



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# **Avaliação de alguns métodos de extração de substâncias bioativas de microalgas**

**Cahilo Manuel Martins**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

**Química Medicinal**

(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Rogério Manuel dos Santos Simões

Co-orientador: Prof. Doutor Jesus Miguel Lopez Rodilla

**Covilhã, janeiro de 2019**

# Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a Deus por me amparar nos momentos difíceis e me dar forças interior, para superar as dificuldades, mostradas ao longo do caminho nas horas incertas em suprir todas a minhas necessidades;

Aos meu pais por tudo que têm feito por mim pela educação que me passaram. vós sois meus heróis;

A minha querida esposa Ilda Catarina Segunda Martins, que é minha amiga e meu amor. Sem seu apoio a caminhada até aqui seria mais dura e árdua. Obrigada por sempre estar ao meu lado e me compreender quando nem eu mesmo fui capaz!

Ao professor Doutor Rogério Manuel dos Santos Simões, pela oportunidade de aprender com ele, pela amizade, e troca constante de conhecimento e por ter acreditado no meu trabalho;

Aos queridos amigos, professores, sem esquecer da professora Cândida Tomás por ser um exemplo de coração humilde, por sua amizade e que no momento difíceis estive ao meu lado a encorajar de que podia vencer;

Ao professor Paulo Almeida, ao professor Samuel Silvestre, a professora Isabel Gonçalves e todos os professores do curso de Química medicinal de uma forma me ajudaram na construção dos meus conhecimentos;

Aos colegas de laboratório que sempre estiveram ao meu lado para me ajudar em especial João Parente e Henrique Guilherme.

Ao chefe Manuel Gouveia pelo incentivo nos meus estudos, como o Director da Universidade José Eduardo dos Santos o DR: Victor Silva.

Aos meus irmãos e seus respetivos. Se me fosse dada a oportunidade de escolher minha família, vocês seriam os escolhidos. Amo cada um de vocês com todo meu coração. Obrigada pelo apoio e pelos ótimos momentos que passamos juntos

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a minha formação pessoal e profissional, a vocês meus queridos amigos que Deus os abençoe. Muito obrigado!

## Resumo

As microalgas têm sido objecto de muitos estudos nos últimos anos tendo em vista a sua aplicabilidade nas indústrias de alimentos e farmacêutica, nas áreas da biomedicina e ambiental, bem como na produção de energia renovável. As aplicações ambientais das microalgas incluem a bio-fixação de CO<sub>2</sub>, a remoção de matéria orgânica e metais tóxicos de efluentes, a produção de biocombustíveis como biodiesel e bioetanol. De entre as microalgas estudadas, a *Chlorella* tem apresentado grande potencial de utilização em todos esses sectores, com destaque especial na área de saúde.

No presente trabalho realizou-se o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*, testaram-se alguns métodos de extracção de lípidos e identificaram-se alguns desses compostos presentes na biomassa algas, utilizando a técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.

Palavras-chave: microalgas; *Chlorella vulgaris*; lípidos; aplicações na saúde.

## Abstract

Microalgae have been the subject of many studies in recent years aiming to evaluate their applicability in the food and pharmaceutical industries, in the areas of biomedicine and the environment, and in the production of renewable energy, as well. Environmental applications of microalgae include bio-fixing of CO<sub>2</sub>, removal of organic matter and toxic metals from effluents, production of biofuels such as biodiesel and bioethanol. Among the microalgae studied, *Chlorella* has presented great potential of use in all these sectors, with special emphasis in the health area.

In the present work, the microalgae *Chlorella vulgaris* was grown, some lipid extraction methods were tested and some of these compounds were identified in the algal biomass using the gas chromatography coupled to mass spectrometry.

Key-words: microalgae; *Chlorella vulgaris*; lipids; applications in health.

# Índice

INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Benefícios dos compostos bioactivos, incluindo os ácidos gordos polinsaturados na saúde.....	1
1.2 Microalgas .....	2
1.3 Substâncias bioactivas em microalgas. ....	4
1.3.1 Carotenoides. ....	5
1.3.2 Ácidos gordos polinsaturados. ....	6
1.4 Métodos de lise celular e extração de compostos activos.....	7
Capítulo:2.....	9
2.1 Objectivo do trabalho .....	9
Capítulo:3.....	10
3 Materiais e métodos .....	10
3.1 Reagentes e solventes .....	10
3.2 Microalgas .....	10
3.3 Métodos .....	11
3.3.1 Produção de biomassa alga.....	11
3.3.2 Produção de biomassa algas em reator cilíndrico de 1L.....	12
3.3.3 Produção de biomassa algas em reator cilíndrico de 5L.....	12
3.3.4 Produção de biomassa algas em reator de flat-plate descontínuo .....	13
3.3.5 Manutenção e controlo do processo. ....	13
3.4 Desintegração celular e extração de lípidos.....	14
3.4.4 Identificação e quantificação de compostos .....	18
4 Resultados e discussão .....	21
4.1 Crescimento da biomassa .....	21
4.1.1 Reactores com volumes diferentes e a mesma geometria .....	21
4.1.2 Reactores com geometrias diferentes .....	22
4.2 Rotura da biomassa e Extração .....	23
4.2.1 Ensaio de rotura .....	23
4.2.2 Identificação dos componentes dos extratos.....	26
Capítulo 5.....	31
Conclusões e perspetivas futuras.....	31
Capítulo 6.....	32
Referência bibliografia.....	32
Anexos.....	37
Anexos de aspectos das estruturas dos lípidos .....	37

# Lista de figuras

- Figura 1.1** - Imagem de reactor fechado industrial;
- Figura 1.2** - Estrutura das moléculas B-Carotenos e vitamina A;
- Figura 1.3** - Estrutura de alguns ácidos gordos.
- Figura 3.1** - Fermentadores diversos com culturas de microalgas;
- Figura 3.2** - Fotobioreator cilíndrico de 1litro;
- Figura 3.3** - Fotobioreator cilíndrico de 5 litros;
- Figura 3.4** - Fotobioreator flat-plate;
- Figura 3.5** - Reta de calibração da biomassa;
- Figura 3.6** - Pré-tratamento da biomassa;
- Figura 3.7** - Evaporador rotativo;
- Figura 3.8** - Esquema do processo de extração;
- Figura 3.9** - Balão de decantação ilustrando a separação de fases;
- Figura 3.10** - Equipamento LC-MC/LC-GS;
- Figura 3.11** - Absorvância versos concentração de ácido linoleico;
- Figura 4.1**- concentração de biomassa de algas produzidas ao longo do tempo na primeira série de crescimento em reatores cilíndricos de 1l e 5l;
- Figura 4.2**- Ph do meio de cultura ao longo do tempo todas as manhãs antes de ajustar a ph 7,5 da primeira série de ensaios;
- Figura 4.3** - *Figura: 4.3- flat-plate série 1 e reator de 5l série 2;*
- Figura 4.4** - Massa de extrato obtida para diferentes condições de concentração celular;
- Figura 4.5** - Visualização da migração de compostos numa proporção de 7/3 e lâmpada ultravisível.
- Figura 4.6** - Cromatografia (GC) do extracto de clorofórmio (esquerda) e metanol (direita) da biomassa algas após a desconstrução celular com ácido sulfúrico.
- Figura 4.7** - Espetro de massa do pico dos 23min:55 seg.
- Figuras 4.8** - Estruturas destacadas de acordo com a nomenclatura acima mencionada.

## Listas de tabelas

**Tabela 3.1** - Constante dielétrica, índice de polaridade e massa volumétrica de diferentes solventes usados na extração;

**Tabela 3.2** - Solução stock de nutrientes;

**Tabela 3.3** - Métodos de desintegração celular usada na fase preliminar do trabalho;

**Tabela 3.4** - Composição temporal do eluente;

**Tabela 4.1** - Métodos de desintegração celular usada na fase preliminar do trabalho;

**Tabela 4.2** - Volume de solvente aplicado no processo de extração;

**Tabela 4.3** - Volume de solvente efetivamente medidos após o processo de extração;

**Tabela 4.4** - Aspectos qualitativos dos cromatogramas.

## Lista de acrónimos. Abreviaturas e símbolos

**CO<sub>2</sub>** - Dióxido de carbono;

**CHCl<sub>3</sub>** - clorofórmio ou triclorometano;

**PUFAs** - ácidos gordos polinsaturados;

**DHA** - ácido docoso-hexaenoico;

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** - ácido sulfúrico;

