleos comestíveis, ricos em ácidos graxos poliinsaturados, de grande demanda (suplementos dietéticos e para a nutrição infantil). Recentemente, alguns trabalhos têm relatado o uso de microrganismos oleaginosos para produção de biodiesel que podem ser cultivados em biorreatores convencionais (HUANG et al., 2013; VICENTE et al., 2009).

2.3 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE ÓLEOS E GORDURAS

Os óleos de diferentes fontes têm distintas composições de ácidos graxos. Os triacilgliceróis são ésteres de três ácidos graxos e um glicerol (ALLINGER, 1976). Os lipídios são um grupo de substâncias biológicas compostos principalmente de substâncias não polares (triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e esteróis) e compostos mais polares (ácidos graxos livres, fosfolipídios e esfingolipídios) que se ligam covalentemente aos carboidratos e proteínas para formar glicolipídios e lipoproteínas (MANIRAKIZA; COVACI; SCHEPENS, 2001).

Os ácidos graxos são ácidos monocarboxílicos alifáticos. Salvo algumas exceções, todos ácidos encontrados na natureza são de alta massa molar, de cadeia linear, saturados e insaturados. A maioria dos ácidos graxos encontrados em gorduras tem número par de carbonos na cadeia, e quando insaturados, na maioria das vezes, têm a configuração *cis* (BOBBIO, 1989). A Figura 1 representa a estrutura de duas moléculas de triacilgliceróis.

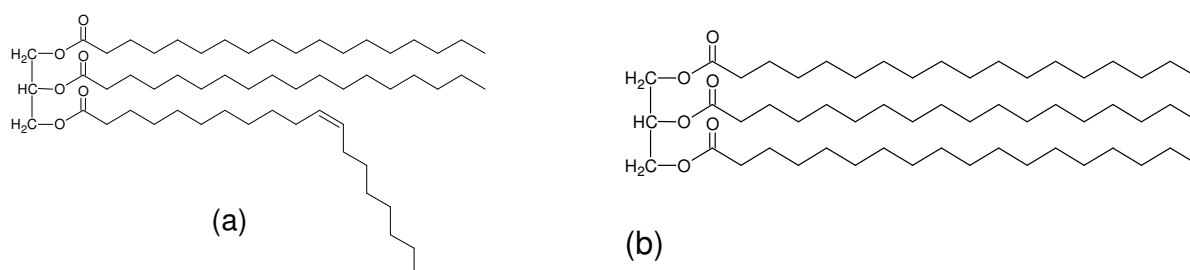


Figura 1. Molécula de triglicerídeo composta (a) de um ácido graxo monoinsaturado e (b) exclusivamente, de ácidos graxos saturados (WUST, 2004).

A Tabela 3 ilustra a composição típica dos óleos vegetais comumente utilizados no processamento de alimentos e produção de gorduras hidrogenadas.

Tabela 3. Composição típica de alguns óleos vegetais (%).

Ácido graxo		Soja	Palma	Girassol	Oliva
Ac. Láurico	C12:0	0	0,1	0	0
Ac. Mirístico	C14:0	0	0,7	0	0
Ac. Palmítico	C16:0	11,3	36,7	6,2	11,6
Ac. Palmitoléico	C16:1	0,1	0,1	0,1	1,0
Ac. Esteárico	C18:0	3,6	6,6	3,7	3,1
Ac. Oléico	C18:1	24,9	46,1	25,2	75,0
Ac. Linoléico	C18:2	53	8,6	63,1	7,8
Ac. Linolênico	C18:3	6,1	0,3	0,2	0,6
Ac. Araquídico	C20:0	0,3	0,4	0,3	0,3
Ac. Gadoléico	C20:1	0,3	0,2	0,2	0
Ac. Behênico	C22:0	0	0,1	0,7	0,1
Ac. Erúcico	C22:1	0,3	0	0,1	0
Ac. Lignocérico	C24:0	0,1	0,1	0,2	0,5

Fonte: Adaptada de RAMOS, FERNANDEZ *et al.*, (2009).

A análise da composição de ácidos graxos por métodos cromatográficos constitui o primeiro passo para a identidade do óleo bruto (COSTA NETO *et al.*, 2000).

2.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS: SOXHLET VERSUS Blich & DYER

Estudos da decomposição de peixes levaram ao desenvolvimento de um método simples e rápido para a extração e purificação de lipídios a partir de materiais biológicos. Todo o procedimento pode ser efetuado em cerca de 10 minutos. O tecido é homogeneizado com uma mistura de clorofórmio e metanol em proporções tais que um sistema miscível é formado com a água no tecido, as fases são separadas em fase rica em lipídios (clorofórmio) e a fase metanólica contendo os não lipídios. O extrato lipídico

é obtido pelo isolamento da fase de clorofórmio. O método foi aplicado para músculo de peixe e pode facilmente ser adaptado para usar com os outros tecidos (BLIGH; DYER, 1959).

A extração de Soxhlet é uma técnica convencional bem conhecida. Solventes não convencionais (isopropanol, álcool etílico, hidrocarbonetos, e mesmo água) menos agressivos ao ambiente, saúde e segurança devem ser utilizados, entretanto, podem ter menor afinidade pelo soluto (WANG; WELLER, 2006).

As vantagens da extração convencional de Soxhlet são: (1) o deslocamento do equilíbrio de transferência repetidamente trazendo o solvente fresco ao contato com a matriz contínua (2) mantém temperatura relativamente alta (DE CASTRO; GARCIA-AYUSO, 1998). As principais desvantagens incluem o longo tempo da extração; grande quantidade de solvente usada; (3) exigindo um procedimento de evaporação/concentração; e (4) a possibilidade de decomposição térmica dos compostos, uma vez que a extração ocorre geralmente no ponto de ebulição do solvente por muito tempo (WANG; WELLER, 2006).

De acordo com a literatura as extrações apresentadas, ambas apresentam vantagens e desvantagens. A utilização de elevadas quantidades de solventes por Soxhlet é evitada ao final do processo pela recuperação do solvente. Um co-solvente pode ser empregado e separado por destilação simples ou fracionada, sendo a degradação térmica evitada com controle adequado da temperatura. O método de extração Bligh & Dyer utiliza solventes extremamente tóxicos, mas apresenta uma maior eficiência de extração.

Os solventes usados na extração dos lipídios devem solubilizar todos os lipídios e ser suficientemente polares para removê-los das membranas (lipoproteína e glicolipídios) (MANIRAKIZA et al., 2001).

2.5 PRODUÇÃO DE BIODIESEL

O biodiesel é obtido pela reação de transesterificação, onde os óleos são combinados com álcool e quimicamente alterados para formar ésteres de ácidos graxos, tal como éster metílico. A obtenção do biodiesel está representada no fluxograma abaixo (Figura 2).

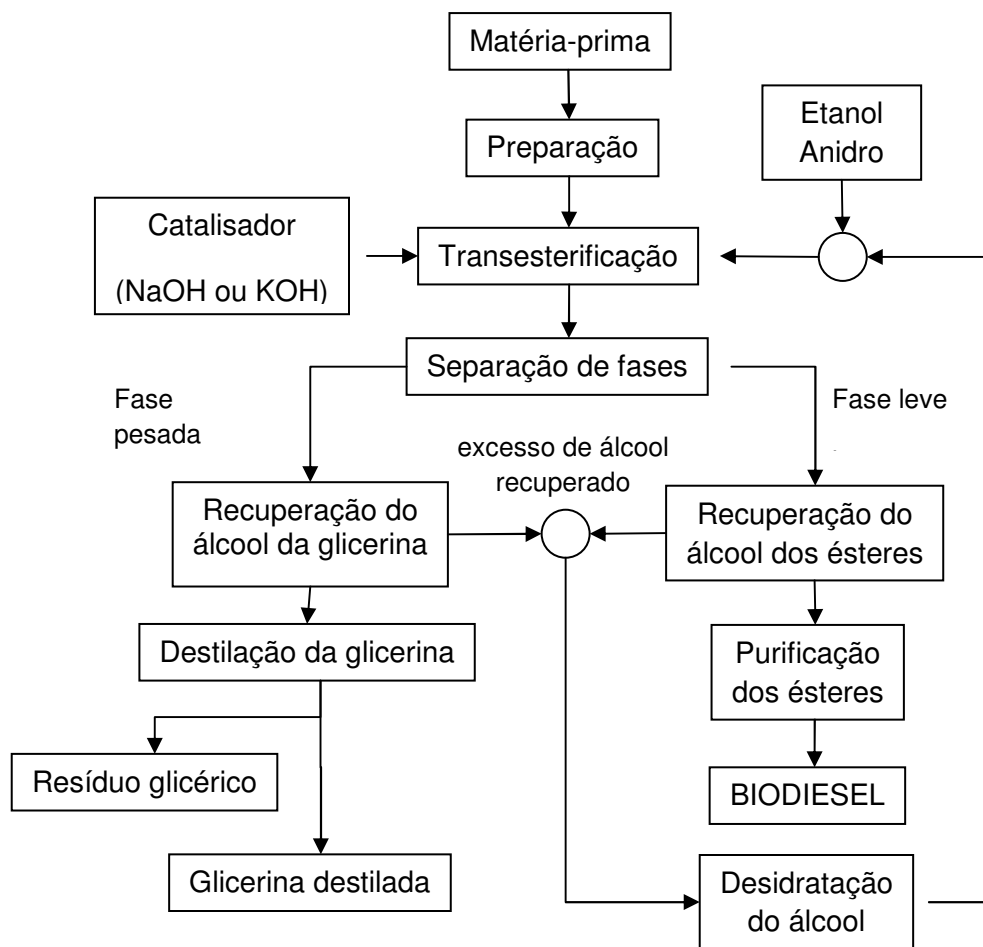


Figura 2. Fluxograma do processo de produção do biodiesel. Adaptado de (PARENTE, 2003).

O preparo da matéria-prima para a produção de biodiesel deve incluir condições favoráveis para a reação de transesterificação alcançando, assim, maior taxa de conversão possível. Necessariamente, a matéria-prima deve apresentar mínimos possíveis teores de umidade e acidez, após os processos de desumidificação e de neutralização. Posteriormente realiza-se a reação de transesterificação (transformação dos óleos ou gorduras em ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, constituintes do biodiesel). Após a fase de transesterificação obtém-se a massa reacional final constituída por duas fases, separáveis por decantação ou centrifugação. A fase mais densa é composta de glicerina bruta, impregnada de álcool, água, e impurezas inerentes à matéria-prima. A fase mais leve é constituída de uma mistura de ésteres

etílicos ou metílicos, conforme a natureza do álcool originalmente adotado, também impregnado de excessos reacionais de álcool e impurezas (PARENTE, 2003).

Os catalisadores são normalmente usados para melhorar a taxa de reação e rendimento. Excesso de álcool é usado para deslocar o equilíbrio para o produto devido à natureza reversível da reação (MA; HANNA, 1999). Para esta finalidade são usados alcoóis primários e secundários alifáticos tendo 1-8 átomos de carbono (SINGH; SINGH, 2010).

2.6 VIAS CATALÍTICAS PARA A TRANSESTERIFICAÇÃO CONVENCIONAL DE ÓLEOS COM ÁLCOOL ETÍLICO

2.6.1 Catálise Ácida

A transesterificação com catalisador ácido é um processo usado quando ácidos graxos livres estão presentes na matéria prima. Normalmente, o catalisador para essa reação é ácido sulfúrico concentrado (LEUNG et al., 2010). O mecanismo de transesterificação de óleos vegetais com etanol via catálise ácida por ácido de Bronsted está representado na Figura 3.

A Etapa 1 representa a protonação da carbonila do éster gerando uma espécie com estrutura ressonante (Etapa 2). O carbocátion formado sofre um ataque nucleofílico do etanol, gerando um intermediário tetraédrico (Etapa 3). Um rearranjo do intermediário tetraédrico permite a formação da primeira molécula de éster etílico e a regeneração do catalisador (Etapa 4) que então poderá reagir com a segunda molécula de mono ou diacilgliceróis, que quando gerados retornam ao ciclo como substratos. Ao final, tem-se a mistura de ésteres etílicos e glicerina (SILVA, 2005).

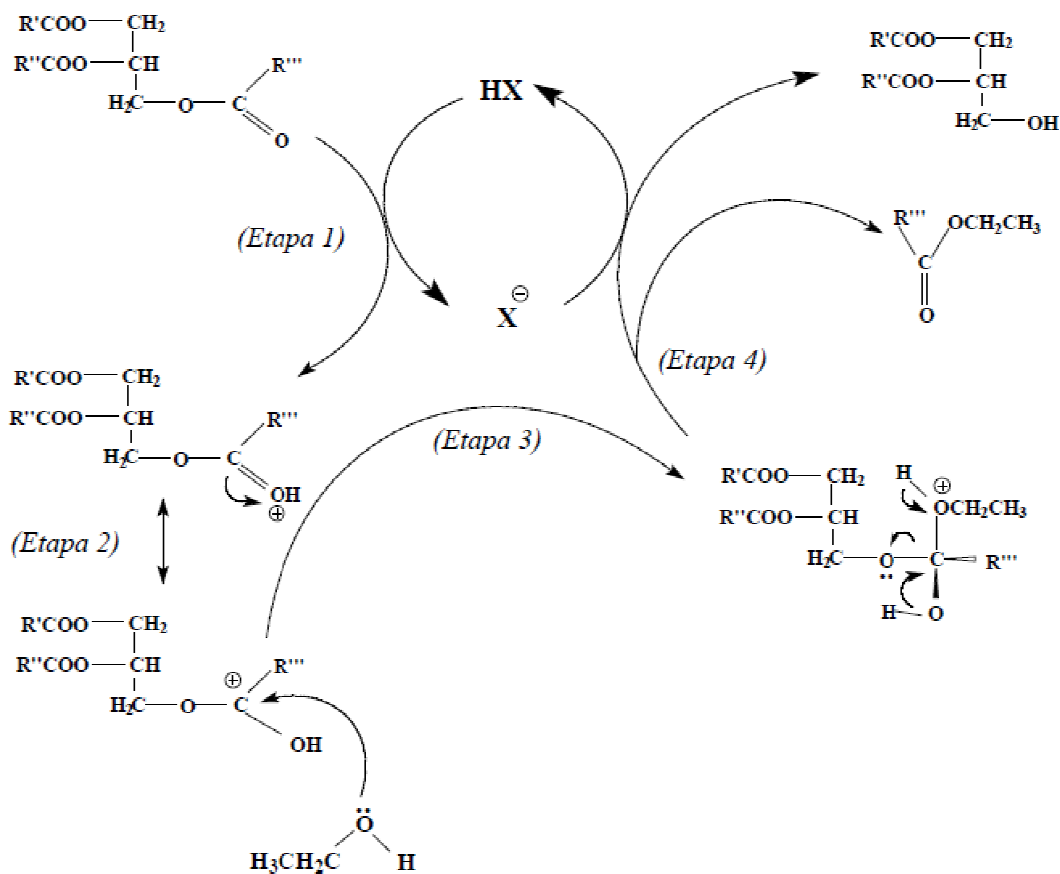


Figura 3. Representação do mecanismo das etapas envolvidas na transesterificação de óleos vegetais com etanol, considerando-se a catálise ácida. R', R'' e R''', grupos alquila; HX, ácido prótico (catalisador) Fonte: (SILVA, 2005).

2.6.2 Catálise Básica

O mecanismo da reação de transesterificação catalisada por álcalis é formulado em três etapas. O glicerídeo e o álcool devem ser anídeos, pois a água desloca a reação para a saponificação. Na maioria dos casos, os catalisadores alcalinos têm sido utilizados após os ácidos graxos livres terem sido removidos previamente, como sabão e resíduos (SINGH; SINGH, 2010). O mecanismo de transesterificação do óleo vegetal com etanol em meio básico está apresentado na Figura 4.

A acidez e basicidade dos álcoois são aspectos importantes no comportamento químico destes compostos. Os álcoois apresentam caráter básico devido à existência

de elétrons não compartilhados no oxigênio do grupo OH. Estes elétrons permitem que os álcoois aceitem prótons, formando álcoois protonados capazes de funcionar como substratos na substituição nucleofílica. Os álcoois também apresentam caráter ácido que pode ser explicado pela polaridade da ligação O – H, facilitando a liberação do hidrogênio na forma de próton (MORRISON, 1990).

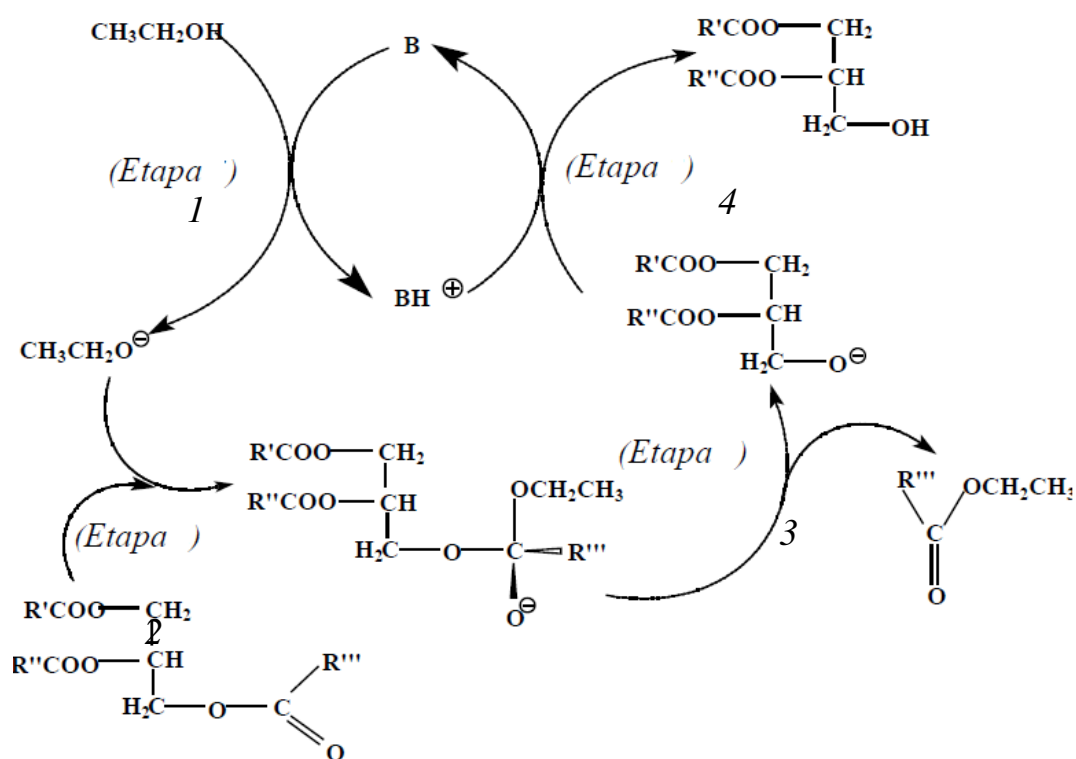


Figura 4. Representação do mecanismo da reação de transesterificação com óleo vegetal e etanol via catalise básica para obtenção do biodiesel. R', R'' e R''', grupos alquilas; B, base (catalisador). Fonte: (SILVA, 2005).

A primeira etapa (Etapa 1) consiste na reação da base com etanol, formando o ânion $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}^-$ e o catalisador protonado; a seguir, há o ataque nucleofílico do grupo etóxido ao carbono carboxílico de um dos fragmentos éster do triacilgliceról, formando um intermediário tetraédrico (Etapa 2); este se rearranja para formar a primeira

molécula de éster etílico e o ânion correspondente do diacilgliceróis (Etapa 3); o catalisador é regenerado de acordo com a Etapa 4, podendo então reagir com a segunda molécula de etanol, iniciando mais um ciclo de reação o substrato passa a ser o diacilgliceróis diacilgliceróis e, no terceiro, o monoacilgliceróis (SILVA, 2005). Ao final obtém-se a mistura de ésteres etílicos e glicerina.

2.7 TRANSESTERIFICAÇÃO *IN SITU*

A transesterificação *in situ* difere da reação convencional, pois a extração do lipídeo e a transesterificação ocorrem simultaneamente. O álcool age como solvente de extração e como reagente de esterificação. Esta rota reduz custos associados à extração simplificando os passos na produção de ésteres (HINCAPIÉ; MONDRAGÓN; LÓPEZ, 2011).

A transesterificação *in situ* de óleos foi investigada por HARRINGTON; CATHERINE (1985) que compara o processo convencional e o *in situ* por catálise ácida para o óleo de semente de girassol maceradas com resultados superiores a 40% na transesterificação *in situ* e 30% na transesterificação convencional. SILER-MARINKOVIC; TOMASEVIC, (1998) estudaram diversas condições de reação *in situ* de sementes de girassol, tais como razão molar de álcool e óleo, catalisador, tempo, temperatura e rendimento. A composição dos ésteres da reação *in situ* foi à mesma da transesterificação convencional mostrando que os produtos são adequados como substitutos ao diesel.

A transesterificação do óleo de sementes vegetais é convencionalmente realizada após a extração do mesmo com o álcool apropriado, na presença de ácido ou catalisador alcalino. A quantidade de catalisador utilizado depende da acidez do óleo (GEORGOGIANNI et al., 2008). Diversos estudos relataram esterificação *in situ* de sementes vegetais (Tabela 4).

Tabela 4. Materiais empregados na reação de transesterificação *in situ*.

Matéria-prima	Via	Referência
Semente de Girassol	Metanol/ H ₂ SO ₄	(HARRINGTON; D'ARCY-EVANS, 1985)
	Metanol/ H ₂ SO ₄	(SILER-MARINKOVIC; TOMASEVIC, 1998)
	Metanol/ Etanol/ NaOH	(GEORGOGIANNI et al., 2008)
Canola	Metanol/KOH	(HAAGENSON et al., 2010)
Pinhão Manso	Etanol/ NaOH/ Brometo de cetiltrimetil amônio	(HAILEGIORGIS; MAHADZIR; SUBBARAO, 2011)
Lodo	Metanol/H ₂ SO ₄	(MONDALA et al., 2009)
Arroz	Metanol/ NaOH	(LEI et al., 2010)
Mamona	Etanol/ H ₂ SO ₄ / NaOH	(HINCAPIÉ et al., 2011)
Algas	Metanol/ H ₂ SO ₄	(EHIMEN; SUN; CARRINGTON, 2010)

De acordo com as referências citadas na Tabela 4 a transesterificação *in situ* diminui o volume de solvente utilizado, pois evita a etapa de extração, mas o tempo de reação e o rendimento do biodiesel é necessário maior estudo da alcoólise etílica *in situ* de ácidos graxos microbianos.

2.8 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE ÓLEOS E GORDURAS

2.8.1 Teor de Umidade

Teor de umidade é a quantidade de água livre na amostra. Alto teor de umidade resulta em menor solubilidade do óleo na fase alcoólica (redução de rendimento dos ésteres etílicos). Para amostra de óleos recém-refinados, o teor de umidade é inferior a 0,5 % (WUST, 2004). A presença de água torna os ésteres etílicos mais miscíveis em glicerina dificultando a etapa de separação e purificação.

2.8.2 Índice de Acidez

A acidez livre de um óleo decorre da hidrólise parcial dos triacilgliceróis, razão pela qual não é uma constante ou característica, mas, sim, uma variável intimamente relacionada com a natureza e a qualidade da matéria-prima, com a qualidade e o grau de pureza do óleo, com o processamento e com as condições de conservação da gordura (MORETTO, 1989).

2.8.3 Índice de Iodo

Índice de iodo é o número de gramas de iodo absorvido por cem gramas de gordura ou óleo, proporcionando a medida do grau de insaturação das gorduras extraídas com éter ou, ainda, medida do grau de insaturação dos ácidos graxos presentes na gordura. Em determinadas condições, o iodo pode ser quantitativamente introduzido nas duplas ligações dos ácidos graxos insaturados e triacilgliceróis. Quanto maior o número de insaturações de um ácido graxo, maior será a sua capacidade de absorção de iodo e, conseqüentemente, maior será o índice de iodo (MORETTO, 1989)

2.8.4 Índice de Saponificação

O índice de saponificação é definido como o peso (em miligramas) de hidróxido de potássio (KOH), necessários para saponificar os ácidos graxos, resultantes da hidrólise de um grama da amostra. Esse índice é inversamente proporcional à massa molecular média dos ácidos graxos dos triacilgliceróis presentes. É importante para demonstrar a presença de óleos e gorduras de alta proporção de ácidos graxos e de baixa massa molecular, em misturas com outros óleos e gorduras. Quanto menor a massa molecular do ácido graxo, tanto maior será o índice de saponificação. Gorduras vegetais que apresentam elevados índices de saponificação são indicados para fins alimentares (MORETTO, 1989).

CAPÍTULO 3- EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE *L. STARKEYI*.