**NaOH** -Hidróxido de sódio;

**pH** - escala numérica adimensional utilizado para especificar acidez ou basicidade;

**Pellet**- resido da biomassa;

**LC-MS** - Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa;

**GC-MS** - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa;

**%** - percentagem;

**MS** - moagem do material seco;

**HM 1min** - homogeneizador mecânico 10000 rpm 1 min;

**M+E** - moagem → enzima;

**P+E** - pressão → enzima;

**HM 24000 rpm** - homogeneizador mecânico 24000 rpm, 1 min;

**HA** - hidrólise ácida;

**P+U** - pressão → ultrassons;

**P branco** - Pressão (68 atmosferas);

**MC** - moagem criogénica;

**MC+U** - moagem criogénico → ultrassons;

**HM 5min** - homogeneizador mecânico 10000 rpm 5 min;

**µm** - Micrometro;

**kg** - Quilogramas.

# Capítulo 1

## INTRODUÇÃO

### 1.1 Benefícios dos compostos bioativos, incluindo os ácidos gordos polinsaturados na saúde

As microalgas são micro-organismo reconhecidos como fonte natural de grande importância de novos compostos funcionais, tais como as vitaminas, minerais e proteínas, bem como carotenoides, lípidos e polissacáridos; podem ainda ser usadas diretamente como suplementos alimentares para alimentos saudáveis. A *Chlorella vulgaris* são algas verdes unicelulares, cultivadas principalmente em lagoas de água doce, onde se adaptam e desenvolvem com facilidade. Estudos diversos mostraram que o consumo das algas do género *Chlorella* tem vários benefícios para a saúde humana, nomeadamente efeitos anti-proliferativos sobre células cancerosas, atividade anti-inflamatória e anti-oxidante (SALAS-CORONADO1 et al 2016, SAULI, E.& R. SARBATLY et al 21012, LIANG et al 2009). Por exemplo, os esteroides extraídos do género *Chlorella* têm uma longa história e provaram ter efeitos importantes na atividade antifúngica, nomeadamente o ergosterol e seus análogos. Assim, um método eficiente para o isolamento e purificação de esteroides da *Chlorella vulgaris* em quantidades razoáveis é de grande importância para novas investigações sobre os seus efeitos biológicos e para o desenvolvimento de novos produtos para a área da saúde (JIANBING WU,2017). De fato, as microalgas apesar de receberem uma especial atenção como uma fonte de lípidos (transformável em biodiesel) também têm sido objeto de interesse por parte da indústria farmacêutica, como fonte de esteroides, ácidos gordos polinsaturados, conhecidos por PUFA, polissacáridos e carotenoides (MOTONOBU GOTO et 2015), entre outros (ARJUNA, et al 2016 TRARCILLA al.; 2016). As algas fazem parte de sistemas ecológicos complexos, interdependentes e competitivos, tendo-se adaptado às mais diversas condições ambientais através da biossíntese de metabolitos secundários, como estratégia de sobrevivência (CARDOZO et al, 2007). Inúmeras atividades biológicas foram relatadas na literatura incluindo atividades anti-oxidante, anti-inflamatória, imuno-modulatória, anti-virais e antimicrobianas, entre outros, demonstrando o potencial destes organismos (SMIT et al, 2004).

As microalgas têm um potencial biotecnológico excepcional, uma vez que produzem substâncias naturais e biomateriais que podem encontrar aplicações industrial diversificadas, além de constituírem alternativas às fontes não renováveis. No entanto, existem ainda alguns constrangimentos à sua exploração industrial. Por exemplo, a viabilidade económica da produção de biodiesel a partir dos lípidos das algas ainda não está assegurada, principalmente devido aos altos custos de colheita e secagem de biomassa. A viabilidade melhora quando se

considera a exploração das microalgas nas suas diferentes vertentes; i.e. energética, ambiental e de produtos de elevado valor em produção em grande escala (ACKMAN, R. G. WCOT, 1987 e RAFAEL SILVA MENEZES et al, 2013)

Algumas vantagens das microalgas são as seguintes: apresentam um ciclo de vida curto e altas taxas de crescimento; permitem condições de cultivo diversificadas, além da possibilidade de colheita durante todo o ano; não há necessidade de agroquímicos; exigem uma área significativamente reduzida para o cultivo e, conseqüentemente, usam um volume reduzido de água potável; podem ser cultivadas em terras não agrícolas, causando um impacto menor, se não inexistente, no fornecimento global de alimentos. Ao contrário de outros tipos de matérias-primas, que são produzidas em grandes extensões de terras agrícolas, as microalgas não competem com a produção de tais produtos para a alimentação humana.

A produção de lípidos por via das microalgas é uma alternativa cujo interesse tem crescido consideravelmente (ARJUNA et al,2014). Entre os lípidos, têm particular interesse os ácidos gordos do tipo ómega-3, sendo a sua produção a partir de microalgas utilizando substratos sustentáveis e condições de cultura que optimizem o rendimento em ácidos gordos polinsaturados um grande desafio (JANG et al, 2005).

No entanto o principal desafio na produção dos ácidos gordos polinsaturados é a seleção de estirpes que produzam grande quantidade de biomassa e apresentem alto rendimento de ácidos gordos com elevado teor em ómega-3 (LI et al,2008 & \*, CARL et al.;2009). Um dos caminhos que tem vindo a ser explorado é a modificação do metabolismo das microalgas favorecendo a produção de  $\omega$ -3 PUFA.

## 1.2 Microalgas

As algas são organismos muito diversos, predominantemente autotróficos, presentes no ambiente aquático e nos mais diversos ambientes onde há humidade, sendo o termo completamente desprovido de valor taxonómico, visto que designa organismos muitos distintos entre si quanto à sua origem, composição química e morfologia. As algas pertencem a diversas divisões e classes baseadas em muitos casos na coloração dos indivíduos (VAN DEN HOECK et al, 1995). A sua coloração variada é proporcionada pela presença de pigmentos. Estes organismos podem ser unicelulares ou multicelular (KWIETNIEWSKA et al.;2012); são seres com a capacidade de realizar a fotossíntese, porém não possuem folhas, raízes e nem tecidos vasculares (VAN DE HOECK et al,1995). As microalgas são predominantemente aquáticas e geralmente microscópicas unicelulares, podendo formar colónias e apresentar pouca ou nenhuma diferenciação celular.

As algas aquáticas, tais como a *Chlorella vulgaris*, exercem um papel ecológico importante, semelhante ao das plantas no que diz respeito ao habitat terrestre, pois são os produtores primários no ambiente (RAVE NET et al.;2007).

As microalgas são micro-organismos com clorofila e outros pigmentos fotossintéticos capazes de realizar a fotossíntese e libertar oxigénio. São capazes de captar CO<sub>2</sub> e utilizar a luz como

fonte de energia para produzir biomassa e oxigênio, tendo assim um impacto significativo no balanço global de oxigênio e CO<sub>2</sub>. As algas, bem como as microalgas, desempenham um papel central no ciclo do carbono e são responsáveis pela libertação de 50% do oxigênio atmosférico e pela fixação de carbono.

Para além de preferencialmente autotróficas, apresentam metabolismo heterotrófico e amiotrófico, possibilitando-lhes tirar proveito de diferentes fontes de energia e carbono para o crescimento (CRISAL ZUNIGA, 2016). Existem mais de cem mil espécies diferentes de micro-organismo pertencente a família das algas. As algas são facilmente cultivadas e podem ser manipuladas para produzirem grandes quantidades, sem que haja distúrbio em habitats naturais ou fonte de alimentos.

A microalga verde *Chlorella vulgaris* tem sido amplamente reconhecida como um candidato promissor para a produção de biocombustíveis devido à sua capacidade de armazenar alto teor de lipídios e à sua versatilidade metabólica natural. Sob condições ótimas, podem ser cultivadas gerando grandes quantidades de biomassa.

As algas são importantes fontes de compostos essenciais para a nutrição humana. Em muitos países, a indústria alimentar consome uma grande quantidade de algas bastante conhecidas, entre elas a *Chlorella vulgaris*, por fornecerem grande quantidade de fibras, minerais, vitaminas, proteínas e anti-oxidante; nos últimos tempos, observa-se um esforço no desenvolvimento do cultivo em larga escala em detrimento da exploração indiscriminada dos bancos naturais. Os compostos mais explorados são os ácidos gordos e esteróis, carotenoides, lípidos, micospirinas tipo aminoácido (CARDOZO et al, 2007).

Os primeiros interessados em verificar a atividade anti-oxidante de algas foram os japoneses, com objectivos de obter novos aditivos antioxidantes para alimentos, em substituição dos antioxidantes sintéticos. Mesmo com o desenvolvimento dos processos sintéticos para a obtenção de novas moléculas a partir do final do XIX, os produtos naturais sempre exerceram um papel importante na pesquisa de novos compostos farmacêuticos ativos. Este facto deve-se à grande complexidade estrutural de alguns de seus princípios ativos. Atualmente, uma grande percentagem dos fármacos clinicamente viáveis e comercialmente disponíveis com atividades anti-tumoral e anti-inflamatório ou anti-infecciosa, por exemplo, tem origem em produtos naturais (Shu,1998).

A microalga unicelular *Chlorella vulgaris*, da família Chlorophyta, serve há muito tempo como organismo modelo. As estirpes apresentam flexibilidade metabólica substancial em resposta a perturbações ambientais; além disso, são capazes de usar nutrientes (ou seja, carbono orgânico e minerais) diretamente das águas residuais para o crescimento, tornando-se fábricas celulares atraentes para processos de produção biosustentáveis (CRISAL ZUNIGA, 2016).

À escala industrial, uma boa parte das microalgas são produzidas em lagoas artificiais abertas (tipo “race way”) operados continuamente, de modo que o CO<sub>2</sub> e os nutrientes são constantemente adicionados, enquanto as microalgas são recolhidas na extremidade oposta

para manter o sistema em estado estacionário. Nestes casos, recomendam-se lagoas com um volume máximo de 30 m<sup>3</sup> para o melhor desempenho.

O cultivo de microalgas em lagoas do tipo “race way” requer pouco investimento para construção e manutenção, enquanto os tanques podem ser ampliados facilmente. No entanto, as condições reinantes nestas lagoas são difíceis de controlar, têm baixa eficiência de produção e são susceptíveis à contaminação. Esse sistema requer grandes áreas de cultura, mistura eficiente e sofrem a falta de CO<sub>2</sub> suficiente e luz limitada nas camadas inferiores. Os sistemas abertos são usados comercialmente para produzir algumas estirpes de microalgas com condições de crescimento muito específicas; por exemplo, *Chlorella* sp., *Spirulina* sp., e *Dunaliella salina* Dunal (SALAS-CORONADO et al, 2016). Porém, existem explorações industriais em fotobioreator fechado como está ilustrado na imagem abaixo.



*Figura:1.1 Imagem de reator fechado industrial.*

### **1.3 Substâncias bioativas em microalgas.**

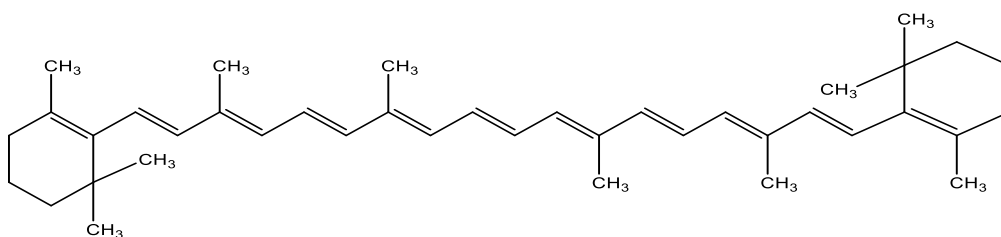
O interesse inicial pelo estudo de substâncias com atividade antioxidante (AAO) em algas surgiu no Japão, na busca de novos aditivos para alimentos, em substituição dos antioxidantes sintéticos utilizados, como o hidroxianisol butilado e o hidroxitolueno butilado, os quais mostravam efeitos carcinogênicos, alterações enzimáticas e lipídicas em animais. O facto de as algas secas poderem ser armazenadas por um longo período de tempo, sem o perigo da deterioração oxidativa, apesar de apresentarem mais de 30% do total dos seus ácidos gordo na forma de cadeias polinsaturadas (principalmente as algas *Chlorella vulgaris*), despertou o interesse dos pesquisadores em relação aos produtos antioxidantes presente nessas algas. Para avaliarem o potencial das substâncias antioxidantes presentes nas microalgas usaram o teste da estabilidade do éster metílico do óleo de algas e constataram que 60% das frações solúveis em clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) dos extratos das algas testadas foram capazes de estender o período de indução da reação do substrato éster (tempo necessário para atingir um ponto

crítico de oxidação). As algas *Chlorella vulgaris*, em geral, apresentaram maior atividade antioxidante. Por outro lado, a biossíntese de ácidos gordos polinsaturados, como o ácido linoleico desempenha um papel essencial na resposta de plantas e outros organismos ao abaixamento da temperatura. A introdução de uma ou mais ligações duplas cis nas cadeias de hidrocarbonetos de ácidos gordos confere propriedades de fluidização às biomembranas. Um grande volume de trabalho suporta o papel das desnaturases de ácidos gordos como parte de um sistema de controlo em feedback em que a fluidez da membrana é mantida perto de um certo nível, apesar das mudanças na temperatura ambiente. Esta homeoviscosidade parece ser importante nos organismos fotossintéticos para uma ótima função do cloroplasto a baixas temperaturas.

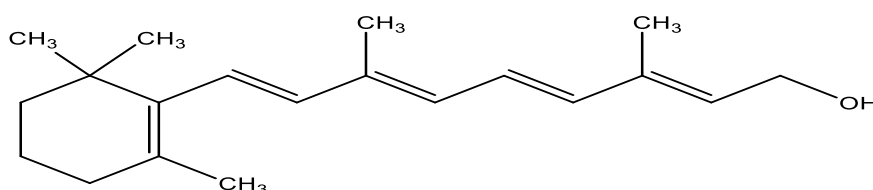
### 1.3.1 Carotenoides.

Carotenoides são substâncias químicas do tipo pigmento que encontramos em abundância na natureza, desde as bactérias, algas e fungos, até às plantas e animais. São os carotenoides que na natureza conferem os tons de amarelo ao vermelho. Plantas, algas, fungos e bactérias conseguem sintetizá-los, já os animais não, devendo adquiri-los através da dieta. Os carotenoides são caracterizados por serem lipossolúveis e por terem grupos oxidáveis.

A sua estrutura química pertence à classe dos tetraterpenoides, tendo a propriedade de absorver luz visível em diferentes comprimentos de ondas. Na natureza encontramos mais de 900 tipos de carotenoides, estando os comprimentos de onda onde absorvem radiação associados ao alongamento de cadeia, isomerização, migração de duplas ligações, hidrogenação, desidrogenação, ciclização, entre outros. Podem ser divididos em duas classes: carotenos e xantofilas. A figura seguinte ilustra a estrutura do  $\beta$ -caroteno e da vitamina A, derivada do  $\beta$ -caroteno.



Molécula de  $\beta$ -caroteno.



Molécula de vitamina A.

Figura: 1.2 - Estrutura das moléculas de  $\beta$ -caroteno e vitamina A.

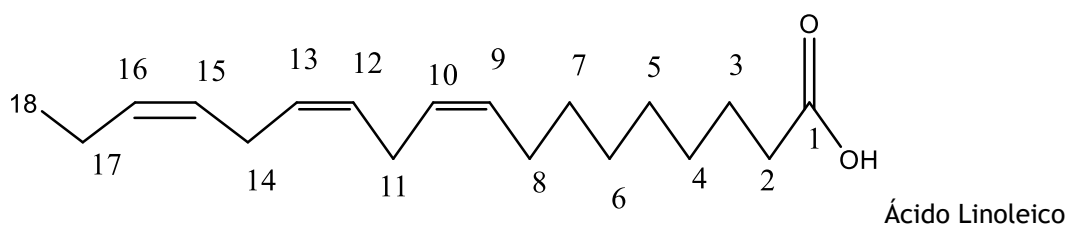
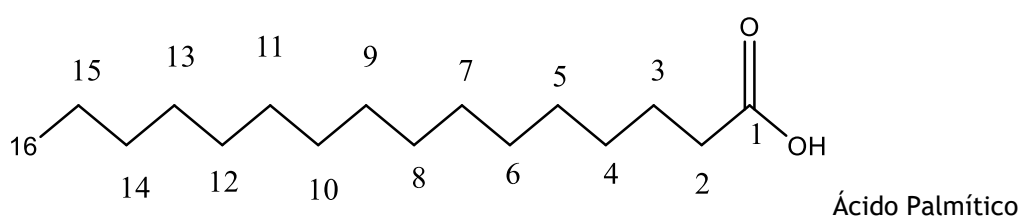
Os carotenoides que apresentam apenas carbono e hidrogênio na molécula são chamados de carotenos, e são sintetizados a partir de derivados do isopreno (cinco carbonos), apresentando um número variável de ligações duplas conjugadas. É o composto que confere o tom amarelo-alaranjado à cenoura. Já as xantofilas, para além de carbono e hidrogênio, contêm grupos com oxigênio, hidroxilo, cetonas, etc. São elas que conferem a coloração que vai do amarelo ao marrom-avermelhado. Exemplo: luteína, mixol e zeaxantina.