3.1 INTRODUÇÃO

Os processos de extração de bioprodutos são a chave para a obtenção de produtos de elevada qualidade, mas devido à diversidade dos produtos que podem ser obtidos, não existe uma técnica de aplicação geral (SCHMIDELL et al., 2001). Quando o processo de extração é utilizado para óleos, busca-se alcançar os seguintes objetivos: i) obter a gordura ou óleo intacto e insentos de impurezas indesejáveis; ii) obter o maior rendimento possível sem alterar o custo do processo; iii) produzir o mínimo de resíduos e que este apresente o maior valor agregado possível. A escolha do método ideal para extração, em larga escala de óleo, deve obedecer a certos parâmetros: facilidade com que a célula se rompe, custo do método, velocidade de ruptura celular e etc. (LASSING et al., 2008).

Os lipídios neutros estão ligados covalentemente e podem ser extraídos dos tecidos por solventes apolares. Lipídios polares, os quais estão ligados por forças eletrostáticas e pontes de hidrogênio, requerem solventes polares capazes de quebrar tais ligações e liberá-los (BRUM; DE ARRUDA; REGITANO-D'ARCE, 2009). A extração por Butt é contínua (DAUN, 2004), sendo o solvente aquecido e evaporado diretamente pela câmara de extração, condensando, gotejando-se sobre a parte superior do cartucho de celulose assim lixiviando a fração lipídica dissolvida no balão (Brum, 2004). A vantagem desse método é a fácil recuperação dos lipídios (MEHLENBACHER, 1958).

Na extração por Soxhlet o processo não é contínuo, mas em sistema de lotes com extrações repetidas, sendo que a amostra fica sempre em contato com o solvente, havendo constante renovação do mesmo. A temperatura do sistema mantém-se relativamente alta, possibilitando a extração de maior quantidade de óleo em relação a outros métodos, sem a necessidade de filtração da micela após o término da extração, uma vez que a amostra esteve envolta em cartucho durante todo o procedimento (DE CASTRO; GARCIA-AYUSO, 1998).

HALIM, DANQUAH *et al.*, (2012) e colaboradores analisaram diferentes opções em escala laboratorial para a extração de lipídios de microalgas. A atuação do solvente

de extração com a matriz celular foi explicada em 5 etapas. A primeira etapa é o contato das células com o solvente orgânico. O solvente orgânico penetra na membrana celular para o citoplasma e interage com os lipídios neutros semelhantes, através de interações de Van der Waals (etapa 2), formando um complexo de lipídios - solvente orgânico (etapa 3). Estes complexos orgânicos lipídios - solventes, acionados por um gradiente de concentração, difundem através da membrana da célula (etapa 4) e o solvente orgânico forma uma película em torno da célula (etapa 5). Conseqüentemente, os lipídios neutros são extraídos para fora das células e permanecem dissolvidos no solvente orgânico apolar. Através da interação entre solvente orgânico e a parede celular é formado o filme.

MIDDELBERG, A. P. J. (1995), relatou diversos métodos combinados e individuais para ruptura de microrganismo para o produto intracelular (isolado por uma parede celular), permitindo assim a recuperação subsequente do produto. Estes incluem métodos físicos, químicos, enzimáticos e mecânicos. O conhecimento da estrutura da parede celular é importante para selecionar um método e racionalizar os parâmetros de ruptura. Os métodos de rompimento celular para liberação dos componentes intracelulares requerem alguma da parede celular.

A destruição inespecífica é normalmente feita por meios mecânicos, enquanto que os físicos, químicos e enzimáticos são métodos mais específicos e suaves. A permeabilização química da parede celular difere na seletividade e eficiência para diferentes espécies microbianas. (GECIOVA; BURY; JELEN, 2002).

O efeito da autoclavagem na extração de óleo de amêndoas foi avaliado por (ZHANG et al., 2009). Os resultados mostraram que o pré- tratamento em autoclave aumentou a recuperação de óleo, sem afetar a composição. A autoclavagem (pressão e temperatura) provoca uma oscilação de pressão rápida perturbando a estrutura do pericarpo da semente de amêndoa e permitindo a penetração dos solventes na estrutura do pericarpo, assim reduzindo o tempo de extração.

No estudo realizado por ZUNIGA, CIOBANU *et al.*, (2012) a autoclavagem não influenciou as concentrações de ácidos graxos obtidos, em relação a extração convencional, seguida da transesterificação. Entretanto a autoclavagem resultou em menores recuperações de ácidos graxos poli-insaturados. Com transesterificação direta

pelo calor de convecção, a autoclavagem foi associada com uma perda de 9,4% de poli-insaturados e uma perda de 15,4% em docosahexaenóico (DHA).

A parede celular desempenha um papel importante no transporte dos materiais para dentro e para fora da célula. A análise de mecanismos que compõem a parede celular é, portanto, importante em biologia básica e aplicada. As proteínas são covalentemente ligadas a moléculas de glucano na parede celular tornando-a mais resistente à extração (OSUMI, 1998). A Figura 5 representa a estrutura celular de uma levedura.

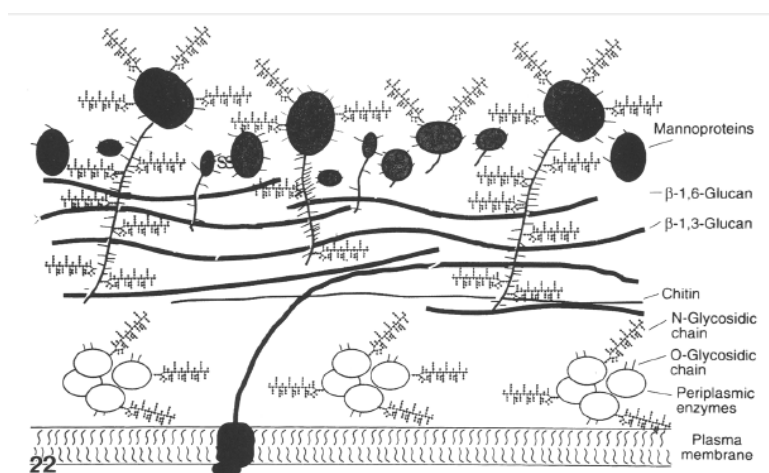


Figura 5. Composição e estrutura da parede celular (OSUMI, 1998).

De acordo com a Figura 5 a parede celular, localizada no exterior da membrana das células, é constituída por duas camadas. A camada interior, que proporciona a resistência da parede celular, é formada por β - 1,3 e 1,6 glucano que é complexado com quitina. A camada externa é constituída por manoproteínas e determina a maior parte das propriedades de superfície da célula. A maioria das manoproteínas está covalentemente ligada à glucana presente na camada interna. As enzimas periplasmáticas estão presas entre a membrana celular e a camada interior do esqueleto (OSUMI, 1998).

Nesse sentido, quatro métodos foram testadas neste trabalho: i) BLIGH & DYER, (1959) modificado por Manirakiza e colaboradores (MANIRAKIZA et al., 2001); ii) Metodologia de Soxhlet baseada em D'OCA, VIÊGAS *et al.*, (2011), iii) Metodologia de

Butt, iv) Extração por hidrólise celular em autoclave modificado de CHA, CHEN *et al.*,(2011) e LEE, YOO *et al.*,(2010).

3.2 MATERIAL

3.2.1 Reagentes

Os reagentes utilizados nesse experimento são: ácido clorídrico ACS (Ecibra, Brasil), biftalato de potássio PA (Synth, Brasil), clorofórmio (Êxodo Científica, Brasil), etanol (J.T. Bater, México), éter etílico AACS(êxodo Científica, Brasil), fenolftaleína (Nuclear, Brasil), hexano (Synth, Brasil), hidróxido potássio (Merck, Alemanha), hidróxido de sódio (êxodo científica, Brasil), metanol (Ecibra, Brasil), Tetrahidrofurano (Merck, Alemanha).

3.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL DE EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS

3.3.1 Biomassa

Amostras de *Lipomyces starkeyi* produzidas no LEBBPOR (Laboratório de engenharia Bioquímica, Biorrefino e Produtos de Origem Renovável) foram lavadas, centrifugadas a 8000 g por 10 min (Hettich Modelo Rotina 420), congeladas à 80 °C por 24 horas (So-Low Ultra freezer Modelo PV 85-13) e liofilizadas à -30 °C, 50 mmHg por 24 horas (Liobras-Modelo L101). Essas amostras foram utilizadas em todos os testes de análise de lipídios.

3.3.2 Bligh & Dyer

O total de lipídios é determinado utilizando de 300 a 500 mg de biomassa liofilizada após digestão ácida com 5mL de HCl 2M, á 80°C por 1 hora. O processo de extração começa com a adição de 4 mL de solução metanol:clorofórmio (2:1 v/v) à biomassa, com posterior agitação em vortex por 2 minutos, adição de 2 mL de clorofórmio e agitação por 2 minutos. Para gerar um sistema de duas fases líquidas, 3,6 mL de água foram adicionados e o sistema foi agitado novamente por 2 minutos. As

fases foram separadas por centrifugação por 10 minutos a 2000 rpm. A fase inferior foi transferida a um balão de 25 mL usando seringa. Uma segunda extração foi realizada utilizando 4 mL de uma solução 10% (v/v) de metanol em clorofórmio em agitador vortex por 2 minutos. Após centrifugação, as fases clorofórmicas foram reunidas (1º e 2º extrato). O clorofórmio foi evaporado em evaporador rotatório e o resíduo seco em estufa a 60°C por um dia. O teor final de lipídeo final foi quantificado.

3.3.3 Soxhlet

Amostras de 11 g de biomassa liofilizada foram adicionadas ao cartucho de celulose e extraídas por 8 h em aparelho Soxhlet com 200 mL de solvente. Após a extração, o solvente é evaporado sob pressão reduzida e a fração lipídica é seca a peso constante em estufa. Três solventes foram testados: i) clorofórmio: metanol (2:1, v/v), ii) etanol e iii) hexano), sendo observado em média 30 ciclos para hexano e clorofórmio: metanol e 8 ciclos para etanol na câmara de extração. Os experimentos foram realizados em duplicata.

3.3.4 Butt

Amostras de 14 g biomassa liofilizada foram extraídas por 6 horas em extrator Butt contendo 200 mL de solvente, conforme procedimento detalhado para extração Soxhlet.

3.3.5 Extração por Hidrolise Celular em Autoclave

Amostras de 15 g de biomassa liofilizada são tratadas com 150 mL de ácido clorídrico 3 mol/L, obedecendo uma razão de 1:10 biomassa/ácido, em Erlenmeyer de 500 mL. Autoclavado por 30 min à 121 °C foram adicionados 165 mL de hexano e agitação de 50 rpm por 12 h em em agitador magnético (Fisatom 752). A seguir, as fases foram separadas, sendo a fase superior (hexano) removida e recuperada por evaporação sob pressão reduzida em Rotavapor IKA-RV 10 (Alemanha), a fração lipídica foi seca a peso constante em estufa e quantificada gravimetricamente em percentagem de peso seco. Essa metodologia está detalhada no fluxograma apresentado na Figura 6.

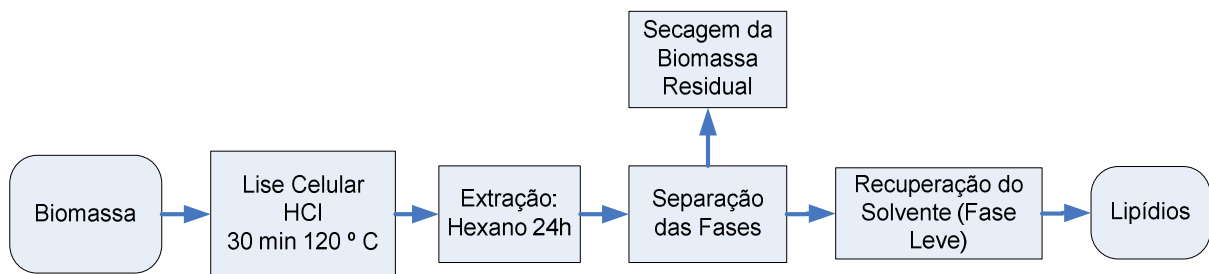


Figura 6. Fluxograma geral do método de extração de lipídios por hidrólise celular em autoclave.

3.3.6 Cálculo da Polaridade dos Solventes

A capacidade de interação amostra-solvente é dada pela polaridade, a qual é resultado de quatro tipos de interação: dispersão, dipolo, ligação de hidrogênio e interações dielétricas. Assim, solventes polares preferencialmente atraem e dissolvem partes polares enquanto que solvente apolares preferencialmente atraem e dissolvem partes apolares.

A força de um solvente é diretamente relacionada com a sua polaridade (Tabela 5) enquanto que para misturas de solventes, a polaridade é a média aritmética dos valores dos solventes puros que compõem a mistura, ponderados de acordo com a fração de volume de cada solvente SNYDER et al., (1979).

Nesse sentido, os diferentes solventes testados foram comparados em função da polaridade. Para a mistura binária de solventes a e b, a polaridade foi calculada como demonstrado na Equação 1:

$$P' = \phi_a P_a + \phi_b P_b \quad (1)$$

Onde: ϕ_a , ϕ_b correspondem à fração de volume da mistura de cada solvente; P é a polaridade correspondente ao solvente.

Tabela 5. Valores de polaridades utilizadas no cálculo da mistura de solventes.

Solventes	Polaridade (Snyder et al., 1997)
Hexano	0,1
Clorofórmio	4.1
Metanol	5.1
Etanol	4,3

3.3.7 Análise das células de *L. starkeyi* em Microscopia Eletrônica de Varredura com Energia Dispersiva (MEV/EDS)

Foram analisadas por MEV as amostras de biomassa após extração lipídios em soxhlet com diferentes solventes (etanol, hexano e clorofórmio:metanol (2:1 v/v)) e para a biomassa sem nenhum processo de extração (controle). As amostras foram secas até peso constante em estufa até obtenção de micrografias e microanálise elementar realizada no Microscópio Eletrônico de Varredura com Detector de Energia Dispersiva de raios X, Modelo MEV: Leo 440i Modelo, EDS: 6070 MEV/EDS: LEO Electron Microscopy/Oxford (Cambridge, Inglaterra). O recobrimento metálico foi realizado no Sputter Coater POLARON, Modelo: SC7620 Marca: VG Microtech (Uckfield, Inglaterra). A estimativa da espessura da camada de ouro foi calculada a partir da equação:

$$Espessura = K \cdot i \cdot V \cdot t \quad (2)$$

Onde: $K=0,17 \text{ \AA/mA.Volt.s}$; $i= 3 \text{ mA}$; $V= 1 \text{ Volt}$ e $t= 180 \text{ s}$. Portanto, a espessura utilizada foi de 92 \AA .

Foram empregadas tensão de aceleração igual a 15 kV e corrente do feixe igual a 100 pA para obtenção das micrografias e 20 kV e 600 pA para obtenção dos espectros de raio X.

3.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL ANÁLISES E CARACTERIZAÇÕES DO ÓLEO

Os lipídios foram caracterizados em relação à composição triacilglicérica, composição do óleo, índice de acidez, saponificação, teor de fósforo, viscosidade e densidade.

3.4.1 Determinação de Triacilgliceróis, Diacilgliceróis e Monoacilgliceróis por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho por Exclusão de Tamanho.

Triacilgliceróis, diacilgliceróis e monoacilgliceróis foram quantificados por cromatografia líquida de alto desempenho por exclusão de tamanho (HPSEC) em cromatógrafo líquido Perkin Elmer Series 200 com detector de índice de refração Waters 2414 colunas: 1- Jorgi gel DVB 300x 7,8 mm, 500 Å ; 2- Jorgi Gel DVB 300x 7,8, 100 Å. A fase móvel utilizada foi tetrahydrofurano (THF), Fluxo de 1mL/min e volume injetado de 20 µL. As amostras de óleos foram preparada em 1,0% em tetrahydrofurano, volume de injeção da amostra 200 µL. O preparo do padrão foi realizado pesando 25 µg de ácido esteárico, 26,5 µg de monoestearina, 36,8 µg de diestearina, 32,8 µg de triestearina em 12 mL de THF correspondendo a uma solução de 1%.

3.4.2 Determinação da Composição de Triacilgliceróis (TAGs)

A composição em TAGs foi analisada em cromatógrafo a gas CGC Agilent 6850 Series GC System com detector de ionização de chama (FID). Foi utilizada coluna capilar DB-17HT Agilent Catalog 122-1811 (50%-fenilmetilpolisiloxano), com 15 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,15 µm de filme. As condições de análise foram: injeção *split*, razão de 1:100; temperatura da coluna: 250 °C, programada até 350 °C à razão de 5 °C/ min; gás de arraste: hélio, em vazão de 1,0 mL/min; temperatura do injetor: 360 °C; temperatura do detector: 375 °C; volume injetado: 1,0 µL; concentração da amostra: 100 mg/5mL de tetrahydrofurano. Os TAGs foram identificados (Tabela 6) a partir da comparação dos tempos de retenção, segundo os procedimentos de ANTONIOSI FILHO, (1995).

Tabela 6. Representação dos ácidos graxos utilizados na identificação dos grupos de TAG.

Ácido Graxo	Representação
caprílico	Cy
cáprico	C
láurico	La
mirístico	M
palmítico	P
esteárico	S
oléico	O
linoléico	L
palmitoléico	Po

3.4.3 Composição em Ácidos Graxos do Óleo

O protocolo de transesterificação foi adaptado de LEWIS, NICHOLS *et al.*, (2000). Amostras de 20 mg biomassa liofilizada foram homogeneizadas em 3 mL de solução MeOH/HCl/CHCl₃ (10:1:1, vol) e transesterificadas a 90 °C por 1 h. Os ésteres produzidos foram extraídos três vezes adicionando 2 mL de hexano:clorofórmio (4:1, v/v) e 1 mL de água, seguido de centrifugação a 2000 rpm por 10 min para separação das fases. A fase superior (hexano + metil ésteres) foi separada e tratada com sulfato de sódio anidro para retirada de umidade com posterior filtração através de membrana PTFE (0,22 µm). A amostra foi mantida a -20 °C até injeção no cromatógrafo. O padrão Supelco 37 Component FAME Mix (10mg.mL⁻¹ in CH₂Cl₂ (47885-U) contendo metil ésteres de C4:0 a C24:1 foi utilizado para identificação do tempo de retenção dos FAMES por integração dos picos. Os ácidos graxos foram identificados em um cromatógrafo a gás GC-2014 com detector de massas (Shimatzu), coluna capilar Stabilwax, 30 m, ID 0,25 milímetros, 0,25 µm. A energia de ionização de 70 eV. Hélio foi utilizado como fase móvel (15 psi, split 1/100) a temperaturas de 250 °C no injetor e 300 °C no detector. A programação da rampa de temperatura foi 50 °C por 2 min, gradiente de 10 °C/min até 180 °C, tempo de espera de 5 min a 180 °C, gradiente de 5 °C/min até 240 °C, totalizando 42

min de corrida cromatográfica. O volume injetado foi de 1 µL. O software GC-MS solution (Shimadzu, Kyoto, Japan) foi usado para análise dos cromatogramas e as livrarias Nist08 e Nist08s foi usada para comparação.

3.4.4 Cálculo da Massa Molar do Óleo

A massa molar média dos ácidos graxos constituintes do óleo de levedura (MM_{LV}) foi calculada pela composição fornecida por cromatografia a gás (CG) comparando-se sua constituição com dados de literatura. As massas molares dos ácidos graxos utilizados no cálculo de MM_{LV} foram obtidas do NIST Webbook (NIST, 2008) conforme a Tabela 7.

Tabela 7. Massas molares dos ácidos graxos utilizados no cálculo da MM_{LV}

Ácido graxo	Fórmula química	Massa Molar (g/mol)
Ácido mirístico	$C_{14}H_{28}O_2$	228,37092
Ácido palmítico	$C_{16}H_{32}O_2$	256,4241
Ácido esteárico	$C_{18}H_{36}O_2$	284,4772
Ácido palmitoleico	$C_{16}H_{30}O_2$	254,4082
Ácido oléico	$C_{18}H_{34}O_2$	282,4614
Ácido linoléico	$C_{18}H_{32}O_2$	280,4455

Fonte: (NIST, 2011).

A massa molar de óleo vegetal ou triacilglicerol foi estimada como apresentado na (Equação 3)(HALVORSEN; MAMMEL; CLEMENTS, 1993; MORAD et al., 2000; RODENBUSH; HSIEH; VISWANATH, 1999)

$$MM_o = 3 \sum x_i MM_i + 38 \quad (3)$$

Onde: MM_o é a massa molar do óleo ou triacilglicerol; x_i é a fração molar do componente i do ácido graxo constituinte no perfil cromatográfico; MM_i é a massa molar do componente i do ácido graxo constituinte no perfil cromatográfico.

A composição do óleo analisado por CG permitiu estimar a contribuição de cada grupo de ácido graxo estrutural do lipídio. Essa determinação é importante para analisar as relações estequiométricas dos componentes envolvidos na reação.

3.4.5 Índice de Acidez

Índice de acidez é definido como a quantidade de hidróxido de potássio (KOH), em mg, necessária para neutralizar os ácidos livres de 1 grama da amostra de óleo. Nesta análise, neutraliza-se a solução de solvente titulando-a com KOH usando fenolftaleína como indicador para o branco da amostra. Essa metodologia foi adaptada da AOCS Cd 3d-63 e SILVA, (2005). Dissolve-se 1 grama da amostra de óleo foi solubilizado em 125 mL da mistura dos solventes éter etílico:etanol (2:1 v/v), adicionando algumas gotas de fenolftaleína 1 % em isopropanol e titula-se a solução com NaOH 0,1 mol/L. Ao final da titulação aparece uma coloração levemente rosa. Esse procedimento é feito em duplicata. O cálculo do índice de acidez é feito através da Equação 4 e, posteriormente, divide-se por 1,99 (oléico), 2,81 (láurico) e 2,19 (palmítico), respectivamente para expressar em porcentagem de ácidos graxos livres.

:

$$IA = \frac{(A - B) \times M \times 56.1}{m} \quad (4)$$

Onde, *A* é o volume (mL) da solução de KOH gasto na titulação, *B* é o volume (mL) do branco, *M* é a molaridade da solução KOH, *m* é a massa (g) da amostra.

3.4.6 Cálculo do Índice de Iodo

O índice de iodo foi calculado com base na composição do óleo residual obtido por CG. Segundo o método oficial AOCS Cd 1c-85, o índice de iodo é dado pela Equação 5:

$$I = (\%C_{16:1} \times 0,950) + (\%C_{18:1} \times 0,860) + (\%C_{18:2} \times 1,732) + (\%C_{18:3} \times 2,616) + (\%C_{20:1} \times 0,785) + (\%C_{22:1} \times 0,723) \quad (5)$$

Onde: I é o índice de iodo, em centigramas de iodo absorvido por grama de amostra; $\% Ca:b$ é a porcentagem do ácido graxo com a carbonos e b insaturações obtida por CG.

3.4.7 Cálculo do Índice de Saponificação

O Índice de saponificação é definido como a massa (mg) de KOH requerida para saponificar um grama de óleo ou gordura, sendo calculado a partir da composição em ácidos graxos como apresentado na equação 6 (American Oil Chemist's Society, 1998, método Cd 3a-94):

$$IS = \frac{3 \times 56,1 \times 1000}{[(MMt \times 3) + 92,09] - (3 \times 18)} \quad (6)$$

onde MMt corresponde ao peso molecular médio (soma das frações molares de todos os ácidos graxos na amostra), $56,1$ significa a massa molecular de KOH e $92,09$ representa a massa molecular do glicerol.

3.4.8 Determinação do Conteúdo de Fósforo

O teor de fósforo é definido como o teor de fosfomolibdato determinado colorimetricamente, sendo a metodologia adaptada da AOCS Ca 12-55 e MORETTO(1989) e realizado em duplicata.

Nesto método, aproximadamente 1 g de óleo fundido em banho foi pesado e adicionado a 0,5 g de óxido de zinco. As amostras foram carbonizadas por 2 dias em chapa aquecedora para retirar umidade e ácido graxos livres presentes. Os cadinhos com as amostras carbonizadas foram aquecidos a 600 °C por 2 h em mufla e, resfriados temperatura ambiente. Após esta etapa, foram adicionados 5 mL de água destilada e 5 mL de HCl concentrado sobre as cinzas formadas, seguido de aquecimento em chapa aquecedora para ebulição branda dos cadinhos tampados com vidro de relógio.

Filtraram-se as cinzas em um balão volumétrico de 50 mL, utilizando água destilada quente para lavar o filtro e o cadinho, removendo as cinzas e o fósforo da solução. Em seguida, adicionou-se KOH 50% até a formação de um precipitado branco que foi neutralizado com HCl concentrado até completa dissolução do óxido de zinco completando o volume do balão com água destilada. Retirou-se uma alíquota de 10 mL de solução para um balão volumétrico de 50 mL. Acrescentando 8 mL de sulfato de hidrazina e 2 mL de molibdato de sódio. Colocou-se em banho fervente por 10 min para que ocorra a reação. Após, completou o volume com água destilada, transferindo para a cubeta de quartzo para leitura em espectrofotômetro Perkin Elmer UV/Vis Spectrometer Lambda 20 (Estados Unidos da América) no comprimento de onda de 650 nm.