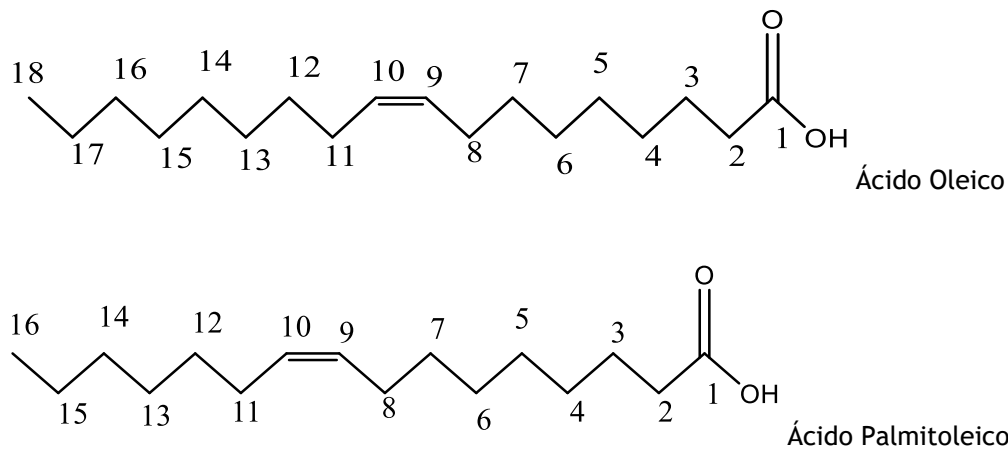
Os carotenoides são a segunda classe de pigmentos mais importante no processo de fotossíntese, a seguir à clorofila. São os responsáveis pela coloração da laranja, do maracujá, da abóbora, do tomate, por exemplo. E ainda estão presentes na coloração de alguns animais, como caranguejos, camarão, flamingos e guarás que o adquirem através da alimentação. Na fotossíntese absorvem luz e protegem a clorofila contra a oxidação por excesso de luz.

As funções dos carotenoides no organismo humano não estão completamente determinadas, mas sabemos que desempenham um papel importantíssimo. Estudos recentes têm mostrado a importância dessas substâncias como antioxidantes, na prevenção de doenças mediadas por radicais livres, contra o cancro e ainda podem atuar como reguladores do sistema imunológico.

### 1.3.2 Ácidos gordos polinsaturados.

Os ácidos gordos polinsaturados conhecidos com PUFAs desempenham uma função fundamental no que toca ao metabolismo celular, bem como ao transporte de eletrões (Karina. HM et al, 2007). Os ácidos gordos fazem parte da dieta humana, apresentando efeitos terapêuticos positivos, para além de desempenharem um papel fundamental na indústria de alimentos. Os ácidos gordos extraídos das microalgas podem ser utilizados como alimentos, fármacos ou transformados em biocombustível. A figura 1.2 ilustra a estrutura de alguns ácidos gordos.





*Figura: 1.3- Estrutura de alguns ácidos gordos.*

Os suplementos derivados de algas com ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa (LC) do tipo omega-3 (n-3) (LCn-3PUFA) podem aumentar significativamente o nível desses ácidos em produtos de origem animal. A deposição de LCn-3PUFA, especificamente o ácido eicosapentaenóico (EPA, 20: 5n-3) e o ácido docosa-hexaenóico (DHA, 22: 6n-3), em músculo e leite aumentou quando as ovelhas foram alimentadas com algas marinhas (BOHUSTSKYI, BAUWER et al, 2016). Por outro lado, há indicações de que a nutrição com materiais com elevados teores de ómega-3 PUFA entre a concepção e o desmame pode alterar o metabolismo da gordura e a acumulação de LCn-3PUFA no novo ser vivo. Um efeito deste tipo foi observado em cordeiros quando a progenitora foi alimentada com algas. Isso levanta a questão de saber se a expressão génica foi alterada pela interação nutricional, mas os resultados até à data são inconclusivos (KUMORE, BHAVANATH et al, 2013).

#### 1.4 Métodos de lise celular e extração de compostos activos

Uma das funções da parede celular é proteger as células contra danos físicos, mecânicos ou químicos; a parede celular típica aparece nas espécies eucariotas, sendo uma estrutura rígida que envolve o protoplasto (KWIETNIEWSKA et al.; 2012; SALAM VELASQUEZ-ORTA; HARVEY et al, 2016). Devido à espessura e composição química e estrutural da parede celular, bem como às suas funções metabólicas, as microalgas retêm os lipídios no seu interior. Assim, é necessário usar métodos para a sua libertação e extração. Para a realização da rotura celular existem diversos métodos: mecânicos, físicos, químicos e enzimáticos. Para além da tradicional prensa mecânica (“French cell press”), existem os ultrassonificadores e homogeneizadores de vários tipos, ciclos de congelamento/descongelamento, produtos químicos, bem como enzimas específicas (ROCHA FD et al 2014). Para além da lise celular, é naturalmente necessário proceder ao processo de extração do/s componente/s desejados, podendo usar-se os solventes convencionais ou, mais recentemente, fluidos em estado supercrítico, nomeadamente o CO<sub>2</sub>, eventualmente com outro co-solvente (ROCHA FD et al 2014). A extração do/s componente/s desejados com solvente/s é o método mais comum

devido às suas vantagens económicas e técnicas; a escolha do/s solvente/s obedece a critérios de solubilidade e seletividade face ao/s produto/s a extrair, no presente trabalho os lípidos.

As pesquisas na extração de lípidos de biomassa com solvente incluem o uso de diferentes solventes e métodos melhorados aplicados a diferentes estirpes de microalgas, analisando-se os rendimentos lipídicos face às condições de extração aplicadas.

De entre os processos testados, têm-se os solventes orgânicos e os líquidos iónicos, precedidos por tratamento diversos. Os métodos de extração de lípidos baseados em solventes orgânicos são em geral considerados de baixo custo, exigem investimentos de capital modestos e são fáceis de ampliar (GEIGER et al, 2016). Os diferentes processos de extração existentes visam romper a parede celular, para a posterior extração propriamente dita dos lípidos. Embora a combinação de solventes polares e não-polares, como metanol e clorofórmio são recomendados para uma maior eficiência de extração de lípidos da biomassa de algas, deve notar-se que tais misturas (especialmente clorofórmio / metanol) geralmente extraem lípidos polares (presumivelmente de membranas) e lípidos neutros (a partir de gotículas lipídicas, altamente desejáveis para matéria-prima para a produção de fármacos) (ZHANG et al,2011)

Assim, o sistema de solvente deve ser selecionado e otimizado tendo em consideração os processos subsequentes e o fim a que se destina o produto. (KUMARI, MANTRI et al 2013) evidenciaram o efeito significativo da hidrólise da parede celular pelo  $H_2SO_4$ , mesmo na ausência de qualquer solvente polar, como o metanol. Também deve ser enfatizado que este processo de ácido sulfúrico pode ser aplicado diretamente na biomassa molhada, embora os materiais de construção devam ser os adequados. A extração lipídica com fluidos em estado supercrítico requer equipamento dispendioso. Num ensaio típico com hexano, foram adicionados 5 g de algas no reservatório seguido de introdução de 100 ml de hexano. O sistema foi purgado para remover o ar e evitar o risco de explosão. A mistura foi aquecida até à temperatura desejada de 235 °C. A pressão de vapor é de aproximadamente 34 bar a esta temperatura (NGUYEN, et al, 2016).

# Capítulo 2

## 2.1 Objectivo do trabalho

O objectivo central deste trabalho é avaliar o desempenho da extração precedida/conjugada por vários processos de desintegração celular, nomeadamente tratamento ácido, homogeneizador mecânico e alta pressão, com vista a obter os lípidos das microalgas. Para além da quantificação global dos diferentes extratos, fez-se a identificação de extratos mais significativos.

## 2.2 Organização do documento

O documento tem um capítulo introdutório onde se apresenta uma breve revisão das matérias objecto do trabalho experimental; no capítulo 3 apresentam-se as metodologias experimentais seguidas; no capítulo 4 apresentam-se os resultados e faz-se a sua exploração e no capítulo 5 apresentam-se as conclusões.

# Capítulo 3

## 3 Materiais e métodos

### 3.1 Reagentes e solventes

Foi utilizada água destilada, produzida por um sistema RIOs™ 3 (milipore, Estados Unidos). O CO<sub>2</sub> foi fornecido engarrafado pela empresa Praxair (Porto, Portugal). O metanol e a acetona foram fornecidas pela LabChem (Zelienople, Pensilvânia, E.U.A). O n-hexano foi fornecido pela empresa Scharlau (Barcelona, Espanha). O clorofórmio foi fornecido pela empresa Pronalab (Lisboa, Portugal).

Tabela 3.1 - Constante dielétrica, índice de polaridade e massa volúmica de diferentes solventes usados na extração.

SOLVENTES	CONSTANTE DIELÉTRICA	ÍNDICE POLARIDADE	DE MASSA VOLÚMICA (kg/l)
CLOROFÓRMIO	4.18	4.1	1,489
HEXANO	1.88	0,1	0,660
ÉTER DE PETRÓLEO	2.1	0,1	0,71
ACETATO DE ETILO	6.02	4.4	0,897
METANOL	33	5.1	0,792
ÁGUA	78.5	0.79	0,998

### 3.2 Microalgas

Para o presente trabalho foi utilizada a microalga *Chlorella vulgaris*, que foi adquirida à empresa Aqualgae S.A. (Viana do Castelo, Portugal). Esta microalga foi mantida em stock e produzida para o isolamento dos lípidos. O meio utilizado para o crescimento das microalgas foi o meio GoldMedium Fresh-Water Species (GM-FWS), preparado a partir dos nutrientes fornecidos pela empresa Aqualgae (Viana do Castelo, Portugal).

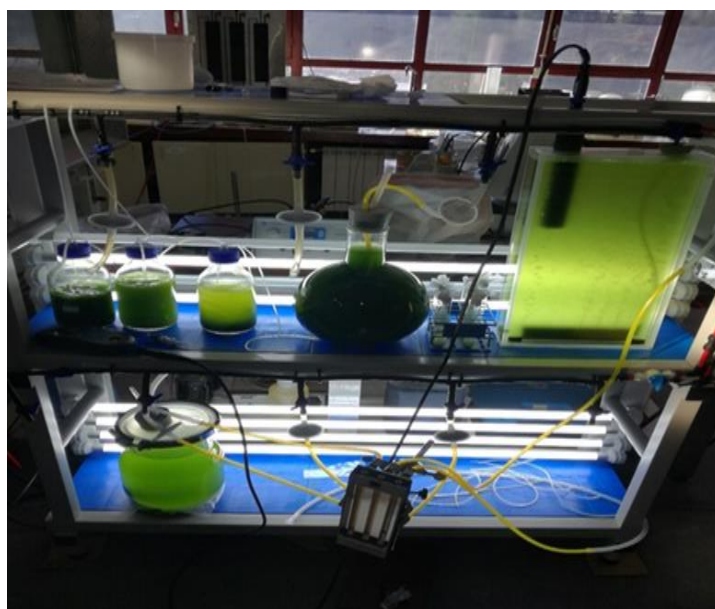
Tabela 3.2 Soluções stock de nutrientes.

NUTRIENTE	CONCENTRAÇÃO (mg/l)	SOLUÇÃO
N NA FORMA DE NaNO <sub>3</sub>	7000	1
P NA FORMA DE KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2046	1
Mg NA FORMA DE MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1480	2
CaCl <sub>2</sub>	1360	3
OLIGÓMEROS E VITAMINAS	1450	4

### 3.3 Métodos

#### 3.3.1 Produção de biomassa alga

As microalgas foram cultivadas em reatores de 1L, de 5L e de 6L numa estante de cultura de microalgas fornecida pela empresa Aqualgae (Viana do Castelo, Portugal). A estante está apetrechada com um compressor de ar, marca Hailea (Guangdong, China), modelo v-60, para abastecimento de ar e com um sistema para controlo dos ciclos de luz e escuro e controlo dos caudais de dióxido de carbono. A estante é constituída por seis (6) lâmpadas fluorescentes de 40 W, podendo ainda ser adicionada uma placa do modelo PL-600\*600-CW de 40W da Lowcled (Shenzhen, China). O pH inicial das culturas foi da ordem dos 6,5–7,5, sendo mantido abaixo do pH 7,5 recorrendo a soluções  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1M e NaOH 2M. A figura 3.1 representa uma imagem da montagem experimental.



*Figura: 3.1- Fermentadores diversos com as culturas de microalgas*

A produção da biomassa foi realizada em diferentes tipos de fotobiorreatores com o objectivo de apreciar o efeito da geometria do reator sobre o crescimento. Para este efeito não podem faltar nutrientes, incluindo o  $\text{CO}_2$ , que foi adicionado em pulsos de 6 segundos cada 120 segundos, durante o ciclo diurno. O ar é abastecido por um compressor, sendo inserido nos reatores através de dispersores, após filtragem em filtros de nylon de porosidade  $0,45 \mu\text{m}$ ; o caudal de ar proporciona também a agitação necessária a cultura. A luminosidade foi assegurada através de lâmpadas fluorescentes de 40W, colocadas numa das laterais da estante, fornecendo cada uma 1600 lúmen, o que corresponde a 16985 lux (tendo em conta os  $0,0942 \text{ m}^2$  de área exterior); tendo em conta o factor de conversão de 0.013 obtido na literatura (SYLVANIA et al.; 2017), teremos uma intensidade da ordem dos  $220 \mu\text{mol fotões}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ . O pH foi conservado a 7.5 com recurso a  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5M.

### 3.3.2 Produção de biomassa algas em reator cilíndrico de 1L

Trata-se de frascos cilíndricos de 1l com injeção de ar. A geometria do vaso proporciona uma área/volume de  $452 \text{ cm}^2/\text{L}$ . Considerando que só havia luz de um lado, a área efetiva é de  $226 \text{ cm}^2/\text{L}$ . O Caudal de ar foi de cerca de  $0.5 \text{ L ar/ (L meio.min)}$ , neste caso sem adição suplementar de dióxido e carbono.



*Figura: 3.2- Fotobiorreator cilíndrico de 1 L*

### 3.3.3 Produção de biomassa algas em reator cilíndrico de 5L

Trata-se de reator cilíndrico de 4l de capacidade nominal, com 18cm de calibre e um volume máximo de 5l, proporcionado uma área/volume de  $222,8 \text{ cm}^2/\text{L}$ . Se o reator for iluminado apenas de um dos lados, a área/volume passa para  $111,4 \text{ cm}^2/\text{L}$ . A concentração inicial de biomassa usada nos ensaios foi à volta de  $0,2 \text{ g/l}$ , dependendo do ensaio. O caudal de ar foi cerca de  $0,308 \text{ L ar/ (L meio.min)}$ , introduzido através de um dispersor cerâmico cilíndrico com 10 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro. O  $\text{CO}_2$  foi abastecido cada 10 minutos durante 7 segundos com um caudal de  $0.4\text{L/min}$  ( $0,28\text{L/h}$ ). O fotobiorreator encontra-se na figura 3.3.



*Figura 3.3- Fotobiorreator cilíndrico de 5L*

### 3.3.4 Produção de biomassa algas em reator de flat-plate descontínuo

O fotobiorreator “flat-plate” de 6 litros, com volume útil de 5 L, foi produzido por nós, usando vidro e uma estrutura em acrílico. As dimensões internas são as seguintes: 28,6 cm de comprimento, 50 cm de altura e 5,5 cm de espessura. Em síntese, trata-se de um vaso paralelepípedo com 7,5 cm de espessura, proporcionando uma área/volume de 350 cm<sup>2</sup>/L. O ar e o CO<sub>2</sub> é alimentado ao fundo do fotobiorreator através de um dispersor modelo EW-700025-28 da marca Cole-Parmer (Vernon Hills, Illinois, Estados Unidos); o caudal de ar assegura também a mistura da biomassa. O ar foi fornecido ao caudal de 0,308 L ar/ (L meio.min); o CO<sub>2</sub> foi de cerca de 0.4l/min durante 7 segundos a cada 10 minutos. A concentração inicial da biomassa foi de 0,2 g/L sensivelmente. O fotobiorreator encontra-se na figura 3.4



*Figura: 3.4- Fotobiorreator “flat-plate”*

### 3.3.5 Manutenção e controlo do processo.

De modo a monitorizar o crescimento da biomassa nos vários tipos de reatores foram usados três procedimentos distintos. O primeiro procedimento assenta na leitura da densidade ótica da suspensão, após a diluição apropriada, usando um espectrofotómetro modelo Helios Omega (Thermo scientific, Inglaterra), medindo a absorvência no comprimento de onda de 685 nm. Esta leitura fez-se diariamente. O segundo procedimento para avaliação do crescimento foi a contagem de número das microalgas por mililitro, usando a câmara de Neubauer, após as diluições necessárias; as contagens, realizadas em microscópio ótico, normalmente de 2 em 2 dias, foram convertidas nos valores reais empregando a fórmula apropriada. O terceiro procedimento de avaliação do crescimento foi através da quantificação da massa seca existente num determinado volume de suspensão. Normalmente, 100 ml de suspensão são sujeitos à centrifugação, a 4500 rpm, numa centrífuga de marca Kn-70 da

Kubota (Osaka, Japão), durante 30 minutos; após descartar o sobrenadante e adicionar água destilada ao “pellet”, repete-se o processo de centrifugação durante 15 minutos, recuperando-se o “pellet” que vai ser seco em estufa a 100°C até peso constante. Com base na massa seca e no volume inicial, determina-se a concentração de biomassa no reator. A temperatura, o pH, o oxigênio dissolvido e a condutividade foram monitorizadas em alguns períodos através do sensor Aquaprobe AP2000 (Aquaread, Inglaterra).