A concentração de fósforo foi obtida pela curva de calibração apresentada na Equação 7, construída a partir de soluções de sulfato de hidrazina e de molibdato de sódio com a diluição de 0 à 10 mL em um balão de 50 mL. O conteúdo de fósforo em óleo (mgP/Kg) foi calculado conforme Equação 9.

$$y = 0,1731x - 0,0016 \quad (R^2 = 0,9993) \quad (7)$$

$$P = y \times \frac{f}{m} \quad (8)$$

Onde, f é o fator de diluição da amostra e m é a massa (g) da amostra.

3.4.9 Viscosidade

As amostras foram submetidas à medição da viscosidade cinemática a 40 °C empregando-se um banho termostático modelo (SCHOTT – GERATE GmbH AVS – 350 D 65719 Hofheim a. ts) CT 52 com sensor automático modelo AVS 350 (Schott, Mainz, Alemanha), segundo o método normalizado ASTM D 445-09.15 Para as amostras de óleo foi utilizado o tubo viscosímetro capilar de vidro calibrado nº 100 ($k = 0,0147$) (Schott, Mainz, Alemanha), que possui a faixa de 3 a 15 mm²/s.

Anotou-se o tempo necessário ao escoamento que posteriormente foi corrigido conforme o fator do tubo. Quanto maior for o tempo necessário ao escoamento, mais

viscosa será a amostra. A viscosidade, assim determinada, é conhecida como viscosidade cinemática sendo seu resultado expresso em centésimos de Stokes (centiStokes) O cálculo da viscosidade é feito através da Equação 9. O resultado foi, então, reportado em mm²/s. Este procedimento foi realizado em triplicata.

$$V = K \times t \text{ (mm}^2 \text{ s}^{-1}\text{)} \quad (9)$$

Onde V é viscosidade cinemática, K é constante do capilar e t é o tempo, em segundos, de escoamento do fluido.

3.4.10 Densidade

Todas as amostras foram submetidas à medição da densidade a 20 °C através de um densímetro modelo DMA 4500 (Anton Paar, Graz, Áustria), segundo o método normalizado ASTM D 4052-09.14 O resultado foi reportado em kg/m³. Este procedimento foi realizado em triplicata.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS

O método de BLIGH & DYER (1959), na versão simplificada de extração usando clorofórmio:metanol proposto primeiramente por FOLCH, *et al.*, (1957), é um método rápido para extração e purificação dos lipídios totais. Nesse sentido, os valores de teor de lipídios obtidos pelo método de Bligh & Dyer foram considerados como 100% de extração e tidos como referência para os outros métodos testados, servindo como fonte de comparação (Tabela 8). O total de biomassa obtida das fermentações de *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 foi de 538 gramas com a concentração mássica de lipídios determinada por Bligh & Dyer de $46,9 \pm 0,1$.

Tabela 8. Efeito do solvente sobre a extração lipídica de *L. starkeyi*.

Parâmetro	Solventes	Polaridade	Lipídios		Hidrólise Celular em
			Soxhlet	Butt	Autoclave
Eficiência de Extração (%)	Hexano	0,1	5,06	56,06	89,32
	Clorofórmio:				
	Metanol (2:1)	4,4	95,41	90,32	-
	Etanol	4,3	65,05	66,40	-
Massa Média de Lipídios (g)	Hexano	0,1	0,27	4,29	6,33
	Clorofórmio:				
	Metanol (2:1)	4,4	5,00	6,35	-
	Etanol	4,3	3,41	4,84	-

Os solventes empregados na extração apresentaram diferença na eficiência de extração seguindo a ordem decrescente de polaridade: clorofórmio:metanol > etanol > hexano. Resultados similares foram obtidos por MCNICHOL, MACDOUGALL *et al.*, (2012) onde solventes polares (clorofórmio:metanol (2:1), etanol e acetona) extraíram maior teor de lipídios em relação aos solventes não polares (hexano), para amostras de microalgas extraídas por Soxhlet. Os solventes polares como etanol e

clorofórmio:metanol (2:1) apresentaram maior variabilidade em relação ao teor de lipídios de outras matrizes de solventes.

Máximos valores de eficiência de extração e massa média de lipídios foram observados nas amostras extraídas com clorofórmio: metanol (2:1). Isso é explicado, pois a mistura clorofórmio:metanol possui a capacidade de extração de lipídios neutros e lipídios polares, enquanto que o hexano extrai lipídios apolares e o etanol extrai lipídios polares.

Como observado no mecanismo de atuação dos solventes não polares, Estes atuam apenas nos lipídios mais expostos com interações fracas do tipo Van der Waals, como os presentes no citoplasma, mas ainda restam lipídios que estão menos expostos e internamente ligados por ligações de hidrogênio como as associações entre os lipídios e a proteína presente na membrana. HALIM, DANQUAH *et al.*, (2012) relata um mecanismo de atuação de solventes polares e de mistura de solventes não polares com polares. O solvente orgânico apolar rodeia o complexo de lipídio e forma interações de Van der Waals com os lipídios neutros, enquanto que o solvente orgânico polar também envolve o complexo lipídico e forma ligações de hidrogênio com os lipídios polares no complexo. As ligações de hidrogênio são fortes o suficiente para deslocar a ligação dos lipídios e proteína para a membrana celular. E dissociando para longe da membrana celular.

A diferença dos métodos de extração Soxhlet e Butt na Tabela 8 está na percolação do solvente, pois com a mudança do mecanismo de extração (câmara de extração) houve aumento na solvatação, observando uma melhor eficiência quando hexano é empregado. Para os outros solventes, o resultado não foi tão significativo, pois não houve uma grande variação da porcentagem de lipídios em relação à extração por Soxhlet. Como os lipídios apresentam grande faixa de hidrofobicidade, é inviável a utilização de um único solvente para extração.

No presente trabalho com o melhoramento significativo da extração com o Hexano no sistema Butt, buscou-se uma alternativa para tornar a extração ainda mais eficiente utilizando um pré-tratamento como a Hidrólise da Biomassa em Autoclave.

O método escolhido no presente trabalho foi um tratamento termoquímico, pois combina a alta temperatura e pressão com a hidrólise ácida. Estudos sobre os efeitos

da autoclavagem na extração de ácidos graxos pela promoção da ruptura celular em microalgas foi relatado por LEE, YOO *et al.*, (2010). A hidrólise ácida é o método de pré-tratamento mais frequentemente usado para os materiais lignocelulósicos, e ácido sulfúrico é o mais frequentemente utilizado, ao passo que outros ácidos, tais como ácido clorídrico, ácido fosfórico e ácido nítrico, foram também relatados (YOUSUF, 2012).

No presente estudo observou-se um aumento significativo de 89% na extração de lipídios (Tabela 8) com o processo de hidrólise celular em comparação com os outros métodos, porém a biomassa de levedura desengordurada após esse processo não poderá ser mais utilizada para processos posteriores, como veremos na seção 3.5.2. Para o aproveitamento da biomassa residual é necessário um processo de extração mais brando e com a máxima extração de lipídios possível.

Com base na combinação das tecnologias disponíveis, o pré-tratamento pode alterar as condições da biomassa (HALIM *et al.*, 2012), dificultando a utilização da biomassa para processos posteriores. Em geral, para aplicações em alimentos, tratamentos químicos podem introduzir um elemento complicador: a contaminação da suspensão de células através de um composto ativo, resultando em maior complexidade nas operações do processo.

3.5.1 Análise das células de *L. starkeyi* em Microscopia Eletrônica de Varredura com Energia Dispersiva (MEV/EDS).

Amostras da biomassa de *L. starkeyi* foram analisadas por MEV para avaliar o processo de ruptura celular pelos diferentes solventes utilizados em Soxhlet os resultados estão apresentados na Figura 7.

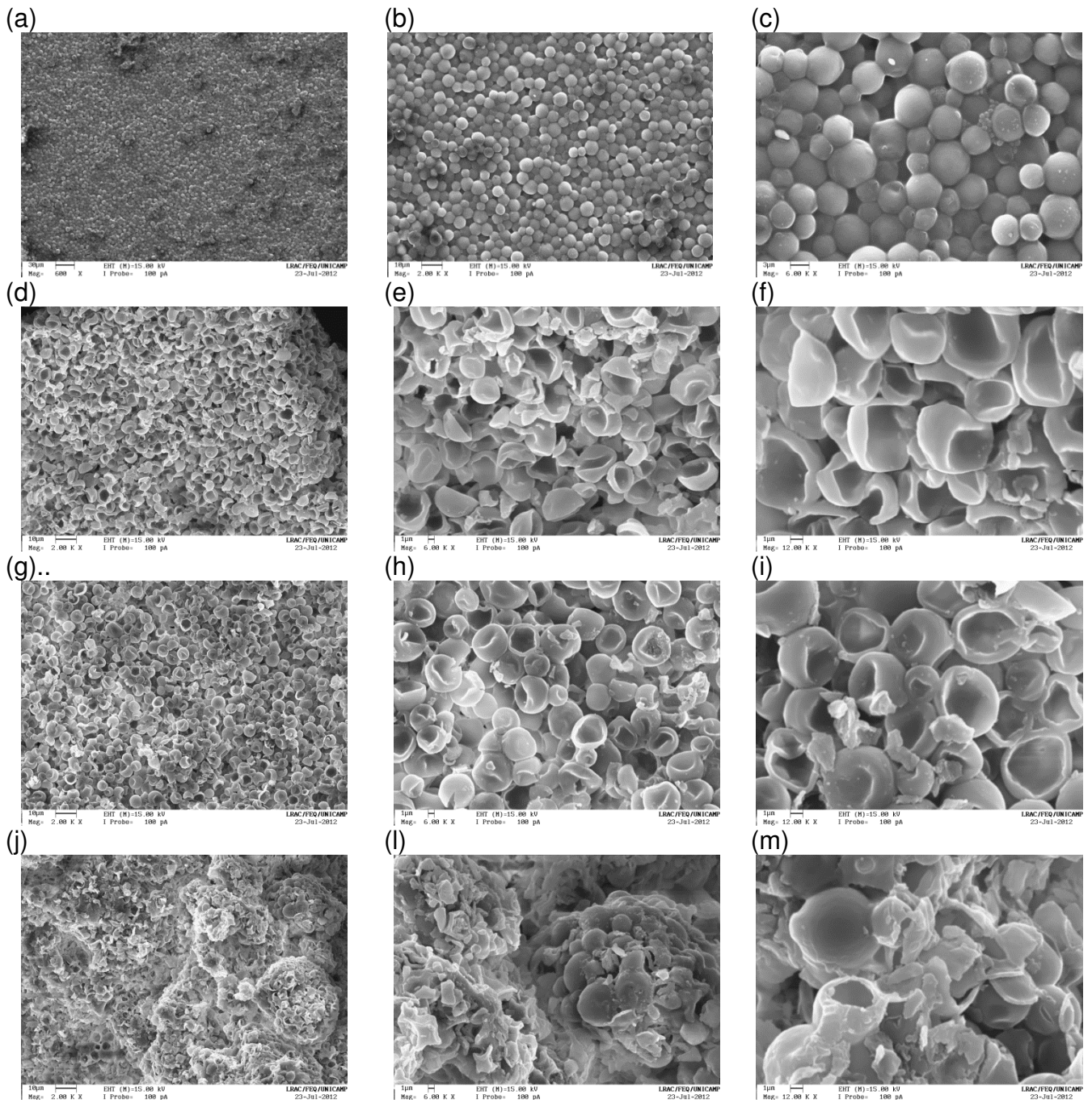


Figura 7. Biomassa sem nenhum processo de extração em 600, 2000 e 6000x (a), (b) e (c); Clorofórmio:Metanol em 2000, 6000 e 12000x (d), (e) e (f); Hexano em 2000, 6000 e 12000x (g), (h) e (i); Etanol em 2000, 6000 e 12000x (j), (l) e (m).

A estrutura celular de uma levedura apresenta biopolímeros ligados intracelularmente o que pode conferir a rigidez celular. Nas imagens (Figura 7) obtidas por MEV é possível observar células bem definidas antes de serem submetidas ao processo de extração, bem como as mudanças nas células para cada solvente testado. A utilização da técnica MEV para quantificação da lise celular não é aconselhável, pois os detritos celulares se sobrepõem uns aos outros, dificultando a análise visual das amostras, como observado nas imagens de MEV das amostras extraídas com etanol. De acordo com MIDDELBERG, A. P. J. (1995), as células são facilmente diferenciadas de detritos celulares, devido à alta resolução do método do MEV, sendo particularmente útil para *E. coli*. Para o caso de leveduras, esse método não é adequado para a monitorização do rompimento celular, pois a região de detritos se sobrepõe ao pico da célula intacta.

A biomassa residual pós extração em autoclave (Figura 8), não foi analisada por MEV, por ter ficado completamente incrustada no balão após a secagem em estufa.



Figura 8. Biomassa após o tratamento ácido em autoclave (a) .Biomassa após a extração e recuperação do hexano (b).

O MEV/EDS também pode fornecer uma análise elementar local. A distribuição espectral dos elétrons dispersos pode ser analisada separadamente. A sua posição de energia corresponde a um determinado nível atômico e, portanto, identifica um determinado elemento no interior do volume irradiado. Fornece acesso a um nível extra

de informação, isto é, a valência molecular estado de ligação, assim, em adição à sua utilidade como um instrumento para determinação da estrutura, o MEV/EDS também pode fornecer uma análise elementar local usando os sinais (ENGEL; COLLIEX, 1993). Nesse sentido, a tabela 9 fornece dados elementares da biomassa de *L. starkeyi* antes e após extração.

Tabela 9. Perfil qualitativo de MEV/EDS da biomassa de *Lipomyces starkeyi* em base seca.

Elemento (%)	Biomassa sem tratamento	Clorofórmio: Metanol	Hexano	Etanol
C	64,32	51,63	56,79	50
O	35,18	44,02	41,71	47,76
Na	0,17	1,13	0,69	1,00
Mg	0,13	-	-	-
K	0,2	1,38	0,79	1,23
P	-	0,14	-	-
Cl	-	1,69	-	-

A Tabela 9 apresenta traços de Na, Mg e K, que podem ser provenientes do meio de cultura. Dependendo do método de extração de lipídios extra ou intracelulares, diferentes resíduos podem ser gerados na biomassa, como por exemplo, a presença de Cl quando a biomassa é tratada com Clorofórmio:Metanol. A quantidade relativa de carbono diminuiu e a de oxigênio aumentou, devido a extração de lipídeos muito mais rico em carbono do que em oxigênio. Esta biomassa residual poderia ser utilizada, após devidos testes, em ração animal bem como para geração de energia por gaseificação ou pirólise.

A composição elementar de uma amostra corresponde ao conteúdo em porcentagem de massa de carbono, hidrogênio, enxofre, oxigênio, nitrogênio, umidade e matéria residual. Pode ser determinada como detalhado na norma da ASTM D 3176-

74, sendo uma característica técnica importante do biodiesel e servindo de base para análise dos processos de combustão, tais como cálculos dos volumes de ar, gases e entalpia, determinando o poder calorífico do combustível (GÓMEZ, 2008).

3.6. RESULTADOS E DISCUSSÃO CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO

3.6.1 Composição do óleo

Para a determinação da composição do óleo, os ácidos graxos foram esterificados a ésteres metílicos e analisados por CG. O perfil lipídico do óleo de *L. starkeyi* e outros microorganismos foram relatados por diversas pesquisas (ANGERBAUER et al., 2008; LIU; ZHAO, 2007; MENG et al., 2009; WILD et al., 2010). O perfil cromatográfico apresentou similaridade com óleo de palma (Tabela 10).

Tabela 10. Composição em ácidos graxos (%) da *L. starkeyi*.

	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2
<i>Presente estudo</i>	0,5	33,2	2,6	8	54,4	1,3
(GARZÓN, 2009)	0,83	20,38	n.d.	10,77	56,06	11,96
Perfil dos ácidos graxos do óleo de palma (%)						
Literatura	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2
(CRABBE et al., 2001)	1,2	47,9	n.d.	4,8	37,0	9,1
(GRIMALDI; GONCALVES; ANDO, 2005)	1,0	40,7	n.d.	5,0	42,0	10,2
(LIU; ZHAO, 2007)	0,4	33,0	0,1	4,7	55,1	1,6

*n.d. não detectado

Os seis ácidos graxos identificados no óleo de *L. starkeyi* DSM 70296 são compostos basicamente por 14 e 18 carbonos, com baixo grau de insaturação, característica desejável para a produção de biodiesel.

3.6.2 Determinação de Triacilgliceróis (TAG), Diacilgliceróis (DAG) e Monoacilgliceróis (MAG) no óleo de levedura por Cromatografia Líquida de Alta Performance por exclusão de tamanho

As leveduras apresentam várias dificuldades para a extração lipídica, devido a espessa parede celular resistente a muitos solventes e pela possível presença de lipases em extratos celulares. A maioria dos lipídios neutros é intracelularmente armazenada em gotas lipídicas, as quais contêm outros compostos, em particular compostos aromáticos, difíceis de remoção durante a purificação de lipídios (AGEITOS et al., 2011). A Tabela 11 apresenta a composição de acilgliceróis da *L. starkeyi*.

Tabela 11. Composição percentual dos acilgliceróis da *L. starkeyi* pelos métodos Soxhlet, Butt e Hidrólise Celular em Autoclave.

Soxhlet			
Solventes	TAG (%)	DAG (%)	MAG (%)
Hexano	64,14	20,64	15,20
Clorofórmio: Metanol (2:1)	60,71	20,14	19,13
Etanol	35,93	18,66	45,39
Butt			
Solventes	TAG (%)	DAG (%)	MAG (%)
Hexano	58,47	14,93	26,58
Clorofórmio: Metanol (2:1)	47,50	10,03	42,46
Etanol	45,97	19,46	34,56
Hidrólise Celular em Autoclave			
Solventes	TAG (%)	DAG (%)	MAG (%)
Hexano	81,03	10,10	8,9

Como relatado anteriormente por BRUM, DE ARRUDA *et al.*, (2009) e MANIRAKIZA, COVACI *et al.*, (2001) os lipídios neutros estão ligados covalentemente e podem ser extraídos dos tecidos por solventes apolares (triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e esteróis). Os lipídios polares (ácidos graxos livres, fosfolipídios e

esfingolipídios), os quais estão ligados por forças eletrostáticas e pontes de hidrogênio, requerem solventes polares capazes de quebrar tais ligações e liberá-los. Baseado nessas condições, observou-se que os extratos hexânicos e por clorofórmio:metanol (2:1) contem frações maiores de triacilglicerídios em relação ao etanol.

Os acilgliceróis são desejáveis para produção do biodiesel principalmente para transesterificações alcalinas (CHISTI, 2007). Os acilgliceróis geralmente apresentam menor grau de insaturação do que outras frações lipídicas (lipídios polares), produzindo ésteres com maior estabilidade de oxidação (HALIM et al., 2012).

A baixa concentração de monoacilgliceróis na extração por hidrólise em autoclave, 8,9 %, se deve provavelmente à volatilidade desses compostos à alta pressão e temperatura ou pela completa lise celular tornando os lipídios intracelulares mais expostos não gerando a quebra da estrutura de triacilglicerol. Dependendo do método de extração ou do solvente empregado há uma diferença significativa na variação da concentração dos compostos, tornando assim mais ou menos seletivo para a extração de acilgliceróis.

3.6.3 Determinação da Composição de Triacilgliceróis (TAGs)

Esse método permite à análise estrutural completa dos triacilgliceróis e a distribuição dos diferentes ácidos graxos na molécula do glicerol. Este tipo de elucidação estrutural pode ter um grande impacto na avaliação da autenticidade dos produtos, devido ao nível de informação que proporciona (CHRISTIE, 1989).

As gorduras e óleos são misturas complexas contendo vários compostos, sendo principalmente de TAG, DAG, ácidos graxos livres (AGL), fosfolipídios e outros componentes menores. No entanto, o mais importante grupo desses compostos são os TAG, que quimicamente correspondem aos álcoois tri-hídricos esterificados com ácidos graxos. A análise da composição de TAG de um óleo ou gordura é uma tarefa desafiadora, porque um grande número de indivíduos espécies TAG é possível devido ao grande número de combinações de ácidos graxos no esqueleto do glicerol (BUCHGRABER et al., 2004). Os resultados obtidos da composição de TAG do óleo de *L. starkeyi* para os diferentes solventes de extração estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Composição percentual dos TAGs da *L. starkeyi* por diferentes solventes de extração (contínua).

Solventes	TAG	(FILHO, 1995)	CG (%)	Notação Taquigráfica
Hexano	PPP	4,40	3,71	48:0
	PPP _o	1,43	1,99	48:1
	PPS	3,63	3,33	50:0
	POP	18,45	17,29	50:1
	PP _o O	4,50	8,32	50:2
	PSS	1,01	3,88	52:0
	POS	10,05	20,38	52:1
	POO	25,91	27,40	52:2
	POL	5,75	3,03	52:3
	SSO	1,38	2,11	54:1
	SOO	6,90	4,03	54:2
	OOO	12,17	4,47	54:3
	OOL	2,60	-	54:4
	SSS		10,92	
	SUS		41,77	
	SUU		39,75	
	UUU		7,5	
Clorofórmio: Metanol (2:1)	PPP	4,40	3,89	48:0
	PPP _o	1,43	1,21	48:1
	PPS	3,63	2,51	50:0
	POP	18,45	29,50	50:1
	PP _o O	4,50	4,07	50:2
	PSS	1,01	2,09	52:0
	POS	10,05	18,78	52:1
	POO	25,91	25,34	52:2
	POL	5,75	2,02	52:3

Tabela 13. Composição percentual dos TAGs da *L. starkeyi* por diferentes solventes de extração (conclusão).

Clorofórmio: Metanol (2:1)	SSO	1,38	1,35	54:1
	SOO	6,90	4,40	54:2
	OOO	12,17	4,78	54:3
	OOL	2,60	-	54:4
	SSS		8,49	
	SUS		50,84	
	SUU		33,81	
	UUU		6,8	
Etanol	PPP	4,40	2,37	48:0
	PPP _o	1,43	1,20	48:1
	PPS	3,63	6,02	50:0
	POP	18,45	25,12	50:1
	PP _o O	4,50	4,52	50:2
	PSS	1,01	1,82	52:0
	POS	10,05	10,72	52:1
	POO	25,91	31,77	52:2
	POL	5,75	4,70	52:3
	SSO	1,38	1	54:1
	SOO	6,90	4,03	54:2
	OOO	12,17	6,67	54:3
	OOL	2,60	-	54:4
	SSS		10,21	
	SUS		38,04	
	SUU		40,32	
	UUU		11,37	

* Representação: L (linoleico), O (oléico), P (palmítico), S (esteárico), Po (palmitoléico); SSS: cadeia saturada; SUS: cadeia com uma insaturação; SUU cadeia com duas insaturações; UUU: cadeia com três insaturadas.

Foram identificados treze tipos de TAG em cada solvente de extração. Apesar de existirem algumas diferenças quantitativas entre os TAG de cada solvente de extração, pode dizer-se que, em geral, apresentaram um perfil de TAGs semelhante. Máximas quantidades de SSS foram obtidas com o solvente hexano (10,92%), SUS foi identificado com 50,84% na extração com clorofórmio: metanol, UUU foi determinado com maior valor na extração com etanol 7,5%, esse resultado é influenciado pela seletividade de cada solvente empregado. Neste caso, a *L. starkeyi* apresentou perfil de ácidos graxos semelhantes ao óleo de palma quando comparado com os óleos vegetais na determinação dos ácidos graxos apresentados na Tabela 10 o perfil de TAG majoritários é formado pela ordem crescente do teor: POP, POS e POO o que confirma os resultados apresentados no perfil cromatográfico.

O acúmulo de lipídios intracelular ocorre na situação desbalanceada de concentrações de carbono e nitrogênio no meio de cultura. Sob estas condições, a fonte de carbono em excesso é canalizada em corpos lipídicos, na forma de TAG. A síntese de TAG em leveduras é realizada no retículo endoplasmático. Os TAGs são formados por consecutiva acilação do glicerol-3P por três aciltransferases, e os fosfatos eliminados por meio de fosfatases específicas (AGEITOS et al., 2011). De um ponto de vista tecnológico, o perfil de TAG de uma espécie representa a compreensão da várias propriedades físicas de um óleo ou gordura. A possibilidade de alterar as propriedades físicas das gorduras tem despertado grande interesse nos últimos anos. A informação sobre o perfil TAG é necessária para controlar estes processos (BUCHGRABER et al., 2004).

Em algas, a composição de TAGs, raramente tem sido analisada. Ao contrário de dezenas de plantas oleaginosas ou alguns óleos de peixe, em que a referida identificação dos TAG são realizados (REZANKA et al., 2011). Em óleo de palma, as composições de sete amostras oriundas da América do Sul, África e Ásia (Malásia) apresentaram 5-9% SSS, 43 – 49% SUS, 38-44 % SUU e 6-8% UUU (BRAIPSON-DANTHINE; GIBON, 2007). O perfil de TAG da Tabela 12 apresentou similaridade quando comparada com a palma.