A concentração da biomassa alga ao longo do tempo foi determinada por espectrofotometria, usando uma correlação previamente estabelecida entre a absorvância da suspensão de biomassa e o teor de biomassa determinado por pesagem após centrifugação. A figura seguinte apresenta essa correlação.

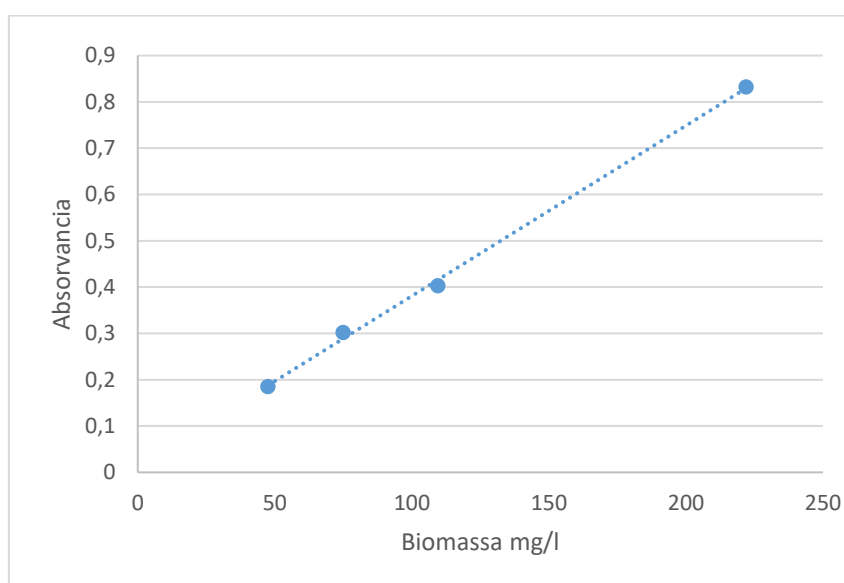


Figura: 3.5- Reta de calibração entre absorvância e concentração de biomassa.

A equação seguinte permite estimar a concentração de biomassa alga, através da medição da absorvância a 685 nm das suspensões convenientemente diluídas.

$$[Biomassa] = 0,0037 * ABS + 0,0131 \quad R^2 = 0,9985$$

### 3.4 Desintegração celular e extração de lípidos

O procedimento selecionado visa a maximização da extração/recuperação de lípidos da biomassa alga. No que respeita aos solventes de extração, seguiu-se no essencial o procedimento de Bligh e Folch (EL-SHEEK, HMOUDA et al, 2016), tendo-se variado os pré-tratamentos a que as amostras foram sujeitas. Pesou-se cerca de 2 g da biomassa húmida, equivalentes a 200 mg de biomassa seca, à qual se acrescentou 20 ml de água destilada. Nesta fase as amostras foram submetidas a diferentes pré-tratamentos. Numa primeira fase testaram-se vários métodos, conforme descrito na tabela 3.3. Com base nos resultados

obtidos nesta fase preliminar selecionaram-se os seguintes métodos (figura 3.6): (i) hidrólise ácida (pH ajustado a 2, com ácido sulfúrico 2M; temperatura 120°C, durante 1 hora); (ii) homogeneizador mecânico (10 000 rpm, 1 minuto); (iii) homogeneizador mecânico (24 000 rpm, 5 minutos); (iv) alta pressão (68 atmosferas).

Tabela 3.3. Métodos de desintegração celular usados na fase preliminar do trabalho.

Método	legenda
MS	moagem (Hz, 5 min, esferas de 8 mm) do material seco
HM 1min	homogeneizador mecânico 10000 rpm 1 min
M+E	moagem → enzima
P+E	pressão → enzima
HM 24000 Rpm	homogeneizador mecânico 24000rpm
HA	hidrólise ácida
P+U	pressão → ultrassons
P branco	Pressão (68 atm)
MC	moagem criogénica
MC+U	moagem criogénico → ultrassons
HM 5min	homogeneizador mecânico 10000 rpm 5 min
HA2	hidrólise ácida

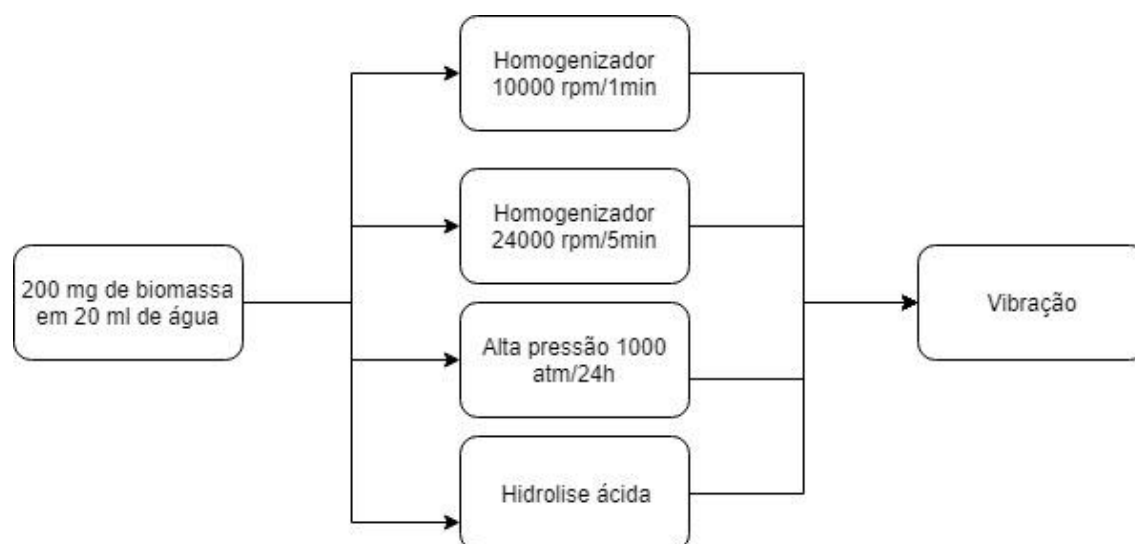


Figura: 3.6- Pré-tratamentos da biomassa.

Após o pré-tratamento, seguiu-se o processo de extração propriamente dito, que consistiu no seguinte: à amostra de 20 ml de suspensão pré-traçada, adicionou-se 40 ml de mistura de clorofórmio e metanol (20 ml de cada) que se levou ao sistema de agitação/vibração

(agitação mecânica com esferas de vidro ( 20 esferas de diâmetro 2 mm, escala de vibração 4 (VibroMatic-384)) durante 1 hora; deixou-se sedimentar a amostra durante três horas e recolheu-se a fase inferior, que conterà essencialmente clorofórmio (muito mais denso que a água e o metanol). A biomassa ficou a maiores partes das vezes no clorofórmio (mas nalguns casos ficou na fase aquosa metabólica). Retirou-se a fase que não continha a biomassa (usualmente a fase metabólica/água). À fase contendo a biomassa, adiciona-se de novo 40 ml de mistura clorofórmio e metanol (20 ml de cada); segue-se a agitação (1h) e decantação (3h). Recolhe-se a fase sem biomassa (fase metanólica/água), que se junta à recolhida na fase anterior, e repete-se o procedimento uma terceira vez. A figura 3.8 ilustra o processo de decantação. No final tem-se a fase do clorofórmio (que teria um volume de 60 ml se as separações fossem completas) e uma fase metanol/água que teria um total de 80 ml (60 de metanol e 20 de água). De facto, não é assim, porque o metanol é parcialmente solúvel no clorofórmio. Posteriormente, a fase do clorofórmio foi sujeita a uma extração com n-hexano (3 x 20 ml). Verificando-se resíduos de biomassa em suspensão em alguns extratos, estes foram submetidos a filtração/centrifugação para remoção dessa biomassa. Em resumo, resultaram-se 3 extratos: n-hexano, clorofórmio e metanol (com alguma água), conforme se ilustra na figura 3.9. Os extratos secos foram obtidos após evaporação em sistema de vácuo (figura 3.7). Posteriormente, os extratos foram colocados na estufa a 70°C durante a noite, com vista a remover algum solvente residual.



*Figura: 3.7- Evaporador rotativo.*

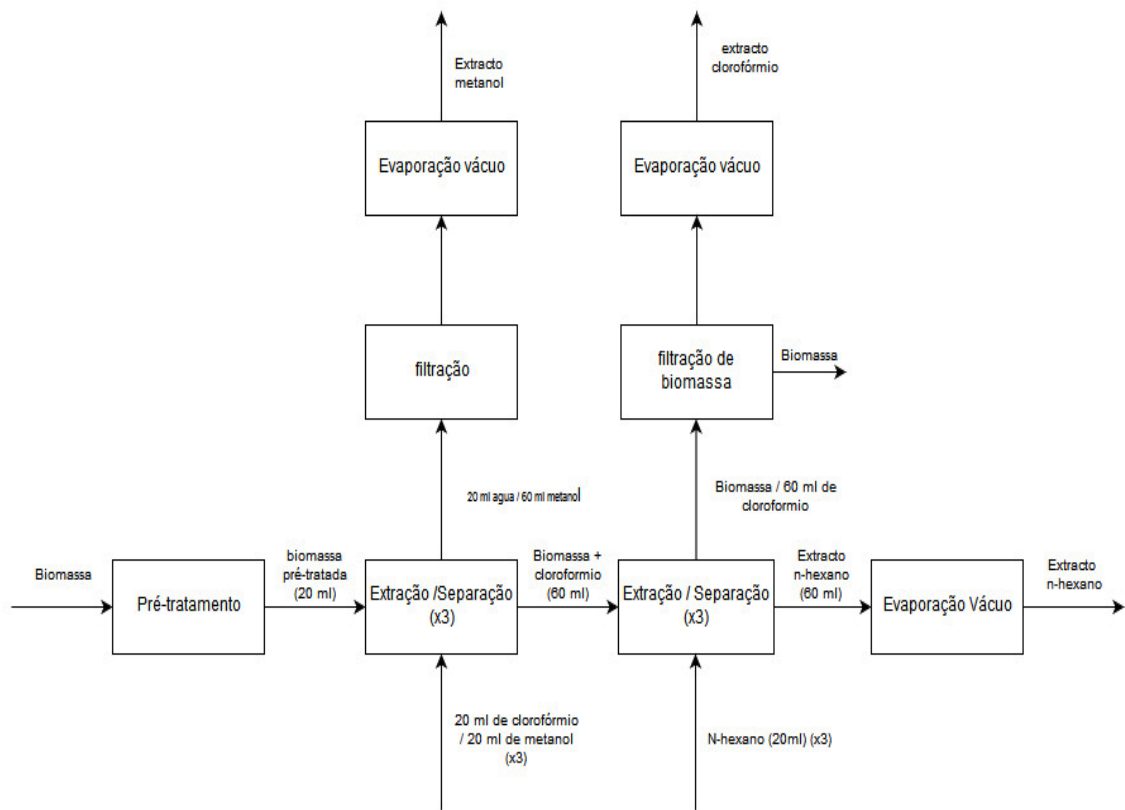


Figura: 3.8- Esquema do processo de extração.

Os lípidos têm três características muito importantes: contêm extensas regiões formadas quase exclusivamente por hidrogênio e carbono com ligações C-C ou C-H não-polares. São insolúveis em água, mas são solúveis em solventes orgânicos, como éter, clorofórmio e benzeno. Os ácidos gordos, que são a unidade fundamental dos lípidos, são moléculas formadas por uma longa cadeia de hidrocarbonetos de tipo linear e com um número par de átomos de carbono.



Figura: 3.9 - Balão de decantação, ilustrando a separação de fases (Fonte autoria própria)

### 3.4.4 Identificação e quantificação de compostos

Com vista a identificar e quantificar os compostos dos extratos, utilizaram-se várias técnicas analíticas, nomeadamente, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS), cromatografia gasosa (GC-MS) e RMN.

A cromatografia líquida conectada a um sistema de espectrometria de massa (LC-MS) é da marca Thermo Fischer Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA). O sistema é constituído por quatro componentes: uma bomba Acella 600, um autosampler Acella, um detetor PDA Acella e um espectrofotómetro de massa LCQ Fleet (Figura 3.10).

A coluna usada para a separação foi do tipo C18, da marca Thermo Fischer Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA), modelo HyperSil Gold com tamanho de partícula 5  $\mu\text{m}$  e dimensões 150 mm x 4,6 mm. As amostras foram diluídas em metanol 1:10 e filtradas com recurso a filtro de 0,25  $\mu\text{m}$  de nylon antes de se proceder à análise em LC-MS.

A cromatografia foi realizada em modo de gradiente, fazendo variar no tempo a composição do eluente.



*Figura: 3.10 - Equipamento LC-MS/LC-GS*

A cromatografia foi realizada em modo de gradiente, fazendo variar no tempo a composição do eluente (Ver tabela 3.4). A fase móvel foi composta pelos seguintes solventes: A contendo 0.5M de acetato de amónio em metanol e água nas proporções 85:15 v/v, o solvente B contendo acetonitrilo e água nas proporções 90:10 v/v e solvente C contendo acetato de amónio. O fluxo foi de 300  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

Tabela 3.4 Composição temporal do eluente

TEMPO (MINUTOS)	A%	B%	C%
0	30	60	0
5	50	0	0
25	90	0	40
70	50	0	0
80	30	0	0
90	30	0	0
100	50	0	50
105	30	60	70
110	30	60	70

Os comprimentos de onda selecionados para a análise foram os seguintes; 400 nm para o lípidos e 555 nm para a clorofila A. Com o objectivo de quantificar alguns lípidos, construiu-se uma reta de calibração usando o ácido linoleico como padrão (Figura 3.11).

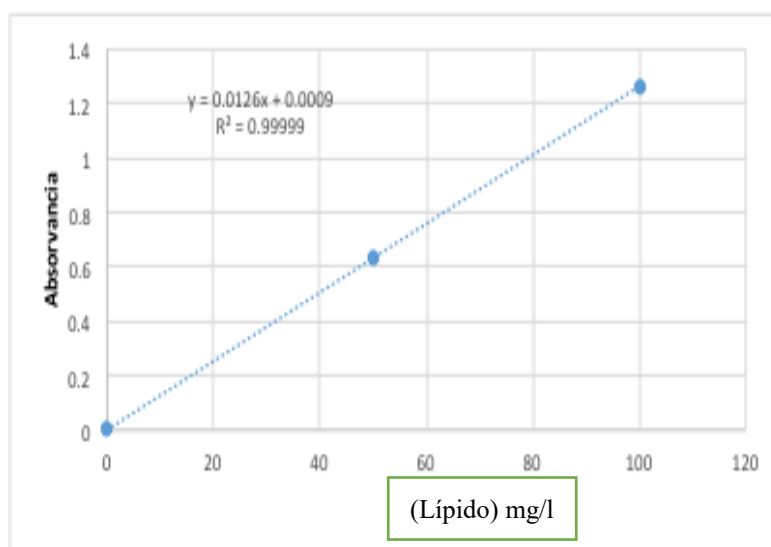


Figura: 3.11 - Absorvância vs concentração de ácido linoleico.

No que respeita à cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), para conferir volatilidade aos compostos, estes foram sujeitos a reação de esterificação. Para a análise dos ácidos gordos, uma alíquota do extrato de lípidos, contendo aproximadamente 0,1 g de lípidos, foi seca em rota-evaporador e saponificada. Os ácidos gordos foram metilados pelo método de METCALFE, SCHMITZ usando o diazometano como agente esterificante. A reação ficou toda a noite à temperatura ambiente; passado este tempo, verificasse a finalização da reação por adição de uma nova quantidade de solução de diazometano. A cromatografia gasosa, para análise de ácidos gordos, foi realizada em

cromatógrafo VARIAN, modelo 3300, equipado com: detector por ionização em chama; injetor split, razão de 100:1; coluna capilar de sílica fundida, 30 m de comprimento x 0,30 mm de diâmetro interno e contendo 0,25 µm de polietileno glicol (DB-WAX da J & W Scientific, Califórnia, USA); e integrador processador INTRALAB 4290. As condições cromatográficas foram: temperatura da coluna, 150°C por 11 min, programada a 210°C numa razão de 3°C/min; gás de arraste, hidrogénio ao caudal de 1,26 ml/min com velocidade linear de 39,4 cm/s; gás "make-up", nitrogénio a 30 ml/min; temperatura do injetor; 250°C; e temperatura do detector, 280°C. A identificação dos ácidos gordos foi realizada pelo uso em conjunto dos seguintes parâmetros: comparação do tempo de retenção corrigido de ésteres metílicos dos ácidos gordos das amostras e padrões; co-cromatografia de padrões e amostras; e comprimento equivalente da cadeia.

Os lípidos recuperados e eventualmente outros compostos, após esterificação, foram quantificados e analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), bem como cromatografia em camada fina.