A biossíntese do TAG ocorre através de reações esterioespecíficas e regioespecíficas, (assim como a distribuição das três moléculas de AG no TAG

afetando as suas propriedades biológicas e físicas, como estrutura cristalina, solubilidade, viscosidade e ponto de fusão). Tradicionalmente, a caracterização de óleos e gorduras é baseada na composição de AG. No entanto, esta informação não é o suficiente para uma gordura ou composição do óleo com fins alimentares. Dependendo das combinações de blends de TAG poderia levar a perfis semelhantes de AG. Por esta razão, recentes estudos tendem a usar diretamente o TAG como marcadores de composição para caracterizar as gorduras e óleos. Esta informação é usada para resolver problemas relacionados com questões de autenticidade, especialmente quando eles são usados para produtos alimentares (BOSQUE-SENDRA et al., 2012).

3.6.4 Análises Físico-Químicas do Óleo

O óleo foi caracterizado inicialmente e por ensaios em laboratório (Tabela 13) e por alguns modelos de predição. Os modelos de predição levaram em consideração a composição do óleo para estimar parâmetros como: índice de iodo, índice de saponificação e massa molar, enquanto que os ensaios experimentais foram usados para determinar o índice de acidez, umidade, saponificação e determinação do conteúdo de fósforo.

O índice de iodo calculado pela composição média dos ácidos graxos do óleo *L. starkeyi* indica o grau de insaturação do óleo. Pela norma EN 14214, o número máximo permitido é de 120 g I₂/100 g (RAMOS et al., 2009), ao passo que a norma brasileira não especifica a quantidade permitida. O óleo de *L. starkeyi*, por possuir índice de iodo baixo, satisfaz uma importante característica requerida para ser usado como biocombustível. O número de insaturações não tem efeito apenas nos valores de densidade e viscosidade do biodiesel, mas também na estabilidade oxidativa (LOBO; COSTA FERREIRA; DA CRUZ, 2009). A autooxidação ocorre devido à presença de ligações duplas nas cadeias de muitos compostos graxos. A oxidação de compostos graxos insaturados prossegue com taxas diferentes, dependendo do número e posição das ligações duplas. As posições alílicas das ligações duplas são especialmente suscetíveis à oxidação. Isto é essencial porque a maioria dos combustíveis de biodiesel apresentam quantidades significativas de ésteres de ácidos oleico, linoleico ou

linolênico, influenciando na estabilidade oxidativa dos combustíveis (KNOTHE, 2005). As espécies formadas durante o processo de oxidação faz com que o combustível possa eventualmente deteriorar-se (KNOTHE, 2009).

Tabela 14. Caracterização do óleo *L. starkeyi*.

Métodos Experimentais				
Parâmetro	Óleo de Palma	Extração		
		Hexano	CHCl₃: Metanol (2:1 v/v)	Etanol
Índice de Acidez (mg KOH/g)	*Bruto 5,0 g de ácido oléico/100 g	0,12± 0,03	2,35± 0,51	3,56± 1,40
Fósforo (mgP/Kg)	-	33,65	135,34	120,65
Viscosidade 40 ^o (mm ² /s)	38,23	41,87	-	-
Densidade (kg/m ³)	0,891 - 0,899	911,4	-	-
Métodos Calculados				
Parâmetro	Óleo de Palma	<i>L. starkeyi</i>		
Índice de Iodo	50-60 g I ₂ /100 g (RAMOS et al., 2009)	56, 63 g I ₂ /100 g		
Índice de Saponificação	*190 – 209	196,39		
Massa Molar	847,3 g/mol (CRABBE et al., 2001)	855,13 g/ mol		

*Valores de Referência: RDC N^o 482, de 23/09/1999, da Agência Nacional da Vigilância Sanitária –(ANVISA, 1999);(DE ALMEIDA et al., 2002)

Os resultados do cálculo da massa molar do óleo residual (triacilgliceróis) estão apresentados na Tabela 7. Em termos gerais, o primeiro termo da Equação 3 corresponde à média ponderada da massa molar de todos os componentes dos ácidos graxos com base no seus pesos moleculares e nas frações molares individuais e multiplica-se por 3 para representar as três cadeias de ácidos graxos idênticos. Adicionalmente, é também necessário considerar o glicerol, que é composto por três átomos de carbono e cinco átomos de hidrogênio (CH₂-CH-CH₂), bem como a diferença de três átomos de hidrogênio entre os ácidos graxos e as cadeias de ácidos graxos (SU et al., 2011).

Para o cálculo do índice de saponificação são necessárias as frações molares de cada componente do óleo de *L. starkeyi*. A umidade presente nesses óleos foi inferior a 1%. Isso já era esperado, pois a biomassa passou pelo processo de liofilização, retirando-se todo o resíduo de água presente na amostra. Um requisito para eficiência da reação de transesterificação por catálise básica é que os materiais e reagentes estejam secos, uma vez que a presença de água no meio promove a formação de sabão com a consequente perda da alcalinidade do catalisador. Além disso, alto teor de umidade resulta em menor solubilidade do óleo na fase alcoólica, com consequente queda no rendimento dos ésteres etílicos (SILVA, 2005). O índice de acidez adequado para realizar as transesterificações básicas é de $3\text{mg}_{\text{KOH}}/\text{g}_{\text{óleo}}$. Elevado índice de acidez pode neutralizar o catalisador básico e gerar produtos indesejáveis como os sabões (EIMASHAD; ZHANG; AVENA-BUSTILLOS, 2008). O teor de ácido graxos livres associados com a matéria prima de lipídios, não deve exceder 0,5 % em peso (EDGAR LOTERO; JAMES G. GOODWIN, 2005).

EHIMEN, SUN *et al.*, (2011) encontraram o índice de acidez em óleo de microalgas (*Chlorella*) de 10,21 mg KOH/g de óleo. Para elevados teores de ácidos graxos livres (> 0,5 % m/m) em óleo de microalga, deve-se a escolher o catalisador ácido ao invés de catalisadores alcalinos para a reação de transesterificação.

Em estudos feitos por S.C.A DE ALMEIDA *et al.*, (2002) para óleo bruto de palma, a alta viscosidade do óleo resultou em má atomização, depósitos de carbono, entupimento de tubulações e dificuldade de partida em baixas temperaturas. Mas o biodiesel de palma esterificado com catalisadores ácidos (H_2SO_4) a suposição de fluido newtoniana é aplicada ao éster etílico do óleo de palma (AL-WIDYAN; AL-SHYOUKH, 2002).

Os resultados obtidos não são satisfatórios para a reação de transesterificação via básica e ao rendimento da reação, o índice de acidez elevado para extração com etanol é o principal interferente para que essa reação ocorra, demonstrando assim que o óleo bruto em estudo terá baixo rendimento em ésteres sem uma etapa de purificação ou refino.

3.7 CONCLUSÃO

Os solventes empregados para extração lipídica da levedura se comportam de diferentemente seguindo a ordem decrescente de polaridade: clorofórmio:metanol > etanol > hexano. Aumento significativo da extração de lipídios foi observado após ruptura celular em autoclave, porém um processo mais brando e eficaz deve ser desenvolvido visando preservar as propriedades da biomassa extraída.

Nas imagens por MEV é visualizado apenas a lise celular e formação de detritos, entretanto, não foi possível quantificar eficientemente a ruptura celular apenas a partir das imagens obtidas. No presente trabalho foi adotado a máxima quantidade de lipídios extraídos para cada solvente empregado para classificar o melhor método de extração em relação ao método considerado padrão (Bligh Dyer).

Observou-se os extratos lipídicos pelos solventes hexano e clorofórmio:metanol (2:1) alcançaram maiores frações de triacilgliceróis em relação ao etanol.

Os seis ácidos graxos indentificados no óleo de *L. starkeyi* DSM 70296 são composto basicamente por 14 e 18 carbonos, com baixo grau de insaturação, característica desejável para a produção de biodiesel.

Foram identificados treze tipos de TAG em cada solvente de extração. Apesar de existirem algumas diferenças quantitativas entre os TAG entre os diferentes extratos, pode dizer-se que, em geral, apresentaram perfis de triacilgliceróis semelhantes. O perfil de TAG majoritários é formado pela ordem crescente do teor: POP, POS e POO o que confirma os resultados apresentados no perfil cromatográfico.

Os resultados do índice de acidez e conteúdo de fósforo não são satisfatórios para a reação de transesterificação via básica e ao rendimento da reação, demonstrando assim que o óleo bruto em estudo terá baixo rendimento em ésteres sem uma etapa de purificação ou refino.

CAPÍTULO 4- OBTENÇÃO DO BIODIESEL DE *L. STARKEYI*

4.1 INTRODUÇÃO

A espectroscopia de infravermelho é uma ferramenta poderosa para o estudo das moléculas biológicas e a aplicação desta técnica está em contínua expansão. É utilizada para caracterização de moléculas biológicas, particularmente proteínas e lipídios. As bandas de infravermelho para estudo de lipídios são as vibrações do grupo éster, em particular o alongamento da banda de C=O na região de 1750-1700 cm^{-1} (STUART, 2004).

Diversas aplicações biotecnológicas requerem o maior desenvolvimento de métodos analíticos para biomassa, a fim de monitorar a reprodutibilidade de lote para lote (PISTORIUS; DEGRIP; EGOROVA-ZACHERNYUK, 2009). A espectroscopia de infravermelho próximo (FT-IR) é cada vez mais empregada. O sucesso desta técnica em problemas analíticos quantitativos depende da disponibilidade de um modelo de calibração adequado para o sistema em estudo e pode revelar-se difícil de construir, requerendo relativamente grandes conjuntos de dados (CEN; HE, 2007).

Processos de fermentação em diferentes condições foi realizado por GRUBE *et al.*, (2002b) estabelecendo uma análise quantitativa de múltiplos componentes celulares, com base na média dos coeficientes. A composição pode ser determinado semi- quantitativamente pela análise de regressão linear múltipla. (PISTORIUS *et al.*, 2009).

Uma das vantagens mais importantes do FT-IR consiste no fato das substâncias analisadas não serem tratadas quimicamente evitando assim reações secundárias. Além disso, todos os compostos são medidos simultaneamente, reduzindo o tempo as análises. (GRUBE; GAPES; SCHUSTER, 2002a)

São também adequadas para o controle da reação de transesterificação, controle da qualidade do biodiesel, visto que técnicas vibracionais permitem sondas para o monitoramento em tempo real (on-line) (TREVISAN *et al.*, 2008).

Nesse sentido, duas técnicas foram testadas: i) FT-IR, baseado na Determinação Rápida de Isômeros Geométricos Trans Isolados em Gorduras e Óleos em ATR em

Espectroscopia do Infravermelho da AOCS Método Cd 14d-99; ii) Cromatografia Gasosa acoplada Espectrômetro de massas (CG-EM).

4.2 MATERIAL

4.2.1 Reagentes

Os reagentes utilizados nesse experimento são: etanol (J.T. Bater, México), hexano (Synth, Brasil), ácido sulfúrico (Êxodo Científica, Brasil) e ácido clorídrico (Ecibra, Brasil).

4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.3.1 Transesterificação *In Situ* Metílica

O protocolo de transesterificação foi adaptado de LEWIS, NICHOLS et al., (2000). As amostras de 200mg de biomassa liofilizada foram transesterificadas adicionando-se 30 mL da mistura metanol/ácido clorídrico/clorofórmio (10:1:1, v/v) e levando a banho termostático a 90 °C por uma hora. Os ésteres produzidos são extraídos três vezes adicionando 20 mL de hexano:clorofórmio (4:1, v/v) e 10 mL de água. A mistura é centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos para completa separação das fases. A fase leve (hexano + metil ésteres) é separada, o excesso de solvente é removido e recuperado por evaporação sob pressão reduzida em Rotavapor IKA-RV 10 (Alemanha) e seca com sulfato de sódio anidro, a fração de ésteres metílicos é seca a peso constante em estufa e medida gravimetricamente em percentagem de peso seco.

4.3.2 Transesterificação *In Situ* Etílica

As reações de transesterificação *in situ* por catálise ácida (H_2SO_4) foram feitas usando 5 gramas de biomassa seca e razão molar etanol : óleo 600:1 e a % de catalisador ácido foi calculada com base no teor de óleo presente na biomassa, diluído em álcool (EHIMEN et al., 2010; EHIMEN et al., 2011; GEORGOGIANNI et al., 2008; VELASQUEZ-ORTA; LEE; HARVEY, 2012). As condições usadas nas reações estão representadas na Tabela 14.

Tabela 15. Condições utilizadas nas reações.

Amostras	Temperatura (°C)	Concentração de H₂SO₄ (%)	Tempo (h)
H ₁	70	1,0	
H ₂	80	1,0	
H ₃	70	2,0	4
H ₄	80	2,0	
H ₅	75	1,5	
E ₀₁	70	100	8

E₀₁: transesterificação *in situ* 70°C com 100% H₂SO₄; H₁, H₂, H₃, H₄ e H₅ transesterificação *in situ* variando temperatura (70-80 °C) e H₂SO₄ (1 -2%).

A reação foi realizada em aparato composto de um tanque cilíndrico com fundo plano em aço inox 316 com e jaqueta térmica para controle de temperatura. O sistema de agitação consistiu em um agitador mecânico Q-251D da marca IKA Labortechnik (Alemanha) com volume total de 100 mL. Após o término da reação de transesterificação a mistura reacional foi centrifugada a 2000 rpm para separação da biomassa e posteriormente deixada em repouso (em funil de separação) para separação das fases. A mistura de ésteres foi purificada posteriormente por adição de hexano e a neutralização do catalisador foi feita com lavagem usando água destilada à 60 °C ajustando o pH a 7,0. O solvente hexânico em excesso foi removido e recuperado por evaporação sob pressão reduzida em Rotavapor IKA-RV 10 (Alemanha) e seca com sulfato de sódio anidro. A fração de ésteres foi seca a peso constante em estufa e medida gravimetricamente em percentagem de peso seco.

4.3.3 Transesterificação Etilica Convencional do Óleo Previamente Extraído Por Bligh&Dyer

A extração de lipídios foi baseada no método gravimétrico de Bligh & Dyer, (1959) modificado por Manirakiza e colaboradores (MANIRAKIZA et al., 2001), que extrai

ambos lipídios, os polares e os não polares da biomassa liofilizada utilizando a mistura de metanol e clorofórmio.

A extração foi realizada pesando 1g de biomassa liofilizada e adicionando 12 mL de uma solução metanol:clorofórmio (2:1 v/v). Em seguida a suspensão foi agitada em agitador vortex por 2 minutos. Seguidamente foram adicionados 4 mL de clorofórmio e agitou-se por 2 minutos. Para gerar um sistema de duas fases líquidas, 7,2 mL de água foram adicionados e o sistema foi agitado novamente por 2 minutos. As fases foram separadas por centrifugação por 10 minutos a 2000 rpm. A fase inferior foi transferida a um balão de 50 mL usando pipeta Pasteur. Uma segunda extração foi realizada utilizando 8 mL de uma solução 10% (v/v) de metanol em clorofórmio em agitador vortex por 2 minutos. Após centrifugação, a fase de clorofórmio foi adicionada ao primeiro extrato. O clorofórmio foi evaporado em evaporador rotatório e o resíduo seco em estufa a 60 °C por um dia. O lipídeo final foi quantificado gravimetricamente.

A transesterificação do óleo extraído por Bligh & Dyer (1959) modificado a ésteres etílicos seguiu o protocolo de transesterificação adaptado de Ehimen, Sun *et al.*(2010; 2011). As reações de transesterificação por catálise ácida (H₂SO₄) foram feitas usando a razão molar etanol:óleo 6:1 e 2% de catalisador ácido, no tempo de 8 horas. A reação foi realizada em aparato e sistema de agitação descrito anteriormente. Após o término da reação de transesterificação a mistura reacional foi centrifugada, purificada e seca.

4.3.4 Transesterificação Etílica Convencional do Óleo Previamente Extraído Por Butt

Na extração tipo Butt as amostras de aproximadamente 14 g de biomassa liofilizada foram adicionadas ao cartucho de celulose. A extração foi realizada por 6 horas, em 200 mL de etanol. Após a extração, o solvente é evaporado sob pressão reduzida e a fração lipídica é seca a peso constante em estufa.

As reações de transesterificação por catálise ácida (H₂SO₄) foram feitas usando a razão molar etanol e óleo 6:1 e catalisador ácido diluído em álcool. As condições usadas nas reações estão representadas na Tabela 15.

Tabela 16. Condições utilizadas na reação de esterificação do óleo.

Amostras	Temperatura (°C)	Concentração de H₂SO₄ (%)	Tempo (h)
O ₁	70	1,0	2
O ₂	80		

O₁: óleo extraído por Butt (1% H₂SO₄ á 70 ° C); O₂: óleo extraído por Butt (1% H₂SO₄ á 80 ° C).

4.3.5 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Após o término da reação de transesterificação a fração enriquecida em ésteres foi analisada qualitativamente por cromatografia em camada delgada (CCD).

A fase móvel foi constituída por uma mistura ternária de éter de petróleo: éter etílico: ácido acético (80:19:1). Após a eluição, a cromatoplaça foi revelada com vapores de iodo. Ácido oleico e heptadecanoato de metila foram empregados como padrões cromatográficos e os valores dos fatores de retenção (Rf) foram comparados (GERIS et al., 2007).

A amostra foi aplicada diretamente na placa de sílica por capilaridade e os padrões foram preparados diluindo-se 1g em de éter de petróleo em balão volumétrico de 10 mL. Posteriormente preparou-se a solução: 80 ml éter de petróleo, 19 ml éter etílico e 1 ml ácido acético glacial.

O cromatograma foi desenvolvido em cuba contendo a solução éter de petróleo, éter etílico e ácido acético glacial. A placa foi revelada por vapores de iodo metálico. Para calcular o fator de retenção (Rf) mediu-se a distância da linha de aplicação da amostra à linha de chegada da fase móvel (dm). Em seguida, marcou-se a distância de cada mancha colorida até a linha de aplicação da amostra (ds) e dividiu-se pelo valor de (dm), conforme Equação 12 (Resultados no Anexo 7.4):

$$Rf = \frac{ds}{dm} \quad (11)$$

4.3.6 Identificação dos Produtos de Reação e dos Compostos Presentes na Biomassa e Óleo por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).

As amostras foram analisadas no Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) (Thermo Scientific- Nicolet 6700/USA). Os espectros foram obtidos no modo ATR (*Attenuated Total Reflection*) com o acessório SMART OMNI-SAMPLER na faixa de 4000-675 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras por espectro. Essa metodologia foi baseada na Determinação Rápida de Isômeros Geométricos Trans Isolados em Gorduras e Óleos em ATR em Espectroscopia do Infravermelho da AOCS Método Cd 14d-99.

As amostras de ésteres foram transferidas à célula de ATR com auxílio de uma pipeta automática utilizando 100 μL de amostra, o suficiente para o recobrimento de toda a célula de ATR.

Os padrões preparados com Biodiesel cedido pelo Laboratório de Combustíveis da Universidade Federal do Amazonas para construção de curva de calibração. As diferentes concentrações de biodiesel utilizados para curva estão descritos na Tabela 16 e os espectros obtidos de cada ponto encontram-se na Figura 9.

Tabela 17. Dados para construção da curva de calibração FT-IR.

Padrão pontos	Massa de Biodiesel B100 (g)	Massa de Etanol (g)	% de B100
1	0,1	1,9	10
2	0,5	1,5	25
3	1	1	50
4	1,5	0,5	75
5	2	0	100

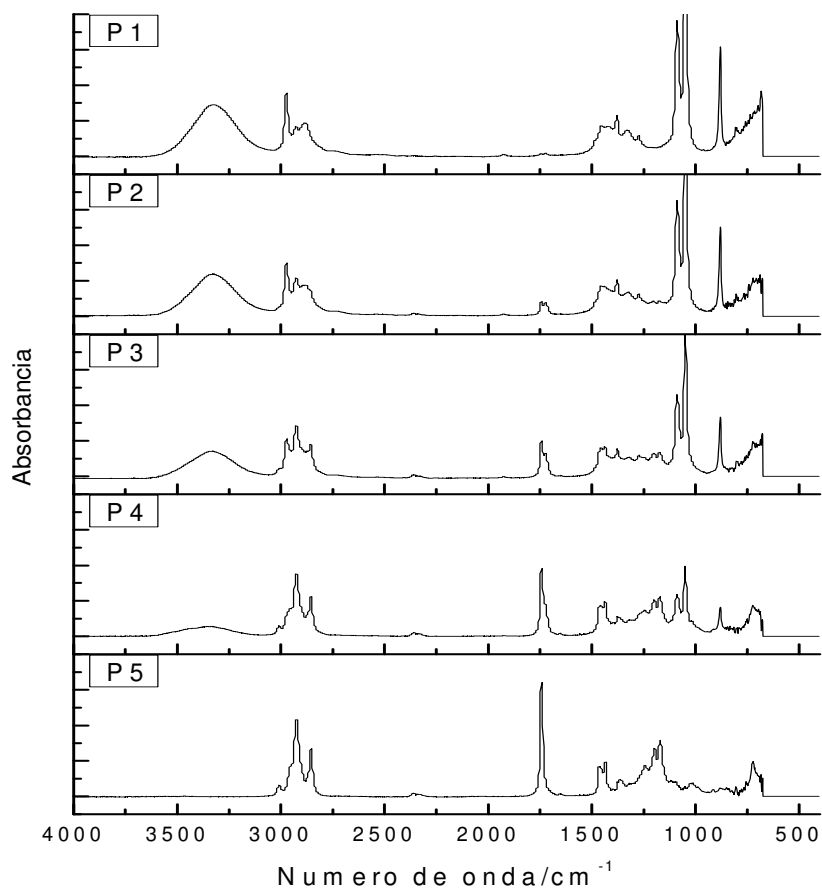


Figura 9. Espectros de FTIR para a curva padrão

As áreas integradas da absorbância a 1750 cm^{-1} , pela análise de FT-IR dos padrões foram plotadas utilizando a inclinação e a intersecção gerada na regressão linear de primeira ordem, da área *versus* % do padrão de biodiesel (Gráfico 1). O ajuste linear obtido na padronização foi de 0,99086 e os valores da intersecção -0,1163 e inclinação 0,01575. Consequentemente a % de éster nas amostras pode ser estimada pela equação 13. Nos espectros da Figura 9 é observado que o limite de detecção é superior á 10%.

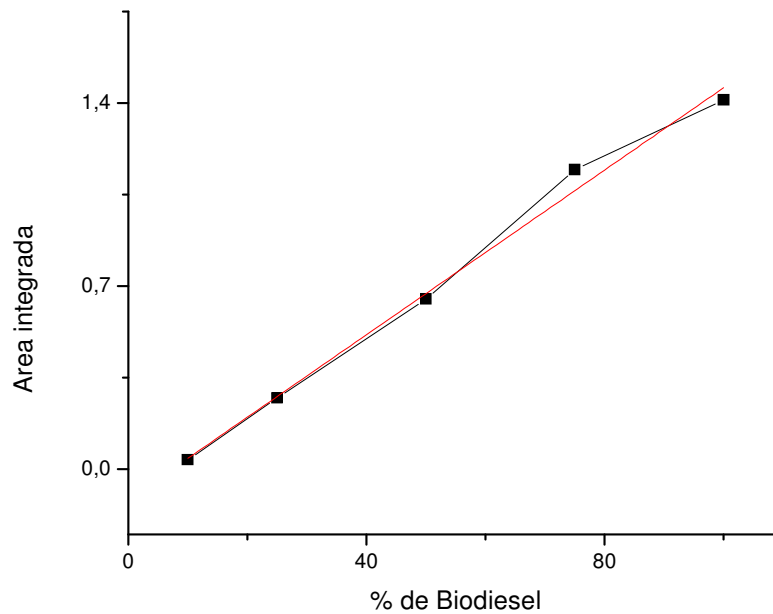


Gráfico1. Curva de regressão linear obtida na padronização

$$\% \text{ Éster} = \frac{(\text{área} - \text{intersecção})}{\text{inclinação}} \quad (12)$$

Onde, área é obtida da integração da região de absorção de 1750 cm^{-1} ; a intersecção e inclinação já determinadas no ajuste linear.

A análise por FT-IR indicou as principais características estruturais do produto e a estimativa da fração de éster nas amostras. O teor de conversão para as reações, foi calculado pela equação 14:

$$\% \text{ conversão} = \frac{m_E \times \% \text{ éster}}{m_{LT}} \quad (13)$$

Onde, m_E é a massa de produto da reação; teor de éster obtida da Equação 13 e m_{LT} é a massa de lipídios na biomassa.

4.3.7 Identificação dos Ésteres Etílicos Obtidos Por Cromatografia Gasosa com Detector de Massas.

A identificação dos ésteres etílicos foi confirmada por cromatografia gasosa com detector de massas GC-2010 (Shimatzu) utilizando uma coluna capilar Stabilwax, 30 m, 0,25 mm I.D., 0,25 µm. Para a eletroinoização foi utilizado 70 eV tendo hélio como fase móvel a pressão de 15 psi, split 1/50, 250 °C no injetor e 300 °C no detector. A rampa de temperatura para a coluna foi: 50 °C por 2 min, gradiente de 10 °C/min até atingir 180 °C, 5 minutos em espera à 180 °C, gradiente de 5 °C/min até atingir 240 °C, totalizando 32 minutos de corrida cromatográfica. O volume injetado para cada análise foi de 1 µL. O software GS Solution (Shimadzu, Kyoto, Japan) foi utilizado para análise dos cromatogramas juntamente com as bibliotecas Nist08 e Nist08s.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Identificação e Quantificação dos Produtos de Reação por FT-IR

Uma das alternativas para superar a limitação do processo de extração e transesterificação convencional é a **transesterificação *in situ***, método no qual os lipídios são simultaneamente extraídos da célula e convertidos. Nesta abordagem a extração e conversão ocorrem em um único passo, sem a necessidade de isolar e refinar o lipídeo antes da conversão do biodiesel, podendo eventualmente reduzir os custos (DONG et al., 2013). Os resultados finais de cada método de reação empregado nesse trabalho convencional ou *in situ* versus, concentração de éster e rendimento de conversão estão descritos na Tabela 17.

Tabela 18. Dados obtidos por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).

Transesterificação Convencional (óleo extraído da levedura)		
Amostras	% Éster	% Conversão
O ₁	68,45	43,20
O ₂	78,19	49,20
A ₀₁	95,50	86,62
Transesterificação <i>in situ</i> com a matrix levedura		
Amostras	% Éster	% Conversão
<i>in situ</i> metílica	75,13	55,11
<i>in situ</i> etílica (E ₀₁)	93,39	57,15
H ₁	73,35	32,02
H ₂	69,42	36,44
H ₃	54,40	26,70
H ₄	70,33	35,29
H ₅	67,62	32,88

O₁: óleo extraído por Butt (1% H₂SO₄ á 70 ° C); O₂: óleo extraído por Butt (1% H₂SO₄ á 80 ° C); A₀₁: Amostra extraída por Bligh Dyer (2% H₂SO₄ á 70 ° C); E₀₁: transesterificação *in situ* 70°C com 100% H₂SO₄; H₁, H₂, H₃, H₄ e H₅ transesterificação *in situ* variando temperatura (70-80 °C) e H₂SO₄ (1 - 2%).

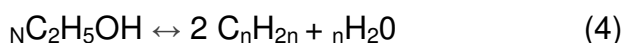
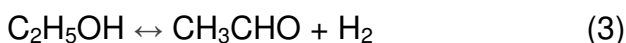
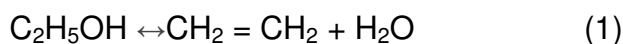
Para estudos de transesterificação *in situ* de microalgas EHIMEN, (2011) fez as seguintes observações: com metanol, o equilíbrio de produtos de transesterificação variam de uma mistura de FAME, glicerídeos e glicerol (reação incompleta) a uma mistura de FAME e glicerol (reação completa). Uma vez que o glicerol da reação é eliminado do produto final (contendo FAME e glicerídeos) pela etapa de purificação, o valor final de éster será menor do que o total de óleo extraído, variando com a composição percentual do tipo de FAME do produto purificado. No presente trabalho a conversão de 81,7% foi obtida com a amostra seca após um tempo de reação de 6 h

Na conversão proposta no trabalho estamos considerando o total de lipídios em 5 gramas de biomassa, não levando em consideração qual desses lipídios podem ser transesterificados e a fração da molécula de glicerol.

A transesterificação por catálise ácida é retardada pela presença de compostos polares, pois os mesmos atuam na reação competindo por íons hidrogênio, reduzindo a disponibilidade destes íons para a catálise. Os catalisadores ácidos ligam-se preferencialmente à água, levando a uma reação reversível e desativando o catalisador. Outro fator é o impedimento estérico entre as moléculas de ácidos graxos e o álcool utilizado, porém há um aumento na hidrofobicidade com álcool maiores a temperaturas elevadas demonstrando assim a importância da temperatura na catálise ácida. Sabe-se, contudo, que grandes volumes de catalisador ácido podem promover a formação de éter por desidratação do álcool (EDGAR LOTERO; JAMES G. GOODWIN, 2005).

A desidratação do etanol foi observada nos espectros de FT-IR (Figura 10) nas reações onde o mínimo de tempo foi usado na reação levando a formação de um grupo vinil (alceno).

O Etanol pode sofrer as seguintes reações, dependendo da natureza do catalisador utilizado e das condições analíticas.



A reação 1 parece ser um caso especial da reação 4, quando $n=1$. Na realidade, através da reação 4, além de etileno, formam-se alcenos de cadeias normais e ramificadas. Sabe-se que os alcoóis sofrem ambas as reações de desidratação e desidrogenação, tanto em solução quanto em fase gasosa, através de catálise homogênea. (JEWUR, 1984)

Os espectros da Figura 10 apresentaram uma banda relativa de formação de uma olefina, onde no presente trabalho foi determinado como um marcador para o término e melhoramento da reação. A banda de olefina presente no estiramento ligação C=C

conjugada (1600 cm^{-1}) na vibração carbono-carbono e a deformação axial carbono-hidrogênio $-\text{CH} = \text{CH}_2$ ($3040\text{-}3010\text{ cm}^{-1}$). A presença de uma olefina é possível devido à formação do intermediário reacional presente nas reações de transesterificação. Nos espectros da Figura 10 é possível observar a formação de éster em pequenas quantidades devido à intensidade do sinal 1741 cm^{-1} característico do estiramento $-\text{C}=\text{O}$ 1750 à 1730 cm^{-1} .

A fim de caracterizar os produtos, os resultados obtidos nas Figuras 11, 12 foram consistentes com a estrutura química dos ésteres na análise do espectro do FTIR, que identificou as bandas características através da absorbância, caracterizando a deformação axial de éster $\text{C}=\text{O}$ ($1,741\text{ cm}^{-1}$) e $\text{C}-\text{O}$ ($1168\text{-}1243\text{ cm}^{-1}$), além de uma deformação axial e angular de $\text{C}-\text{H}$, nas regiões de 2921 , 1461 , 1377 e 719 cm^{-1} , que são mensuradas no números de onda. Todas as amostras apresentaram para o FTIR perfis semelhantes (CARVALHO et al., 2011). A tabela 18 resume as principais bandas identificadas

Tabela 19. Principais regiões identificadas no FTIR

Tipo de deformação	Faixa de absorção cm^{-1}
Deformação axial CH_3	1493-1378
Deformação axial $\text{C}=\text{O}$	1750-1735
Deformação axial $\text{C}-\text{O}$	1240-1163
Deformação axial (éster saturado) $\text{C}-\text{O}$	1210-1163
	3000-2800
Deformação, angular $\text{C}-\text{H}$	1470-1370
	860-720

Fonte: (CARVALHO et al., 2011; PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

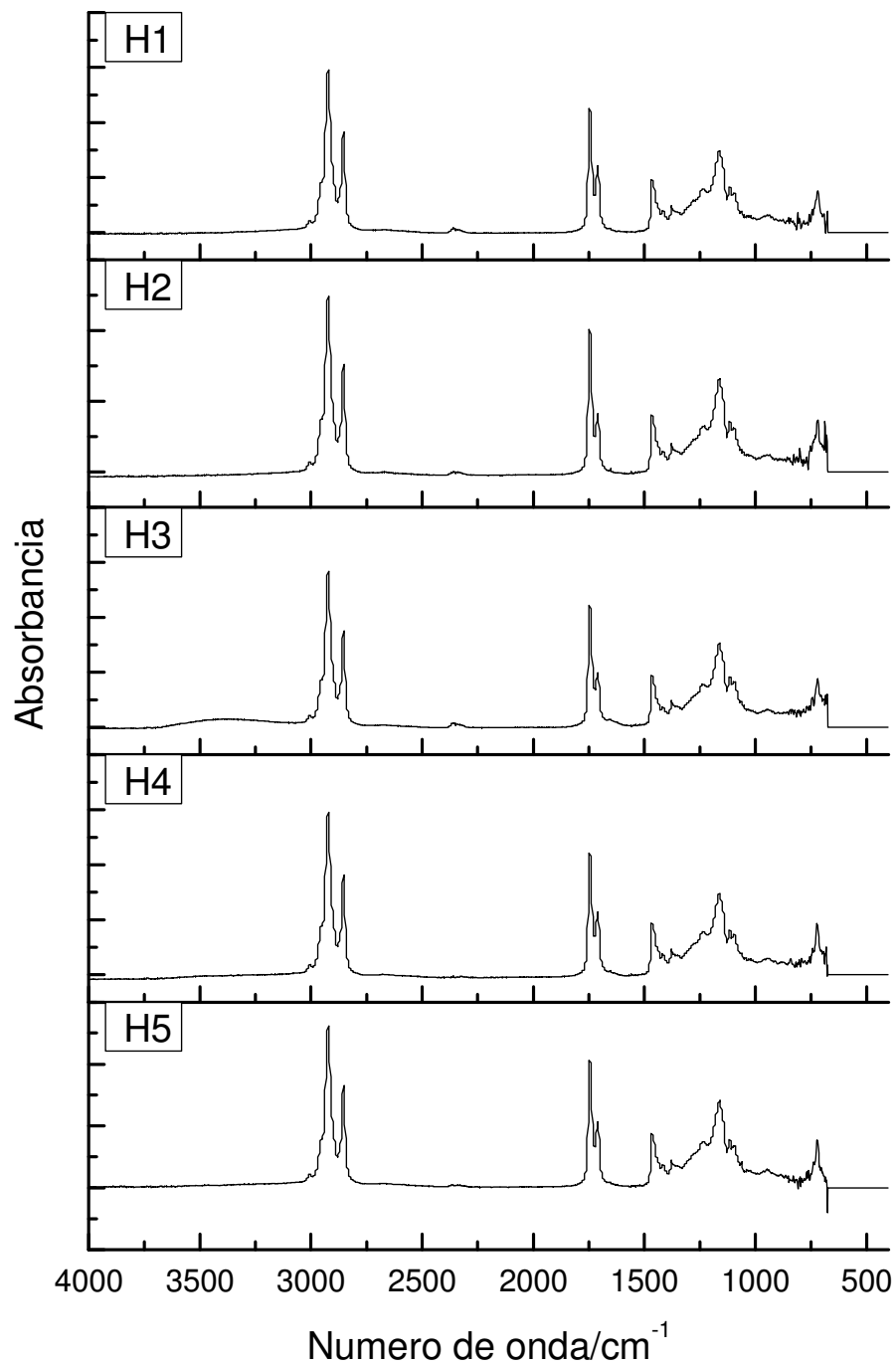


Figura 10. Espectros de FTIR das amostras H1, H2, H3, H4, H5.

Os Espectros da Figura 11 são relativos ao óleo de levedura de diferentes extrações e diferentes condições reacionais. Nas amostras O_1 e O_2 é possível observar uma mínima formação de alcenos no estiramento ligação C=C conjugada (1600 cm^{-1}) quando utilizado maior tempo de reação como, por exemplo, na amostra A_{o1} . Para essa amostra, a banda de característica de éster apresentou sinal bem definido, sugerindo que a reação com catálise ácida necessita de um maior tempo para a sua conclusão e maior formação de produtos.

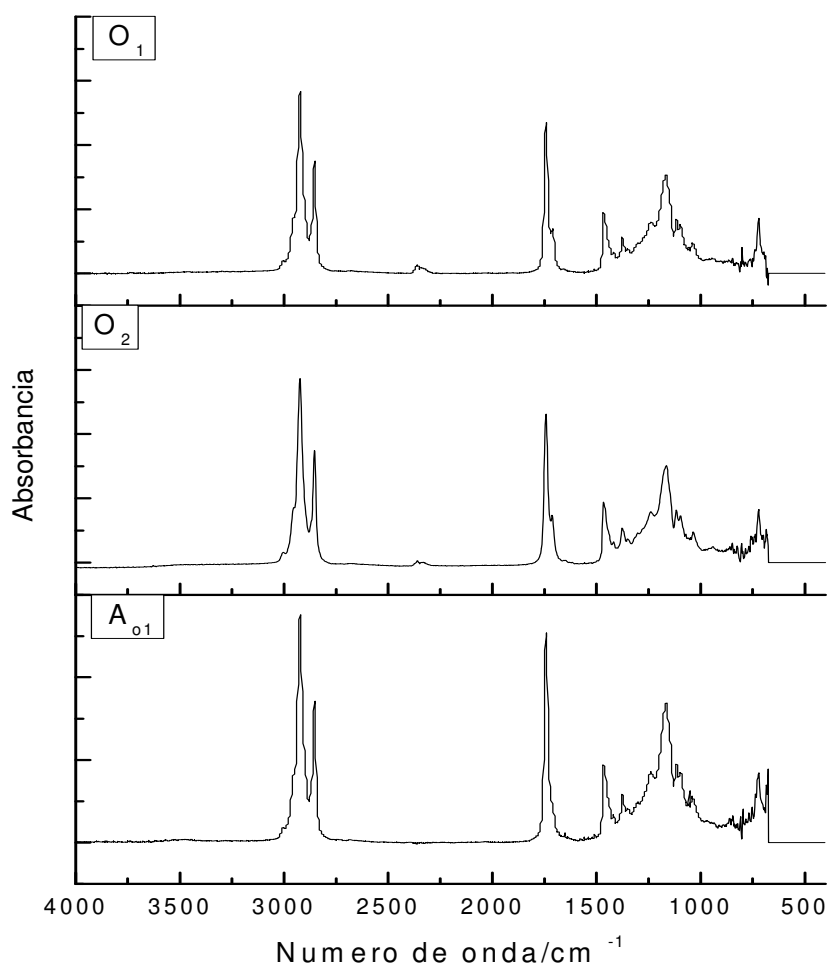


Figura 11. Espectros de FTIR das amostras O_1 , O_2 e A_{o1} ,

Para as reações *in situ* (Figura 12) os espectros apresentam uma identidade espectral de éster tanto nas amostras metílicas e etílicas. As bandas estão bem

definidas em todas as zonas espectrais demonstrando que o maior tempo e 100% de catalisador ácido são os principais fatores para o aumento no rendimento da reação.

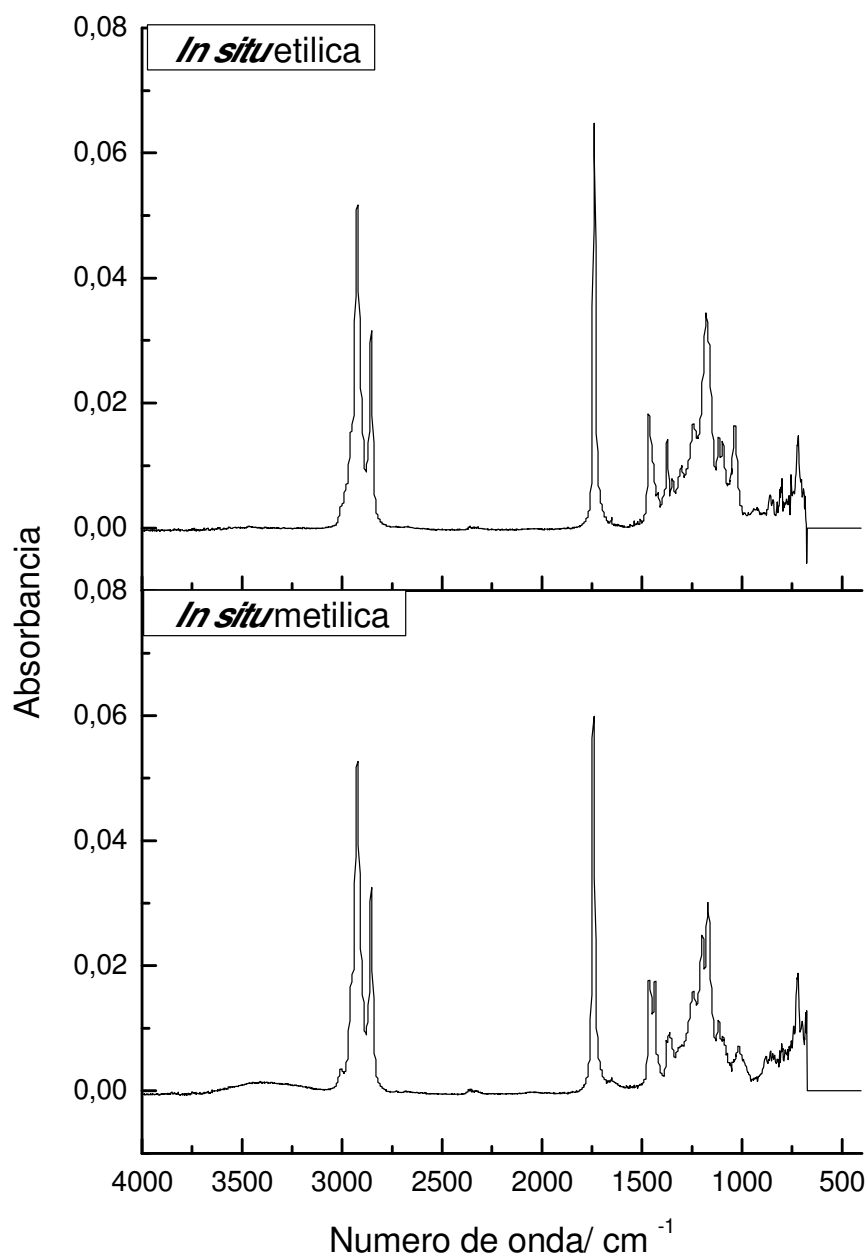


Figura 12. Espectros de FTIR das amostras *in situ* metilica e etilica.

EDGAR LOTERO *et al.*, (2005), estudaram a butanolise do óleo de soja catalisada por 1% de H₂SO₄ (m/m), à cinco temperaturas diferentes (entre 77-117 °C). Foram evidenciados um aumento acentuado da taxa de reação, com a conversão quase completa de TAGs requereu apenas 3 h à 117 °C, enquanto que para se atingir comparáveis conversões à 77°C foram necessárias 20h. O efeito da temperatura é ainda mais notável às temperaturas e pressões mais elevadas, particularmente, a 240 °C e 70 bar foram utilizados apenas 1,7 % de H₂SO₄, pra atingir conversões superiores a 90 % em 15 min.

Nas reações *in situ* o lipídio se encontra alojado no interior da célula, recoberto pela membrana celular, menos disponível ao meio reacional, dificultando ainda mais o tempo de conclusão da reação e a conversão. Entretanto todas as reações foram realizadas em condições mais brandas demonstrando que este tipo de reação ocorre de modo eficaz, porém necessitando de condições mais drásticas para maximizar a conversão. Os espectros do óleo e da biomassa antes de qualquer processo reacional também foram avaliados para demonstrar o estágio inicial dos reagentes na reação (Figura 13).

No espectro do óleo é possível notar a presença de olefinas, hidrocarbonetos alifáticos e ésteres. Nesse espectro é possível notar uma semelhança nos espectros da Figura 10 demonstrando que nos espectros das amostras H1, H2, H3, H4 e H5, onde o tempo de reação é menor, existe uma grande quantidade de TAGs sem reagir e uma mínima formação de éster.

Segundo PAVIA, *et al.*, 2001, a forte absorção a 1.715 cm⁻¹, que corresponde ao grupo carbonila C = O é muito intensa e essas características frequentemente permitem distinguir o pico em situações potencialmente confusas. Por exemplo, em certa medida as ligações, C = O (1850-1630 cm⁻¹) e C = C (1680-1620 cm⁻¹) absorvem na mesma região do espectro infravermelho.

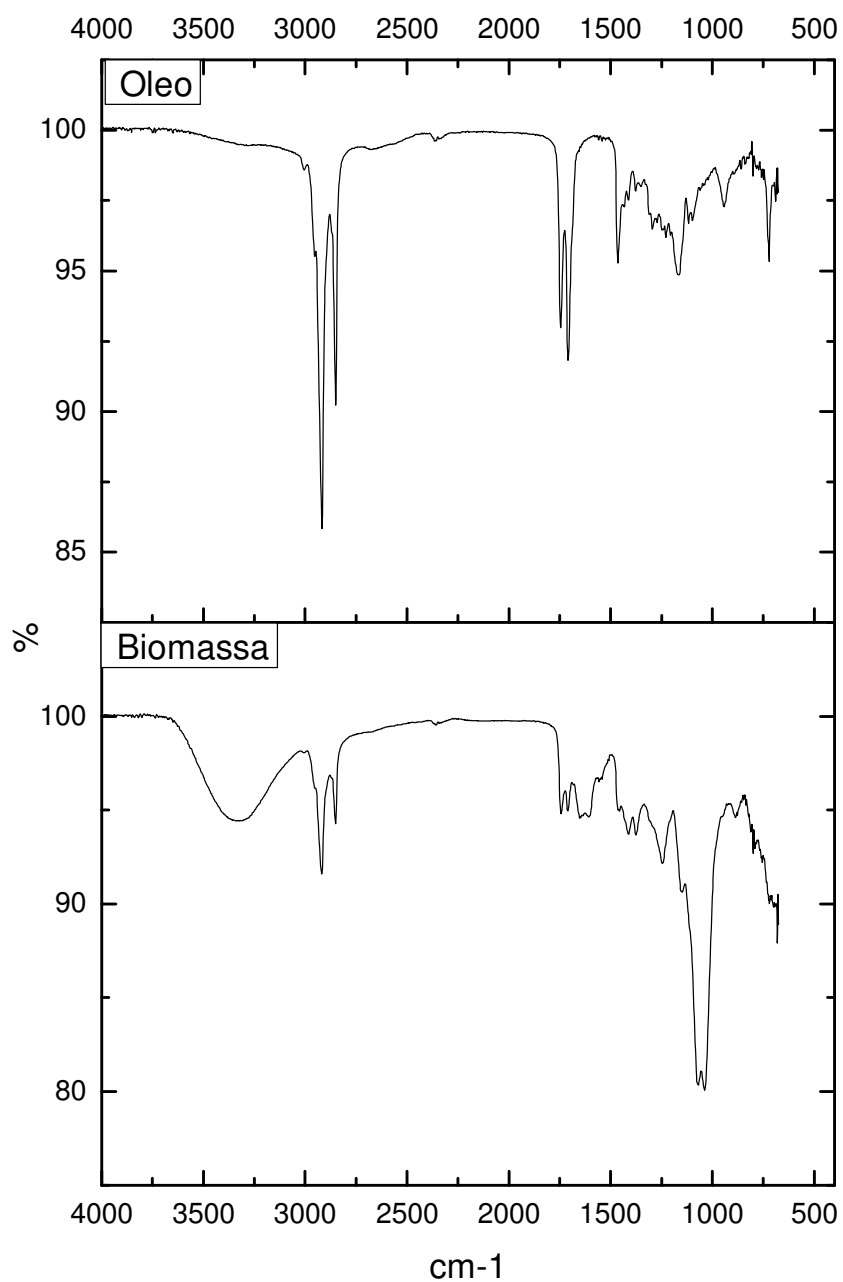


Figura 13. Espectros do óleo e da biomassa.

No espectro da biomassa foi observado a presença de fosfatos, hidrocarbonetos alifáticos, acetato éster e alcoóis primários alifáticos. As bandas características dos fosfatos são as bandas fortes em 1000 cm^{-1} e 550 cm^{-1} . Na região perto de 1230 cm^{-1}

pode ser atribuído ao fosfato duplo assimétrico (alongamento da vibração do fosfodiéster), fosfato livre e monoéster fosfato dos grupos funcionais. Também há diferenças para a região amina (proteína 1670-1620 cm^{-1}), vibrações simétricas de alongamento dos grupos funcionais - COO (1400 cm^{-1}) e na região de 1200–900 cm^{-1} de carboidratos (PISTORIUS et al., 2009).

No espectro da biomassa é possível analisar a condição inicial do material utilizado na reação de transesterificação com a presença de fosfatos, um dos principais compostos identificados nas análises experimentais de caracterização do óleo.

Além da identificação dos componentes e estimativa de éster na amostra, o uso do FT-IR como técnica auxiliar pode contribuir na identificação do óleo bem assim como da mistura do óleo/éster em reações de transesterificação ou em mistura óleo/éster em amostras adulteradas. Porém, essa técnica necessita de uma validação para a construção de modelo matemático através da quimiometria para tornar o método confiável e eficaz.

4.4.2 Identificação dos Ésteres Etílicos Obtidos Por Cromatografia Gasosa com Detector de Massas.

Utilizou-se o CG-EM para identificar os ésteres etílicos obtidos nos melhores resultados de FTIR com intuito de identificar e comparar o perfil. A Tabela 19 descreve nove ácidos graxos (C16, C18 e C18:1). Diferentemente do perfil obtido no capítulo anterior, foram detectadas cadeias de C15, C17 e C24 na mistura de ésteres obtidos pela reação *in situ*.

Tabela 20. Perfil em ácidos graxos etílico.

Amostra	Perfil Etílico								
	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2	C24:0
<i>in situ</i>	0,47	0,07	33,40	3,77	0,42	12,46	43,28	4,18	1,94
A ₀₁	0,33	-	35,95	2,54	0,77	12,26	45,07	2,35	0,72

Os métodos que utilizam catálise ácida e básica podem afetar o rendimento de reação por diversas razões, tais como a presença de água, AGL (na catálise básica), uso de quantidades inadequadas de álcool e por aquecimento (MILINSK, 2007).

Estes fatores podem afetar diretamente os resultados quantitativos devido à conversão incompleta dos lipídios a ésteres metílicos de ácidos graxos, mudança na composição dos ácidos graxos durante a esterificação e formação de compostos ser erroneamente identificados como ácidos graxos. Ainda, resíduos do catalisador usado podem levar a contaminar a coluna cromatográfica, promovendo extração incompleta dos ésteres metílicos de ácidos graxos e perda de ésteres metílicos de cadeia curta e voláteis (BRONDZ, 2002; MILINSK, 2007).

A hidrólise de um lipídio simples resulta em um ou dois tipos diferentes de produtos. A hidrólise de um lipídeo complexo produz três ou mais tipos de produto. Os ácidos graxos comuns contêm de 1 à 40 ou mais átomos de carbono numa cadeia e podem ter um número ímpar ou par de átomos de carbono. Também podem ser ramificados, com um átomo de carbono, ou mais de 20 átomos de carbono no ramo. As cadeias ramificadas podem ser iso-ácidos mono ou multi-ramificados. Há outros grupos funcionais em ácidos graxos, como hidroxil, epóxi e grupos ceto, ciclopropano e anéis ciclopropeno, acetilênico, anéis de ciclopentano, anéis furanoícos, anéis de ciclohexeno, e os anéis fenólicos, ou os anéis de naftaleno (BRONDZ, 2002).

No estudo feito por Milinsk 2007, foi observado a possibilidade de obtenção diferentes concentrações de ácidos graxos em uma mesma amostra em função do método de esterificação utilizado. O objetivo do trabalho foi verificar a eficiência de 8 diferentes métodos de esterificação envolvendo catálise ácida e básica na determinação quantitativa de cinco óleos vegetais (soja, canola, linhaça, azeite de oliva e de dendê).

A Tabela 19 descreve o perfil de CG, onde foi observada uma pequena variação em relação ao perfil metílico, mas os ácidos graxos majoritários continuaram os mesmos. Em estruturas lipídicas mais expostas ao meio reacional como os óleos vegetais, como relatado no trabalho de Milinsk (2007), apenas a influência do tipo de catalisador e método de esterificação. Foi observada a interferência da membrana celular nos lipídios intracelularmente ligados, como relatado no capítulo anterior de

Extração. A reação *in situ* em microrganismos oleaginosos necessita ser melhor investigada dependendo do tipo de membrana celular e microrganismo utilizado. As vias bioquímicas para a formação desses lipídios devem também ser exploradas para o maior entendimento e determinação das classes lipídicas que estão sendo formadas.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A produção de biodiesel a partir de microrganismos ainda se encontra em fase de investigação e desenvolvimento em escala de laboratório, visando fornecer informações úteis para auxiliar o futuro desenvolvimento dos processos de produção de biodiesel.

Ainda é necessário aperfeiçoar o uso da biomassa em transesterificações por via etílica e a quantificação desses produtos por cromatografia com padrões de ésteres etílicos internos.

A técnica de FTIR com ATR se demonstrou uma ferramenta auxiliar para determinação rápida de ésteres e produtos reacionais. Nesse trabalho é possível observar que o FTIR forneceu uma boa resposta para os produtos esperados.

As conversões obtidas nesse trabalho foram apenas estimadas necessitando de uma análise quantitativa para validação dos resultados e métodos utilizados.

Trabalhos futuros

- Otimizar os resultados obtidos neste trabalho com maior emprego de técnicas analíticas como espectrometria de massas.
- Determinar todos os subprodutos de cada extração como carotenóides e outros compostos.
- Criar um modelo matemático para validar a análise de FTIR em bioprocessos.
- Utilizar outros métodos de esterificação e transesterificação comparando os perfis obtidos.
- Avaliar a possibilidade de utilização de uma análise on line ou in line para acompanhar a cinética reacional.
- Caracterização dos ácidos graxos com análise quantitativa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOCS AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY) Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists` Society [recurso eletrônico CD ROM]. Methods for biodiesel feedstock quality, Urbana, IL:AOCS Press, c 2007

AOCS (AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY). Official methods and recommended Practices of the AOCS. 5 . ed. Champaign, 1998.

AGEITOS, J. M. et al. Oily yeasts as oleaginous cell factories. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 4, p. 1219-1227, May 2011.

AL-WIDYAN, M. I.; AL-SHYOUKH, A. O. Experimental evaluation of the transesterification of waste palm oil into biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 85, n. 3, p. 253-256, 12// 2002.

ALLINGER, N. L. Química Orgânica. **LTC – Livros Técnicos e Científicos**, v. 2 . ed, 1976.

ANGERBAUER, C. et al. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 3051-3056, 2008.

ANVISA. (Agência Nacional da Vigilância Sanitária). RDC Nº 482, de 23/09/1999. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/482_99.htm>. Acessado em: 16/03/2012, 1999.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BOBBIO, F. B., P. Introdução à química de alimentos. **Livraria Varela**, v. 2. ed. revista atualizada, p. 130, 1989.

BOSQUE-SENDRA, J. M. et al. Combining chromatography and chemometrics for the characterization and authentication of fats and oils from triacylglycerol compositional data-A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 724, p. 1-11, Apr 29 2012.

BRAIPSON-DANTHINE, S.; GIBON, V. Comparative analysis of triacylglycerol composition, melting properties and polymorphic behavior of palm oil and fractions. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, n. 4, p. 359-372, 2007.

BRONDZ, I. Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 465, n. 1-2, p. 1-37, 2002.

BRUM, A. A. S.; DE ARRUDA, L. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Extraction methods and quality of the lipid fraction of vegetable and animal samples. **Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal**, v. 32, n. 4, p. 849-854, 2009.

BUCHGRABER, M. et al. Triacylglycerol profiling by using chromatographic techniques. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 106, n. 9, p. 621-648, Sep 2004.

CARVALHO, R. M. et al. Microalgae biodiesel via in situ methanolysis. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 86, n. 11, p. 1418-1427, Nov 2011.

CEN, H.; HE, Y. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 2, p. 72-83, 2007.

CHA, T. S. et al. Differential regulation of fatty acid biosynthesis in two *Chlorella* species in response to nitrate treatments and the potential of binary blending microalgae oils for biodiesel application. **Bioresour Technol**, v. 102, n. 22, p. 10633-40, Nov 2011.

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

CHRISTIE, W. W. GAS CHROMATOGRAPHY AND LIPIDS: A Practical Guide. **THE OILY PRESS**, v. 3^ª edição, 1989.

COSTA NETO, P. R. et al. The utilization of used frying oil for the production of biodiesel. **Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras**, v. 23, n. 4, p. 531-537, 2000.

CRABBE, E. et al. Biodiesel production from crude palm oil and evaluation of butanol extraction and fuel properties. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 1, p. 65-71, 2001.

D'OCA, M. G. M. et al. Production of FAMEs from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 4, p. 1533-1538, 2011.

DAUN, V. J. B. E. J. K. Oil Extraction and Analysis, Critical Issues and Competitive Studies. **AOCS Publishing** 2004.

DE ALMEIDA, S. C. A. et al. Performance of a diesel generator fuelled with palm oil. **Fuel**, v. 81, n. 16, p. 2097-2102, 11/1/ 2002.

DE CASTRO, M. D. L.; GARCIA-AYUSO, L. E. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. **Analytica Chimica Acta**, v. 369, n. 1-2, p. 1-10, Aug 10 1998.

DONG, T. et al. Two-step in situ biodiesel production from microalgae with high free fatty acid content. **Bioresource Technology**, v. 136, n. 0, p. 8-15, 2013.

EDGAR LOTERO, Y. L., DORA E. LOPEZ, KAEWTA SUWANNAKARN, DAVID A. BRUCE, AND; JAMES G. GOODWIN, J. Synthesis of Biodiesel via Acid Catalysis. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 44, p. 5353-5363, 2005.

EHIMEN, E. A.; SUN, Z. F.; CARRINGTON, C. G. Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids. **Fuel**, v. 89, n. 3, p. 677-684, 2010.

EHIMEN, E. A. et al. Anaerobic digestion of microalgae residues resulting from the biodiesel production process. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3454-3463, Oct 2011.

EI-MASHAD, H. M.; ZHANG, R.; AVENA-BUSTILLOS, R. J. A two-step process for biodiesel production from salmon oil. **Biosystems Engineering**, v. 99, n. 2, p. 220-227, Feb 2008.

ENGEL, A.; COLLIEX, C. Application of scanning transmission electron microscopy to the study of biological structure. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 403-411, 1993.

FILHO, A. Computer prediction of triacylglycerol composition of vegetable oils by HRGC. **Chromatographia**, v. 40, p. 557-562, 1995.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

GARZÓN, C. S. L. **Produção microbiana de lipídeos**. 2009. (Master). Department of Chemical Processes, State University of Campinas, Campinas.

GECIOVA, J.; BURY, D.; JELEN, P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry - a review. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 6, p. 541-553, 2002.

GEORGOGIANNI, K. G. et al. Conventional and in situ transesterification of sunflower seed oil for the production of biodiesel. **Fuel Processing Technology**, v. 89, n. 5, p. 503-509, 2008.

GERIS, R. et al. Biodiesel from soybean oil - Experimental procedure of transesterification for organic chemistry laboratories. **Biodiesel de soja - Reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica**, v. 30, n. 5, p. 1369-1373+S1, 2007.

GÓMEZ, L. A. B. C. E. E. S. L. E. E. O. Biomassa para energia. **Editores Unicamp**, v. São Paulo, 2008.

GRIMALDI, R.; GONCALVES, L. A. G.; ANDO, M. Y. Optimization of the chemical interesterification reaction of palm oil. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 633-636, 2005.

GRUBE, M.; GAPES, J. R.; SCHUSTER, K. C. Application of quantitative IR spectral analysis of bacterial cells to acetone-butanol-ethanol fermentation monitoring. **Analytica Chimica Acta**, v. 471, n. 1, p. 127-133, Oct 23 2002a.

_____. Application of quantitative IR spectral analysis of bacterial cells to acetone-butanol-ethanol fermentation monitoring. **Analytica Chimica Acta**, v. 471, n. 1, p. 127-133, 2002b.

HAAGENSON, D. M. et al. Implementing an In Situ Alkaline Transesterification Method for Canola Biodiesel Quality Screening. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, n. 11, p. 1351-1358, 2010.

HAILEGIORGIS, S. M.; MAHADZIR, S.; SUBBARAO, D. Enhanced in situ ethanolysis of *Jatropha curcas* L. in the presence of cetyltrimethylammonium bromide as a phase transfer catalyst. **Renewable Energy**, v. 36, n. 9, p. 2502-2507, 2011.

HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. **Biotechnol Adv**, Jan 11 2012.

HALVORSEN, J. D.; MAMMEL, W. C.; CLEMENTS, L. D. Density-Estimation for Fatty-Acids and Vegetable-Oils Based on Their Fatty-Acid Composition. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 70, n. 9, p. 875-880, Sep 1993.

HARRINGTON, K. J.; D'ARCY-EVANS, C. A comparison of conventional and in situ methods of transesterification of seed oil from a series of sunflower cultivars. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 62, n. 6, p. 1009-1013, 1985.

HINCAPIÉ, G.; MONDRAGÓN, F.; LÓPEZ, D. Conventional and in situ transesterification of castor seed oil for biodiesel production. **Fuel**, v. 90, n. 4, p. 1618-1623, 2011.

HUANG, C. et al. Single cell oil production from low-cost substrates: The possibility and potential of its industrialization. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 2, p. 129-139, 3// 2013.

JEWUR, S. S. Conversão Catalítica do Etanol. **Química Nova** 1984.

KARATAY, S. E.; DÖNMEZ, G. Microbial oil production from thermophile cyanobacteria for biodiesel production. **Applied Energy**, v. 88, n. 11, p. 3632-3635, 2011.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**, v. 86, n. 10, p. 1059-1070, Jun 25 2005.

_____. Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. **Energy & Environmental Science**, v. 2, n. 7, p. 759-766, 2009.

LASSING, M. et al. **Final report on biodiesel production from microalgae - a feasibility study**. Statoilhydro ASA. Oslo, Norway. 2008

LEE, J. Y. et al. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresour Technol**, v. 101 Suppl 1, p. S75-7, Jan 2010.

LEI, H. et al. In situ production of fatty acid methyl ester from low quality rice bran: An economical route for biodiesel production. **Fuel**, v. 89, n. 7, p. 1475-1479, 2010.

LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M. K. H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, v. 87, n. 4, p. 1083-1095, 2010.

LEWIS, T.; NICHOLS, P. D.; MCMEEKIN, T. A. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid producing microheterotrophs. **Journal of Microbiological Methods**, v. 43, n. 2, p. 107-116, Dec 2000.

LIU, B.; ZHAO, Z. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, n. 8, p. 775-780, Aug 2007.

LOBO, I. P.; COSTA FERREIRA, S. L.; DA CRUZ, R. S. Biodiesel: quality parameters and analytical methods. **Quimica Nova**, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009 2009.

LONG, H. et al. Biomass resources and their bioenergy potential estimation: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 26, n. 0, p. 344-352, 10// 2013.

MA, F. R.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 1, p. 1-15, 1999.

MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, n. 1, p. 93-100, 2001.

MCNICHOL, J. et al. Suitability of Soxhlet Extraction to Quantify Microalgal Fatty Acids as Determined by Comparison with In Situ Transesterification. **Lipids**, v. 47, n. 2, p. 195-207, Feb 2012.

MEHLENBACHER, V. C. Standard methods in the fat and oil industry. **Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids**, v. 5, n. 0, p. 1-29, 1958.

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

MIDDELBERG, A. P. J. Process-Scale Disruption of Microorganisms. **Biotechnology Advances**, v. 13, n. 3, p. 491-551, 1995.

MILINSK, M. C. Análise comparativa entre oito métodos de esterificação na determinação quantitativa de ácidos graxos em óleo vegetal. **Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Química.**, 2007.

MONDALA, A. et al. Biodiesel production by in situ transesterification of municipal primary and secondary sludges. **Bioresour Technol**, v. 100, n. 3, p. 1203-10, Feb 2009.

MORAD, N. A. et al. Liquid specific heat capacity estimation for fatty acids, triacylglycerols, and vegetable oils based on their fatty acid composition. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 77, n. 9, p. 1001-1005, Sep 2000.

MORETTO, E. F., R. Óleos e gorduras vegetais. Processamento e análises. 2^o ed. Florianópolis: Editora da UFSC. 1989.

MORRISON, R. T. B., ROBERT N. Química Orgânica, 4 e d . Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 1990.

NIST. National Institute of Standards and Technology. NIST Webbook. **Disponível em:** <<http://webbook.nist.gov/chemistry/>>. **Acessado em: 17/10/2011.**, 2008.

OSUMI, M. The ultrastructure of yeast: Cell wall structure and formation. **Micron**, v. 29, n. 2-3, p. 207-233, 1998.

PARENTE, E. J. D. S. BIODIESEL: Uma Aventura Tecnológica num País Engraçado., 2003.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. Introduction to Spectroscopy **Brooks/Cole Thomson Learning** v. 3^o

2001.

PISTORIUS, A. M. A.; DEGRIP, W. J.; EGOROVA-ZACHERNYUK, T. A. Monitoring of Biomass Composition From Microbiological Sources by Means of FT-IR Spectroscopy. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 1, p. 123-129, May 1 2009.

RAMOS, M. J. et al. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresour Technol**, v. 100, n. 1, p. 261-8, Jan 2009.

RAWAT, I. et al. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. **Applied Energy**, v. 103, n. 0, p. 444-467, 3// 2013.

REZANKA, T. et al. Effect of nitrogen and phosphorus starvation on the polyunsaturated triacylglycerol composition, including positional isomer distribution, in the alga *Trachydiscus minutus*. **Phytochemistry**, v. 72, n. 18, p. 2342-2351, Dec 2011.

RODENBUSH, C. M.; HSIEH, F. H.; VISWANATH, D. S. Density and viscosity of vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 76, n. 12, p. 1415-1419, Dec 1999.

SAIDUR, R. et al. A review on biomass as a fuel for boilers. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 5, p. 2262-2289, 6// 2011.

SANTORI, G. et al. A review analyzing the industrial biodiesel production practice starting from vegetable oil refining. **Applied Energy**, v. 92, p. 109-132, Apr 2012.

SCHMIDELL, W. S. et al. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. Edgard Blücher, 2001. ISBN 9788521202783.

SILER-MARINKOVIC, S.; TOMASEVIC, A. Transesterification of sunflower oil in situ. **Fuel**, v. 77, n. 12, p. 1389-1391, Oct 1998.

SILVA, C. L. M. D. Obtenção de ésteres etílicos a partir da transesterificação do óleo de andiroba com etanol. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) – Departamento de Química Inorgânica, Universidade Estadual de Campinas. 2005.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Spectrometric Identification of Organic Compounds. **John Wiley & Sons**, v. 7^o, 2005.

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

SNYDER, L. R. K., J. J. Introduction to modern liquid chromatography. **John Wiley & Sons**, v. 2 ed, p. 258-260, 1979.

STAMENKOVIĆ, O. S.; VELIČKOVIĆ, A. V.; VELJKOVIĆ, V. B. The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: Current state and perspectives. **Fuel**, v. 90, n. 11, p. 3141-3155, 2011.

STUART, B. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. **John Wiley & Sons, Ltd**, 2004.

SU, Y.-C. et al. Selection of Prediction Methods for Thermophysical Properties for Process Modeling and Product Design of Biodiesel Manufacturing. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 50, n. 11, p. 6809-6836, 2011.

TAKESHITA, T. Competitiveness, role, and impact of microalgal biodiesel in the global energy future. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3481-3491, 2011.

TREVISAN, M. G. et al. Evolving factor analysis-based method for correcting monitoring delay in different batch runs for use with PLS: On-line monitoring of a transesterification reaction by ATR-FTIR. **Talanta**, v. 74, n. 4, p. 971-976, Jan 15 2008.

VELASQUEZ-ORTA, S. B.; LEE, J. G. M.; HARVEY, A. Alkaline in situ transesterification of *Chlorella vulgaris*. **Fuel**, v. 94, n. 1, p. 544-550, Apr 2012.

VICENTE, G. et al. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 1, p. 22-27, 2009.

WANG, L. J.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 6, p. 300-312, 2006.

WILD, R. et al. Lipids from *Lipomyces starkeyi*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 3, p. 329-335, 2010.

WUST, E. Estudo da viabilidade técnico - científica da produção de biodiesel a partir de resíduos gordurosos. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Faculdade de Ciências Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau. 2004.

XIONG, W. et al. Double CO₂ fixation in photosynthesis-fermentation model enhances algal lipid synthesis for biodiesel production. **Bioresour Technol**, v. 101, n. 7, p. 2287-93, Apr 2010.

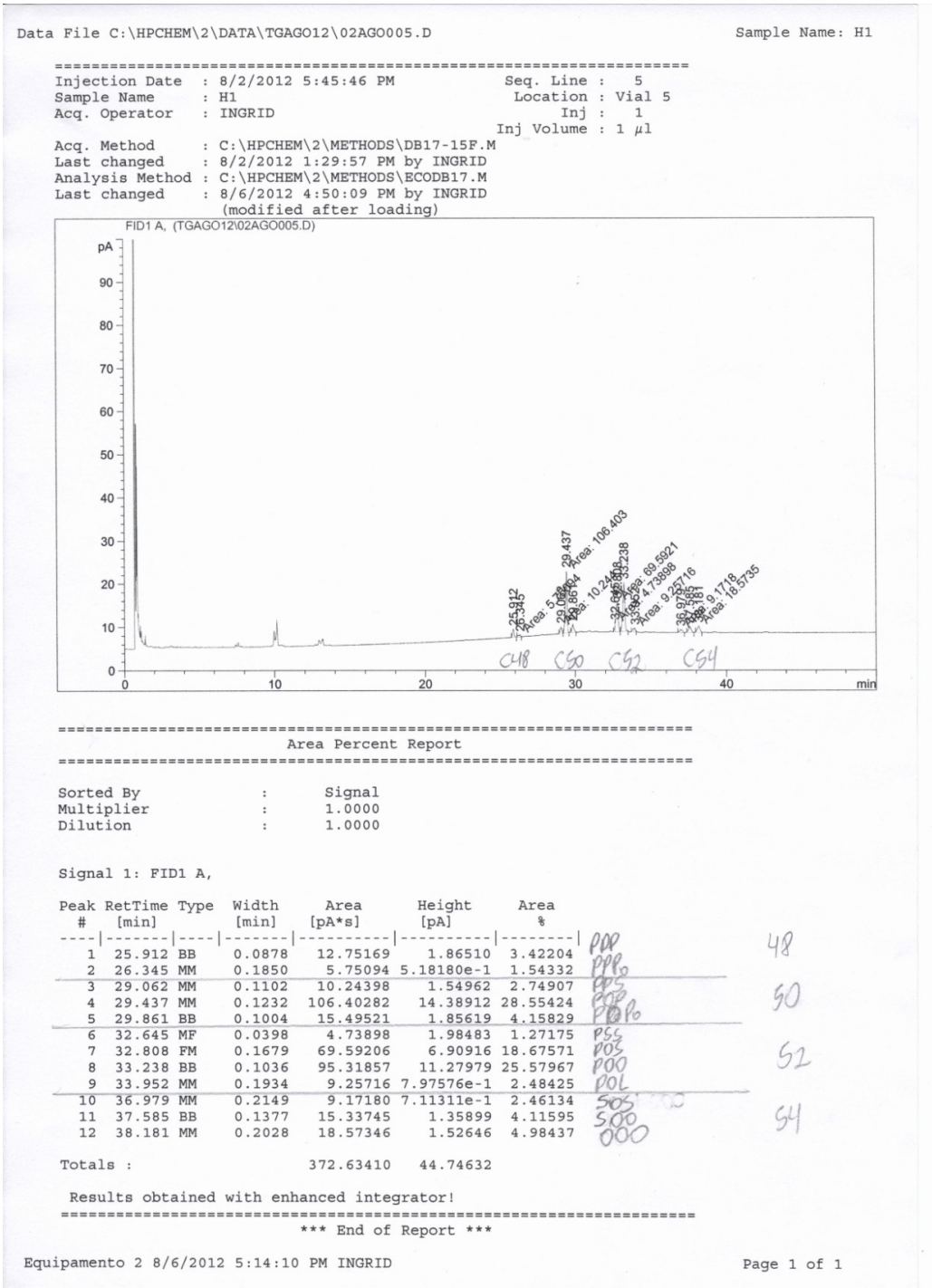
YOUSUF, A. Biodiesel from lignocellulosic biomass - Prospects and challenges. **Waste Management**, v. 32, n. 11, p. 2061-2067, Nov 2012.

ZHANG, Q. A. et al. Response surface optimization of ultrasound-assisted oil extraction from autoclaved almond powder. **Food Chemistry**, v. 116, n. 2, p. 513-518, Sep 15 2009.

ZUNIGA, P. K. et al. The use of direct transesterification methods and autoclaving for determining fatty acid yields from dried Philippine thraustochytrids, a potential source of docosahexaenoic acid. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 4, p. 915-923, Oct 2012.

7. ANEXO

7.1 CROMATOGRAMAS DOS PERFIS TAG Extrato Hexânico

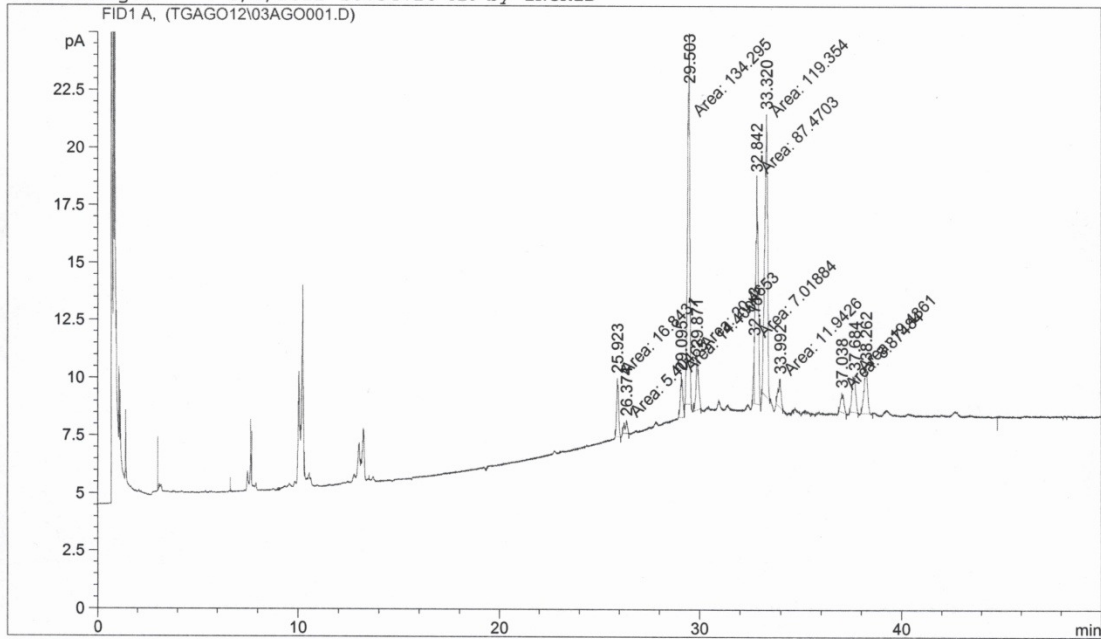


```

=====
Injection Date   : 8/3/2012 11:28:02 AM      Seq. Line   :    1
Sample Name     : H2                          Location    : Vial 1
Acq. Operator   : INGRID                      Inj         :    1
                                           Inj Volume  : 1 µl

Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\DB17-15F.M
Last changed    : 8/3/2012 11:25:54 AM by INGRID
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\ECODB17.M
Last changed    : 6/1/2012 10:34:20 AM by INGRID
=====

```



```

=====
                          Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000

```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	25.923	MM	0.1096	16.84312	2.56072	3.59095
2	26.374	MM	0.1610	5.40465	5.59553e-1	1.15227
3	29.095	MM	0.1300	14.40056	1.84642	3.07019
4	29.503	MM	0.1237	134.29529	18.10075	28.63170
5	29.871	MM	0.1359	20.46533	2.50895	4.36320
6	32.713	MF	0.0429	7.01884	2.72618	1.49641
7	32.842	FM	0.1479	87.47029	9.85731	18.64863
8	33.320	MM	0.1618	119.35397	12.29797	25.44622
9	33.992	MM	0.1579	11.94261	1.26085	2.54616
10	37.038	MM	0.1743	8.87484	8.48632e-1	1.89211
11	37.684	MM	0.2017	19.43614	1.60575	4.14378
12	38.262	BB	0.1361	23.53840	2.07857	5.01838

```
Totals :                      469.04404  56.25167
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***
=====

```

Extrato Etanólico

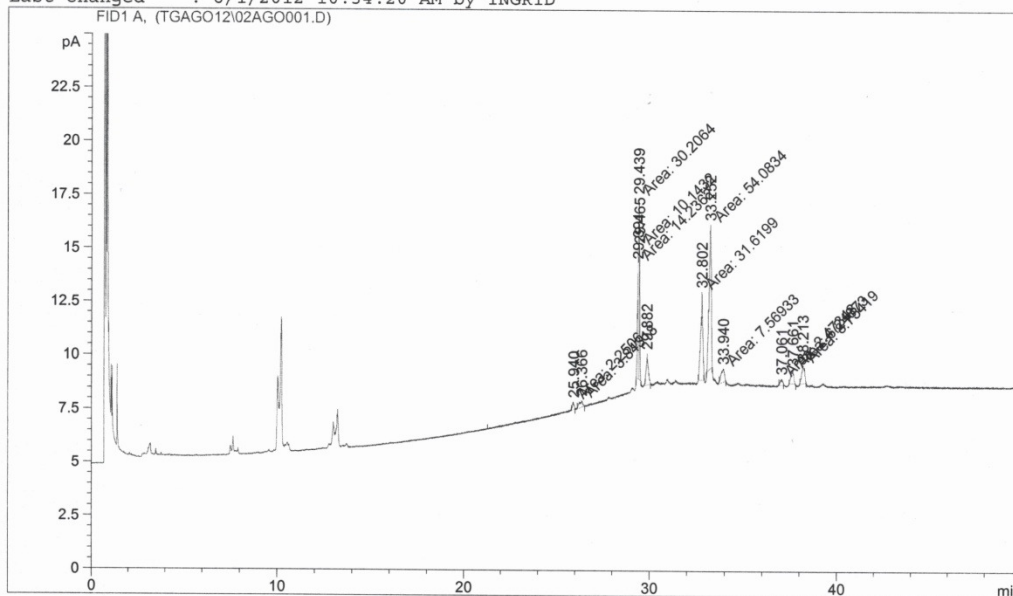
Data File C:\HPCHEM\2\DATA\TGAGO12\02AGO001.D

Sample Name: E1

```

=====
Injection Date : 8/2/2012 1:32:01 PM      Seq. Line : 1
Sample Name    : E1                        Location  : Vial 1
Acq. Operator  : INGRID                    Inj      : 1
                                           Inj Volume: 1 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\DB17-15F.M
Last changed   : 8/2/2012 1:29:57 PM by INGRID
Analysis Method: C:\HPCHEM\2\METHODS\ECODB17.M
Last changed   : 6/1/2012 10:34:20 AM by INGRID
    
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
    
```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	25.940	MM	0.1034	2.25060	3.62656e-1	1.23628
2	26.366	MM	0.1988	3.84318	3.22162e-1	2.11109
3	29.391	MF	0.0438	14.23617	5.41331	7.82007
4	29.439	FM	0.0595	30.20640	8.45495	16.59267
5	29.465	FM	0.0274	10.14316	6.16847	5.57173
6	29.882	BB	0.0909	10.61822	1.42620	5.83269
7	32.802	MM	0.1286	31.61990	4.09670	17.36911
8	33.252	MM	0.1345	54.08335	6.70302	29.70850
9	33.940	MM	0.2081	7.56933	6.06357e-1	4.15790
10	37.061	MM	0.1461	2.47348	2.82147e-1	1.35870
11	37.661	MM	0.1710	6.24873	6.09023e-1	3.43249
12	38.213	MM	0.1749	8.75419	8.34005e-1	4.80876

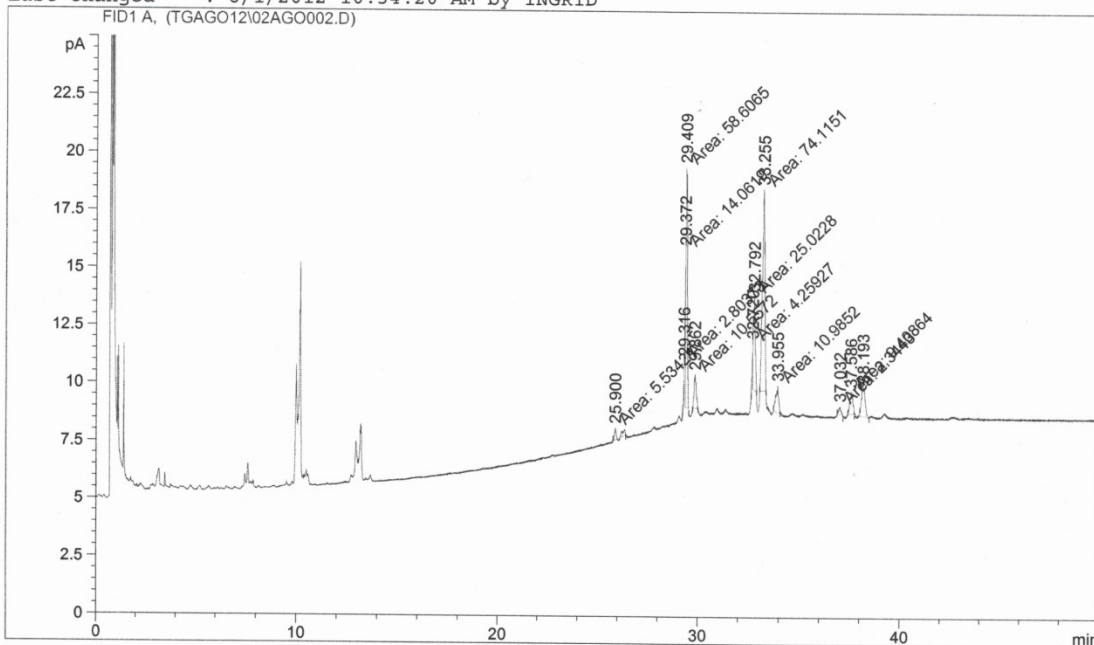
Totals : 182.04671 35.27901

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

```

=====
Injection Date : 8/2/2012 2:35:26 PM      Seq. Line : 2
Sample Name    : E 2                      Location  : Vial 2
Acq. Operator  : INGRID                   Inj      : 1
                                           Inj Volume: 1 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\DB17-15F.M
Last changed   : 8/2/2012 1:29:57 PM by INGRID
Analysis Method: C:\HPCHEM\2\METHODS\ECODB17.M
Last changed   : 6/1/2012 10:34:20 AM by INGRID
=====
    
```



=====
 Area Percent Report
 =====

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
    
```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	25.900	MM	0.1761	5.53421	5.23696e-1	2.37250
2	29.316	MF	0.0236	2.80373	1.97833	1.20195
3	29.372	MF	0.0344	14.06192	6.80588	6.02830
4	29.409	FM	0.0940	58.60654	10.38732	25.12443
5	29.862	MM	0.1211	10.55724	1.45246	4.52586
6	32.720	MF	0.0357	4.25927	1.98603	1.82593
7	32.792	FM	0.1012	25.02282	4.12025	10.72720
8	33.255	MM	0.1412	74.11506	8.74664	31.77289
9	33.955	MM	0.1611	10.98516	1.13654	4.70930
10	37.032	MM	0.1204	2.34430	3.24575e-1	1.00499
11	37.586	MM	0.1649	9.40864	9.50890e-1	4.03346
12	38.193	BB	0.1531	15.56621	1.23473	6.67318

Totals : 233.26511 39.64735

Results obtained with enhanced integrator!

=====
 *** End of Report ***

Extrato clorofórmio: metanol

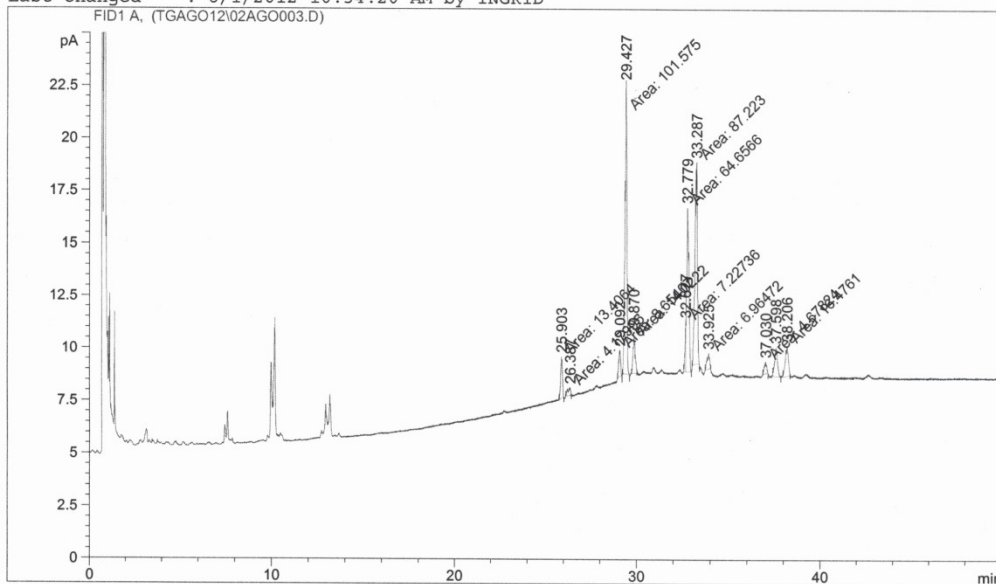
Data File C:\HPCHEM\2\DATA\TGAGO12\02AGO003.D

Sample Name: M1

```

=====
Injection Date : 8/2/2012 3:38:52 PM      Seq. Line : 3
Sample Name    : M1                      Location  : Vial 3
Acq. Operator  : INGRID                  Inj      : 1
                                           Inj Volume: 1 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\DB17-15F.M
Last changed   : 8/2/2012 1:29:57 PM by INGRID
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\ECODB17.M
Last changed   : 6/1/2012 10:34:20 AM by INGRID
=====
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
    
```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	25.903	MM	0.1132	13.40641	1.97308	3.89483
2	26.387	MM	0.1902	4.17995	3.66306e-1	1.21436
3	29.092	MM	0.1158	8.65407	1.24579	2.51418
4	29.427	MM	0.1208	101.57539	14.01416	29.50968
5	29.870	MM	0.1385	14.02217	1.68755	4.07372
6	32.677	MF	0.0509	7.22736	2.36481	2.09969
7	32.779	FM	0.1378	64.65657	7.81975	18.78402
8	33.287	MM	0.1514	87.22301	9.60089	25.34003
9	33.925	MM	0.1578	6.96472	7.35433e-1	2.02339
10	37.030	MM	0.1449	4.67824	5.37988e-1	1.35912
11	37.598	BP	0.1322	15.14648	1.36777	4.40035
12	38.206	MM	0.1904	16.47609	1.44220	4.78663

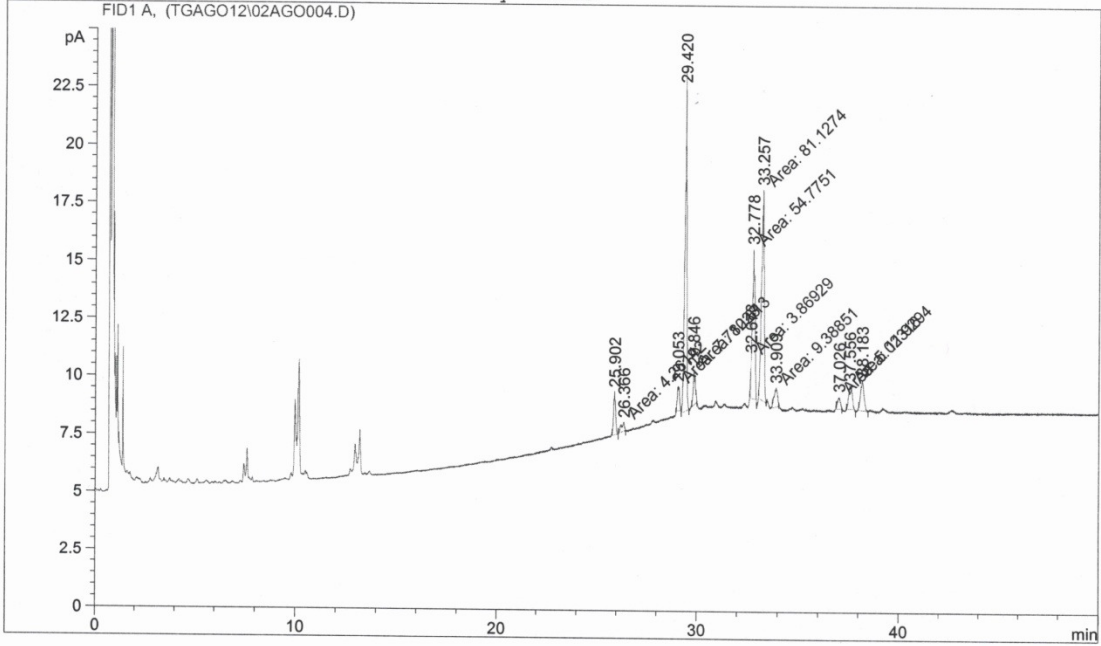
Totals : 344.21044 43.15573

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

```

=====
Injection Date : 8/2/2012 4:42:21 PM      Seq. Line : 4
Sample Name    : M2                        Location  : Vial 4
Acq. Operator  : INGRID                    Inj      : 1
                                           Inj Volume : 1 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\DB17-15F.M
Last changed   : 8/2/2012 1:29:57 PM by INGRID
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\ECODEB17.M
Last changed   : 6/1/2012 10:34:20 AM by INGRID
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
    
```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	25.902	BP	0.0832	12.70766	1.84759	4.07243
2	26.366	MM	0.1847	4.26142	3.84535e-1	1.36566
3	29.053	MM	0.1231	7.78228	1.05371	2.49399
4	29.420	VB	0.0796	95.52723	14.73677	30.61366
5	29.846	MM	0.1196	10.81304	1.50721	3.46526
6	32.673	MF	0.0368	3.86929	1.75310	1.23999
7	32.778	FM	0.1410	54.77510	6.47236	17.55381
8	33.257	MM	0.1483	81.12738	9.11746	25.99893
9	33.909	MM	0.1920	9.38851	8.14909e-1	3.00874
10	37.026	MM	0.1606	5.02316	5.21354e-1	1.60977
11	37.556	MM	0.2000	11.92941	9.93991e-1	3.82302
12	38.183	BP	0.1381	14.83670	1.28089	4.75473

Totals : 312.04118 40.48388

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

7.2 CROMATOGRAMAS HPSEC

Extração Soxhlet

Lab name: SRI Instruments
Analysis date: 05/18/2012 13:02:11
Method: Syringe Injection
Description: IR Waters
Event(s): C:\peak393-646\hexec Leticia\hpsac.evt
Integration: Peak sens=95.0 Base sens=80.0 Min area= 30.00 Standard= 1.000 Sample= 1.000 Tolerant=off
Data file: IRN2903 CHR ()
Sample: hexano
Operator: Leticia

Events:

Time	Event
0,000	INTEG INHIBIT
14,000	INTEG RUBBER BAND
18,000	INTEG INHIBIT

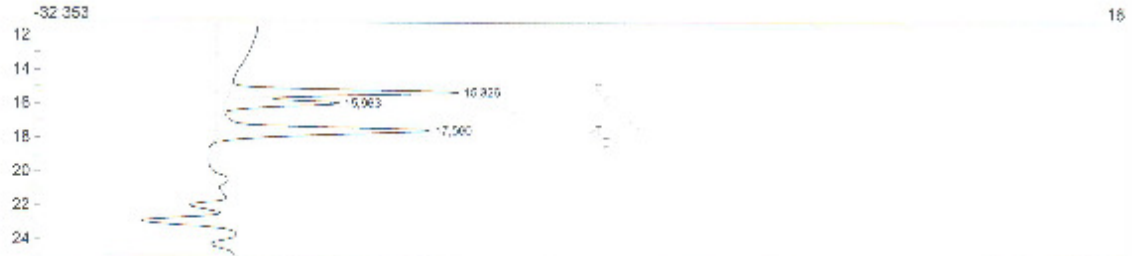


Area %	Component	Area
64,1498	TG	1416,4190
20,6479	DG	456,5473
15,2025	MG	336,1368
0,0000	AG	0,0000
100,0000		2211,1051

Lab name: SRI Instruments
 Analysis date: 05/15/2012 15:05:30
 Method: Syringe Injection
 Description: IR Waters
 Events: C:\peak393-64bit\h2sec Leticia\hpsac.evt
 Integration: Peak sens=95 C Base sens=80.0 Min area= 30.00 Standard= 1.000 Sample= 1.000 Tangent=off
 Data file: IRN2806 CHR ()
 Sample: stand 2
 Operator: Leticia

Events:

Time	Event
0.000	INTEG INHIBIT
13.500	INTEG RUBBER BAND
18.000	INTEG INHIBIT



Area %	Component	Area
35.9399	TG	932.9500
18.6630	DG	464.4896
45.3971	MG	1178.4689
0.0000	AC	0.0000
100.0000		2595.8987

Lab name: SRI Instruments
 Analysis date: 05/18/2012 13:28:41
 Method: Syringe Injection
 Description: IR Waters
 Events: C:\peak363-64\bin\psec Leticia\psec.evt
 Integration: Peak sens=65.0 Base sens=60.0 Min area= 30.00 Standard= 1.000 Sample= 1.000 Targets=off
 Data file: C:\peak363-64\bin\IRN2626.CHR ()
 Sample: metano
 Operator: Leticia

Events:

Time	Event
0.000	INTEG INH BIT
14.600	INTEG RUBBER BAND
18.000	INTEG INH BIT



Area %	Component	Area
60.7178	TG	894.5588
20.1438	DG	296.7759
19.1385	MG	281.8088
0.0000	AG	0.0000
100.0000		1473.3042

Lab name: SRI Instruments
 Analysis date: 05/15/2012 11:54:00
 Method: Syringe Injection
 Description: IR Waters
 Events: C:\peak533-64bit\hpsec.Letclia\hpsec.txt
 Integration: Peak sens=65.0 Base sens=60.0 Min area= 30.00 Standard= 1.000 Sample= 1.000 Tangents=off
 Data file: IRN2E01 CHR ()
 Sample: Etano
 Operator: Letclia

Events:

Time	Event
0.000	INTEG INHIBIT
13.500	INTEG RUBBER BAND
19.000	INTEG INHIBIT



Area %	Component	Area
36.6374	TG	1337.9342
19.3277	DC	547.5606
44.0349	MG	1247.9030
0.0000	AG	0.0000
100.0000		2632.5879

Extração Butt

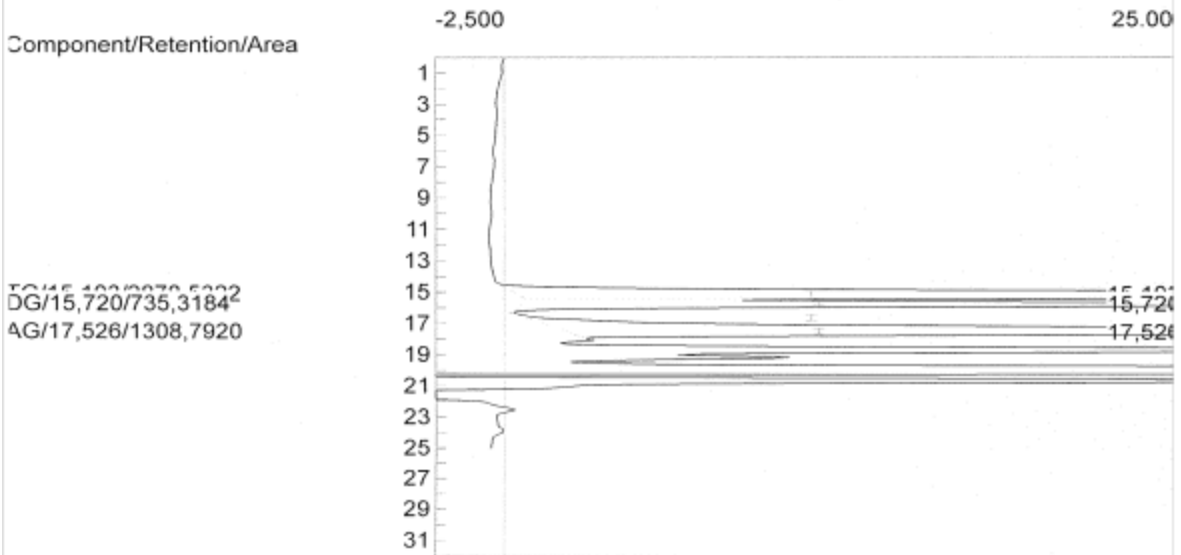
Client: Valued Customer
 Analysis date: 08/06/2012 14:18:42
 Method: Syringe Injection
 Description: UV PERKIN ELMER
 Column: RESTEK 15METER MXT-1
 Carrier: HELIUM AT 5 PSI
 Data file: IRN2959.CHR ()
 Sample: ...
 Operator: PRISCILA

Temperature program:

init temp	Hold	Ramp	Final temp
-----------	------	------	------------

Events:

Time	Event
3,000	INTEG INHIBIT
14,140	INTEG RUBBER BAND
17,940	INTEG INHIBIT



Component	Area %	Area
TG	58,4753	2878,5322
DG	14,9375	735,3184
AG	26,5872	1308,7920
	100,0000	4922,6426

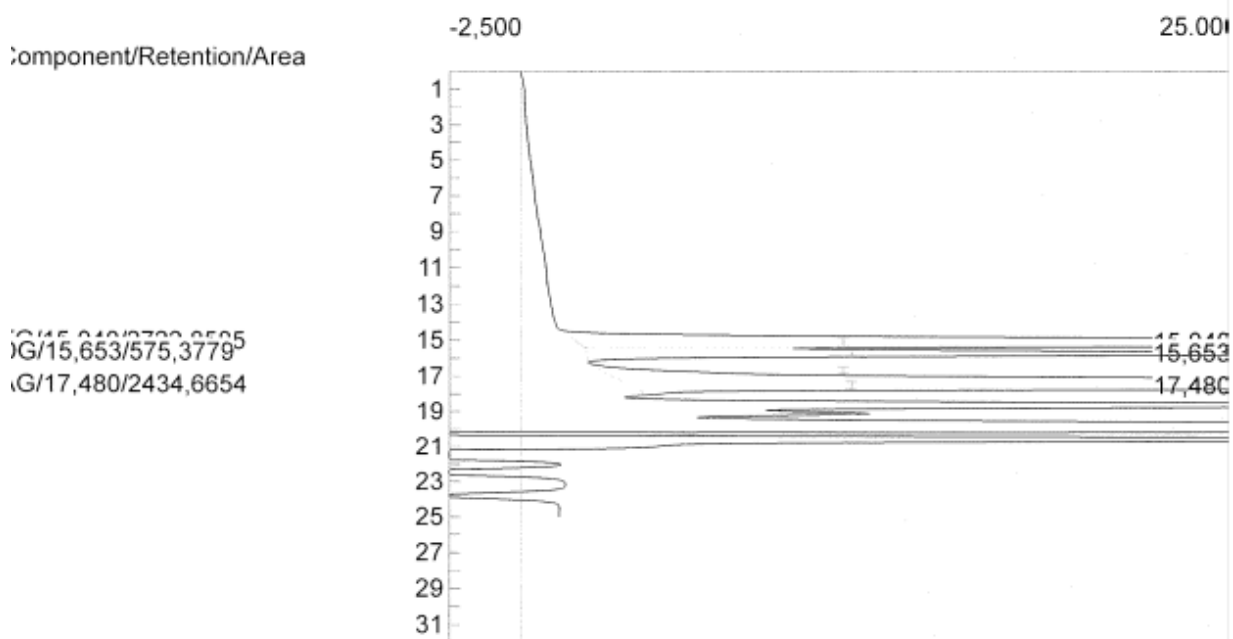
Client: Valued Customer
 Analysis date: 08/06/2012 13:49:08
 Method: Syringe Injection
 Description: UV PERKIN ELMER
 Column: RESTEK 15METER MXT-1
 Carrier: HELIUM AT 5 PSI
 Data file: IRN2958.CHR ()
 Sample: M1
 Operator: PRISCILA

Temperature program:

Init temp	Hold	Ramp	Final temp
-----------	------	------	------------

Events:

Time	Event
0,000	INTEG INHIBIT
4,140	INTEG RUBBER BAND
8,030	INTEG INHIBIT



Component	Area %	Area
IG	47,4953	2722,8585
IG	10,0364	575,3779
IG	42,4683	2434,6654
	100,0000	5732,9018

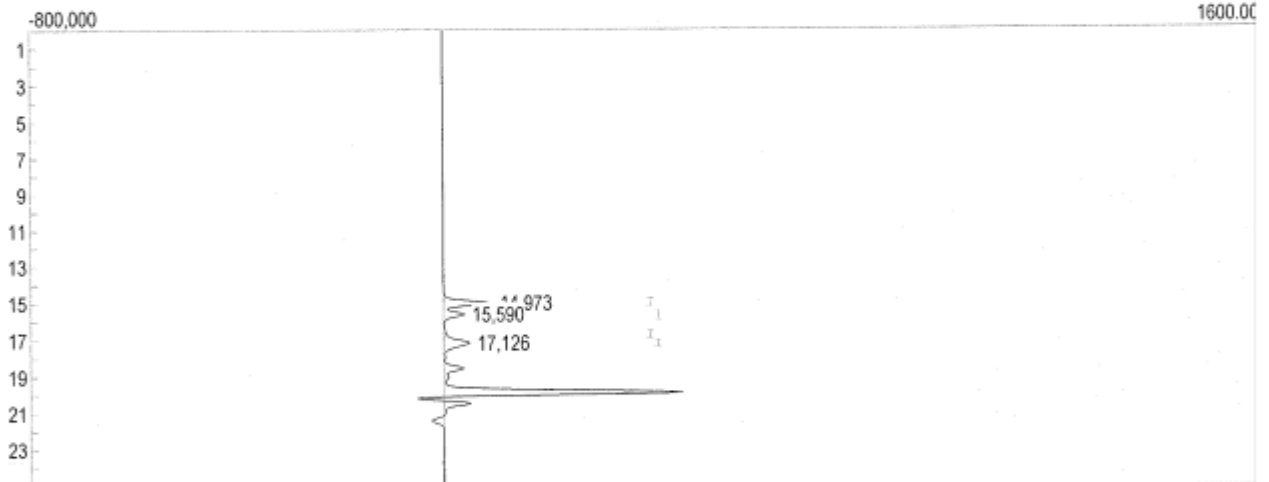
Lab name: SRI Instruments
 Analysis date: 08/06/2012 13:21:11
 Method: Syringe Injection
 Description: UV PERKIN ELMER
 Events: C:\peak393-64bit\hpsec Leficial\hpsec.evt
 Components: hpsec.cpt
 Integration: Peak sens=95.0 Base sens=60.0 Min area= 1.00 Standard= 1.000 Sample= 1.000 Tangents=off
 Data file: IRN2957.CHR ()
 Sample: E1
 Operator: PRISCILA

Events:

Time	Event
0,000	INTEG INHIBIT
4,140	INTEG RUBBER BAND
7,850	INTEG INHIBIT

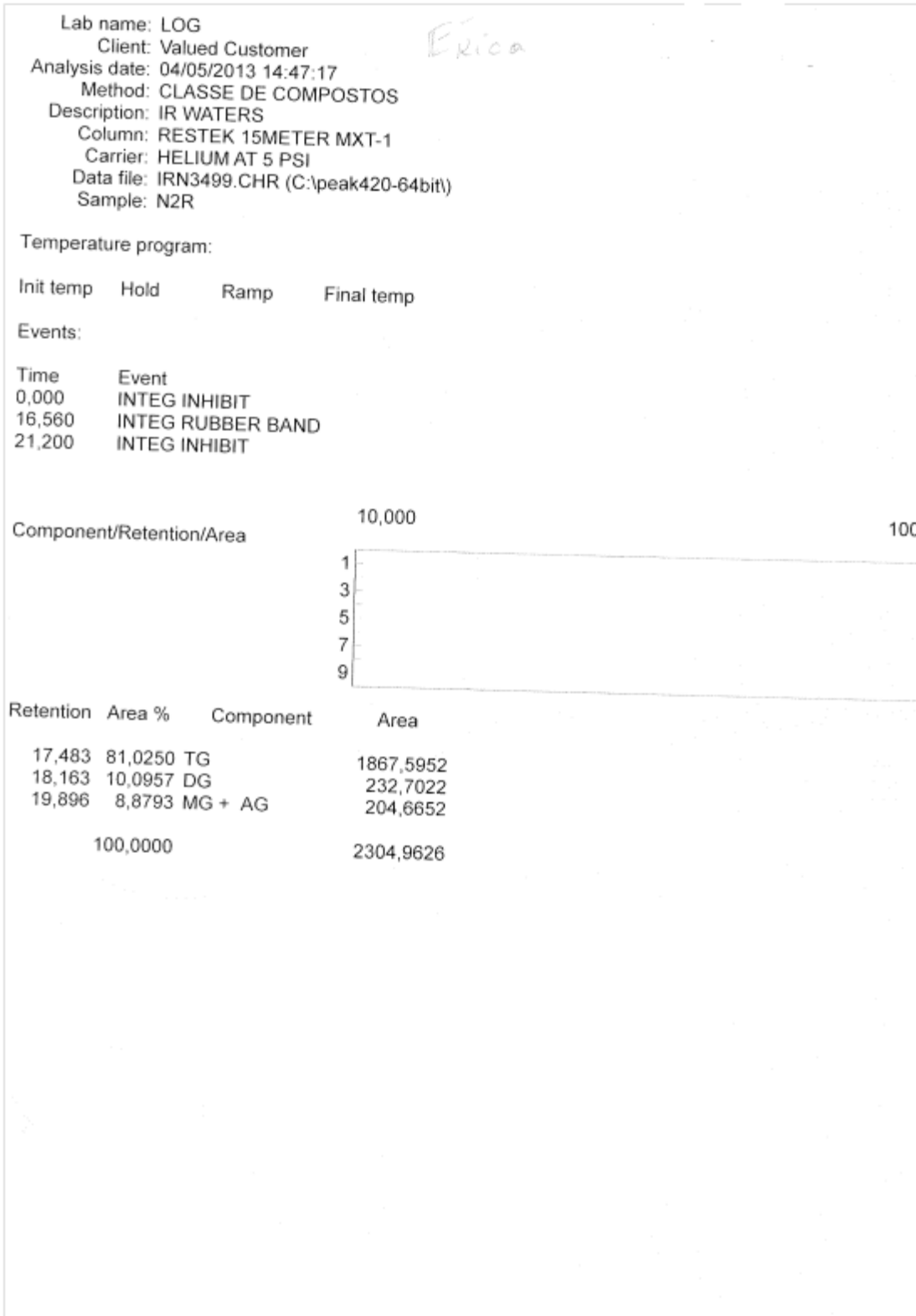
Components:

Peak	Name	Start	End	Calibration	Int.Std	Units
1	TG	14,720	15,120		0,000	
2	DG	15,360	15,883		0,000	
3	MG	16,489	16,846		0,000	
4	AG	16,982	17,359		0,000	



Retention	Component	Area	Area %
14,973	TG	1776,0298	45,9747
15,590	DG	751,9010	19,4639
17,126	AG	1335,1279	34,5614
		3863,0587	100,0000

Hidrólise Celular em Autoclave



7.3 CROMATOGRAMA CG-EM

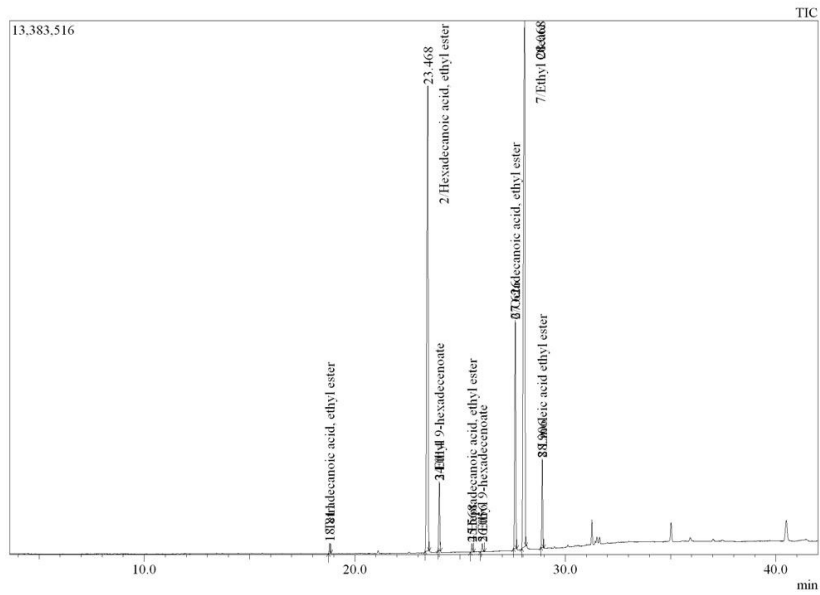
In situ etilica 001

Qualitative Analysis Report

1/

Sample Information

Analyzed by : Admin
Analyzed : 20/3/2013 15:44:11
Sample Type : Unknown
Level # : 1
Sample Name : erika
Sample ID : UNK-0001
IS Amount : [1]-1
Sample Amount : 1
Dilution Factor : 1
Vial # : 1
Injection Volume : 1.00
Data File : I:\lucy\erika\001.qgd
Org Data File : C:\GCMSolution\Data\FAME\lucy\erika\001.qgd
Method File : I:\lucy\fame - sim.qgm
Org Method File : C:\GCMSolution\Data\FAME\lucy\FAME MS.qgm
Report File :
Tuning File : C:\GCMSolution\System\Tune1\221112.Juan.qgt
Modified by : Admin
Modified : 28/5/2014 08:42:10



1 / 9

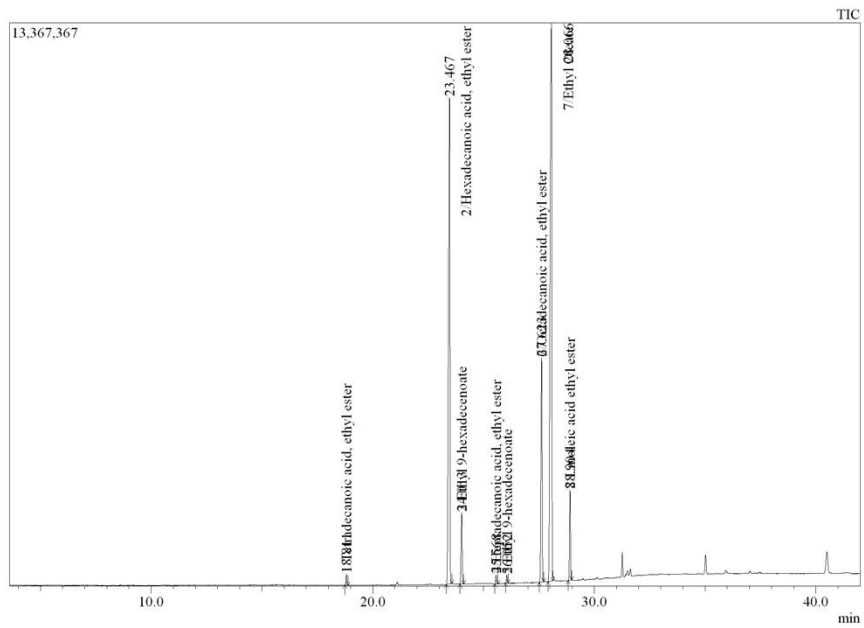
Qualitative Analysis Report

Peak#	R.Time	Peak Report TIC			
		Area	Area%	A/H	Name
1	18.811	779542	0.49	2.93	Tetradecanoic acid, ethyl ester
2	23.468	54865991	34.22	4.70	Hexadecanoic acid, ethyl ester
3	24.014	5463722	3.41	3.16	Ethyl 9-hexadecenoate
4	25.568	725040	0.45	3.25	Heptadecanoic acid, ethyl ester
5	26.056	660499	0.41	3.22	Ethyl 9-hexadecenoate
6	27.626	20360851	12.70	3.56	Octadecanoic acid, ethyl ester
7	28.068	70714145	44.11	5.37	Ethyl Oleate
8	28.906	6753624	4.21	3.04	Linoleic acid ethyl ester
		160323414	100.00		

Qualitative Analysis Report

Sample Information

Analyzed by : Admin
Analyzed : 20/3/2013 16:32:59
Sample Type : Unknown
Level # : 1
Sample Name : erika
Sample ID : UNK-0002
IS Amount : [1]-1
Sample Amount : 1
Dilution Factor : 1
Vial # : 2
Injection Volume : 1.00
Data File : I:\lucy\erika\002.qgd
Org Data File : C:\GCMSolution\Data\FAME\lucy\erika\002.qgd
Method File : C:\GCMSolution\Data\FAME\lucy\FAME.MS.qgm
Org Method File : C:\GCMSolution\Data\FAME\lucy\FAME.MS.qgm
Report File :
Tuning File : C:\GCMSolution\System\Tune1\221112.Juan.qgt
Modified by : Admin
Modified : 28/5/2014 08:47:06



Qualitative Analysis Report

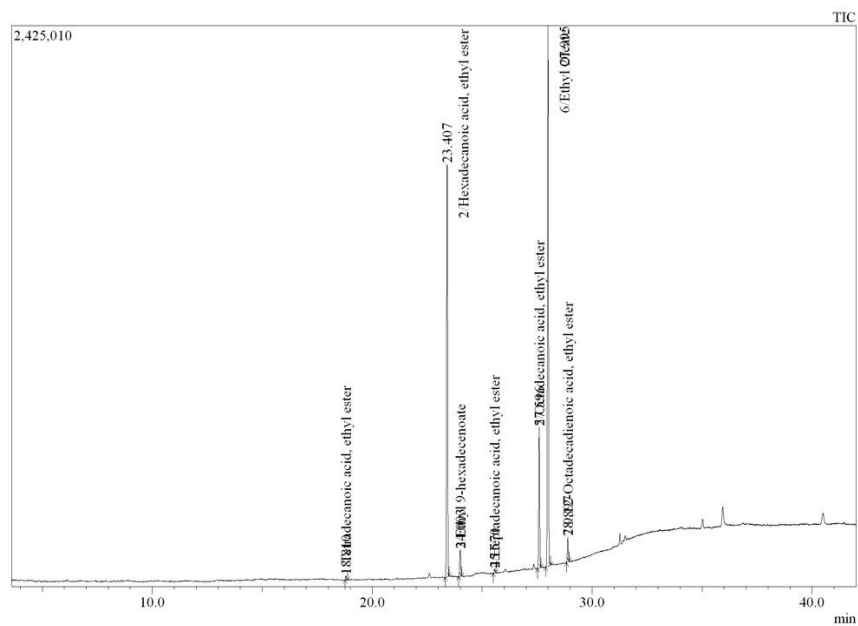
Peak#	R.Time	Area	Area%	Peak Report TIC		A/H	Name
				Height	Height%		
1	18.811	742746	0.47	251804	0.73	2.95	Tetradecanoic acid, ethyl ester
2	23.467	53283980	33.94	11537744	33.35	4.62	Hexadecanoic acid, ethyl ester
3	24.013	5535431	3.53	1693087	4.89	3.27	Ethyl 9-hexadecenoate
4	25.568	647001	0.41	209232	0.60	3.09	Heptadecanoic acid, ethyl ester
5	26.052	559707	0.36	188046	0.54	2.98	Ethyl 9-hexadecenoate
6	27.623	19973922	12.72	5320654	15.38	3.75	Octadecanoic acid, ethyl ester
7	28.066	69451300	44.24	13244810	38.28	5.24	Ethyl Oleate
8	28.904	6780633	4.32	2149954	6.21	3.15	Linoleic acid ethyl ester
		156974720	100.00	34595331	100.00		

Óleo extraído por Bligh Dyer

Qualitative Analysis Report

Sample Information

Analyzed by : Admin
Analyzed : 20/3/2013 17:21:36
Sample Type : Unknown
Level # : 1
Sample Name : erika
Sample ID : UNK-0003
IS Amount : [1]-1
Sample Amount : 1
Dilution Factor : 1
Vial # : 3
Injection Volume : 1.00
Data File : I:\lucy\erika003.qgd
Org Data File : C:\GCMSsolution\Data\FAME\lucy\erika003.qgd
Method File : C:\GCMSsolution\Data\FAME\lucy\FAME.MS.qgm
Org Method File : C:\GCMSsolution\Data\FAME\lucy\FAME.MS.qgm
Report File :
Tuning File : C:\GCMSsolution\System\Tune1\221112.Juan.qgt
Modified by : Admin
Modified : 28/5/2014 08:52:21



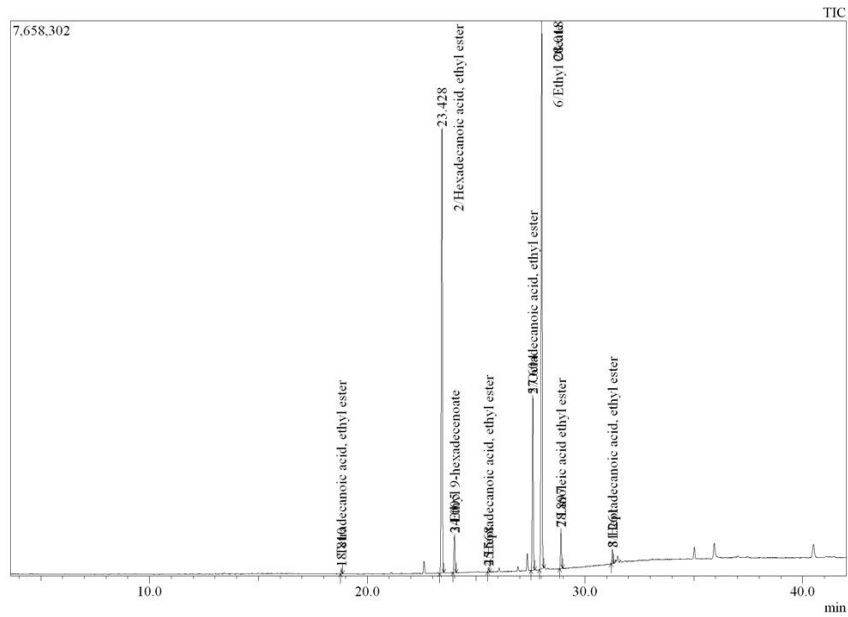
Qualitative Analysis Report

Peak#	R.Time	Area	Area%	Peak Report TIC		A/H	Name
				Height	Height%		
1	18.810	49862	0.31	17561	0.35	2.84	Tetradecanoic acid, ethyl ester
2	23.407	5804917	36.51	1783441	35.78	3.25	Hexadecanoic acid, ethyl ester
3	24.003	376458	2.37	115697	2.32	3.25	Ethyl 9-hexadecenoate
4	25.570	47124	0.30	16379	0.33	2.88	Heptadecanoic acid, ethyl ester
5	27.596	1895597	11.92	609507	12.23	3.11	Octadecanoic acid, ethyl ester
6	27.995	7407533	46.59	2335465	46.85	3.17	Ethyl Oleate
7	28.897	319013	2.01	107087	2.15	2.98	9,12-Octadecadienoic acid, ethyl e
		15900504	100.00	4985137	100.00		

Qualitative Analysis Report

Sample Information

Analyzed by : Admin
Analyzed : 20/3/2013 18:10:24
Sample Type : Unknown
Level # : 1
Sample Name : erika
Sample ID : UNK-0004
IS Amount : [1]=1
Sample Amount : 1
Dilution Factor : 1
Vial # : 4
Injection Volume : 1.00
Data File : I:\lucy\erika\004.qgd
Org. Data File : C:\GCMSsolution\Data\FAME\lucy\erika\004.qgd
Method File : C:\GCMSsolution\Data\FAME\lucy\FAME.MS.qgm
Org. Method File : C:\GCMSsolution\Data\FAME\lucy\FAME.MS.qgm
Report File :
Tuning File : C:\GCMSsolution\System\Tune1\221112.Juan.qgt
Modified by : Admin
Modified : 28/5/2014 08:56:23



Qualitative Analysis Report

Peak#	R.Time	Area	Area%	Peak Report TIC		A/H Name
				Height	Height%	
1	18.810	220342	0.36	78122	0.45	2.82 Tetradecanoic acid, ethyl es
2	23.428	21975076	35.92	6135428	35.00	3.58 Hexadecanoic acid, ethyl es
3	24.005	1679759	2.75	528719	3.02	3.18 Ethyl 9-hexadecenoate
4	25.568	186453	0.30	64457	0.37	2.89 Heptadecanoic acid, ethyl e:
5	27.604	7817988	12.78	2411965	13.76	3.24 Octadecanoic acid, ethyl est
6	28.018	27035092	44.19	7555414	43.10	3.58 Ethyl Oleate
7	28.897	1678805	2.74	552604	3.15	3.04 Linoleic acid ethyl ester
8	31.261	584554	0.96	203172	1.16	2.88 Heptadecanoic acid, ethyl e:
		61178069	100.00	17529881	100.00	

7.4 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

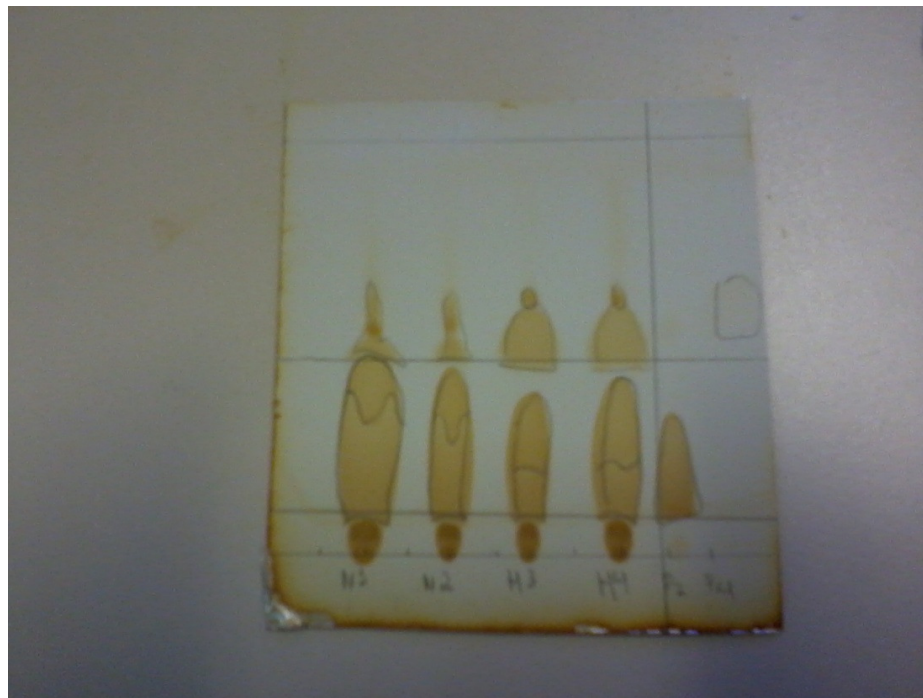


Figura 14. H₁, H₂, H₃, H₄ e H₅ transesterificação *in situ* variando temperatura (70-80 °C) e H₂SO₄ (1 -2%); P₂: Padrão ácido oleico; P₄: Padrão de metil heptadecanoato



Figura 15. 5A E 2A: Amostra extraída por Bligh Dyer (2% H_2SO_4 á 70 ° C); *In situ* 1,2e 3 transesterificação *in situ* 70°C com 100% H_2SO_4
P₂: Padrão ácido oleico; P₄: Padrão de metil heptadecanoato.