# Capítulo 4

## Resultados e discussão

### 4.1 Crescimento da biomassa

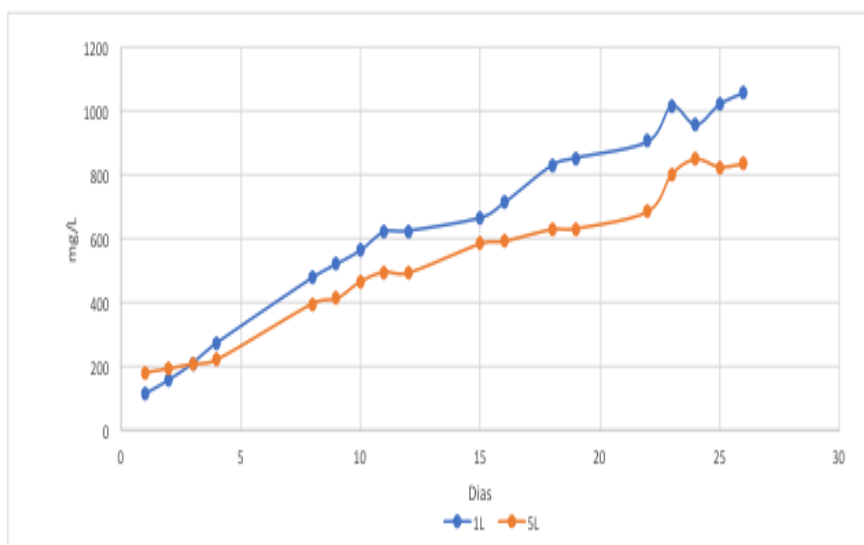
Analisou-se o crescimento da biomassa alga em reatores da mesma geometria, mas diferentes áreas específicas de iluminação, e reatores de geometrias diferentes e volumes da mesma ordem de grandeza.

#### 4.1.1 Reactores com volumes diferentes e a mesma geometria

O cultivo de microalgas apresenta algumas vantagens como sejam a facilidade de acesso aos nutrientes necessários, a duplicação da biomassa em num curto período de tempo e a possibilidade de manipular as condições de cultura, de modo a aumentar a produção de um metabolito específico, como podem ser os ácidos gordos.

Diversos fatores podem influenciar a produção de lípidos e em particular de ácidos gordos pelas microalgas, tais como a intensidade luminosa, a temperatura e os nutrientes. A biomassa da microalga comparada com outras fontes de ácidos gordos apresenta como vantagem a ausência de contaminação e certas microalgas possuem maior espectro de ácidos gordos poli-insaturados (PUFA).

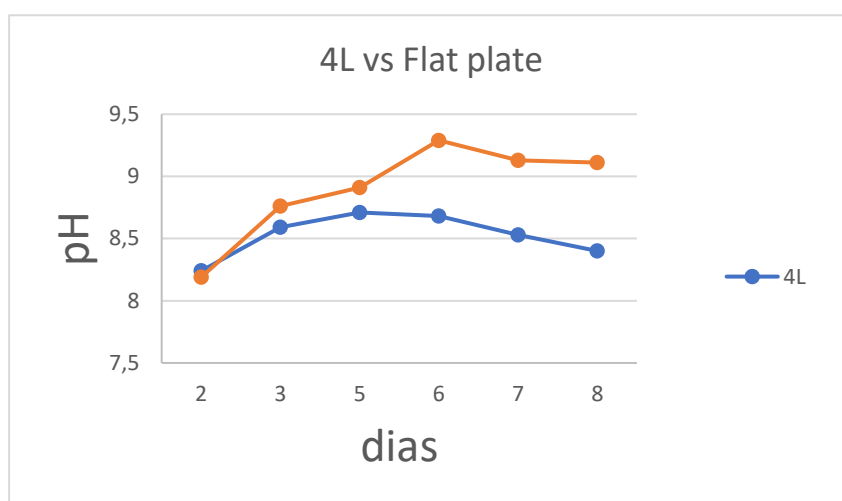
A figura seguinte (Figura 4.1) ilustra o crescimento de biomassa alga, medida através da absorvância, para reactores com a mesma geometria cilíndrica, mas diferentes volumes o que propicia diferentes áreas de captação de luz por unidade de volume.



**Figura: 4.1** - Concentração de biomassa de algas produzida ao longo do tempo na 1ª série de crescimento em reatores cilíndricos de 1 L e 5 L.

Pese embora alguma flutuação nos valores de densidade ótica medida (convertida em concentração de biomassa através da equação na parte experimental deste trabalho), verifica-se um crescimento linear da biomassa alga ao longo do tempo. Não ocorrendo crescimento exponencial, tudo indica que haverá um factor limitante do crescimento que poderá ser um nutriente ou a luz. Tendo em conta que N, P, Mg, Ca e micronutrientes e vitaminas estão em razoável excesso, a limitação mais plausível será o carbono ou a luz. Tendo em conta que estes ensaios foram feitos apenas com introdução de ar (i.e., sem introdução de CO<sub>2</sub> de garrafa), é muito provável que o nutriente limitante seja o carbono. Entre os dois reatores (1L e 5 L), o de 5 L apresenta, em geral, menor produção devido à menor intensidade luminosa que consegue captar (área por unidade de volume). Partindo de uma concentração inicial inferior a 200 mg/L, obtiveram-se concentrações entre os 800 e 1000 mg/L, ao cabo de 25 dias, o que corresponde a crescimento médio de 24 mg/(L.dia) e 34 mg/(L.dia) respetivamente para o reator de 5 L e 1 L. Estes resultados evidenciam a importância da radiação luminosa recebida por cada um dos reatores; com áreas específicas de 111.4 cm<sup>2</sup>/L e 226 cm<sup>2</sup>/L, respectivamente.

Nestes ensaios foi-se monitorando diariamente o pH (que consta da figura 4.2) e ajustado diariamente para pH 7.5. O aumento do pH de 7.5 (valor ajustado) para o valor medido no dia seguinte (na figura 4.2) é um bom indicador do crescimento da biomassa alga.



*Figura: 4.2- pH do meio de cultura medido ao longo do tempo, todas as manhãs, antes de ajuste a pH 7.5 (da primeira série de ensaios).*

#### 4.1.2 Reactores com geometrias diferentes

A figura 4.3 ilustra a evolução da concentração de biomassa ao longo do tempo em reatores de geometrias completamente diferentes: cilíndrica e “flat-plate”, que proporcionam áreas de iluminação por unidade de volume bastante diferentes (222 vs 350 cm<sup>2</sup>/L). Nesta série de ensaios já se adicionou CO<sub>2</sub> de garrafa.

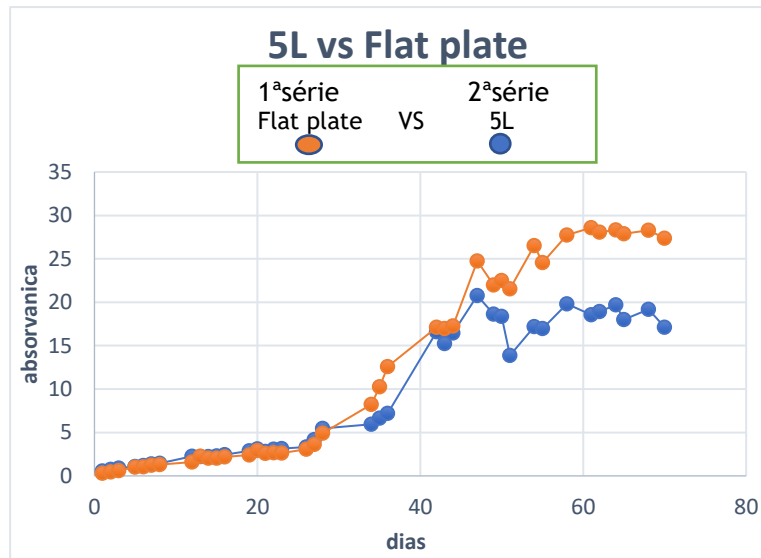


Figura: 4.3- flat-plate série 1 vs reator de 5l série 2

Observa-se um crescimento relativamente lento durante os primeiros 20 dias e depois um crescimento exponencial; este seria o comportamento esperado para um sistema descontínuo, mas a fase inicial de adaptação parece demasiado prolongada. Por outro lado, em coerência com a área de iluminação proporcionada por cada um dos reatores, o reator “flat-plate” apresentou maior crescimento.

## 4.2 Rotura da biomassa e Extração

Fizeram-se duas séries de ensaios. Uns preliminares, com um número alargado de métodos de pré-tratamento, e uns pré-tratamentos mais reduzidos seleccionados a partir dos preliminares.

### 4.2.1 Ensaios de rotura

A tabela seguinte (Tabela 4.1) resume os resultados obtidos nos ensaios prévios de desconstrução da biomassa alga, tendo em conta o extrato recuperado face à massa (base o.d.) de biomassa alga usada no processo de extração. Os valores obtidos estão, em geral, dentro do esperado.

Tabela 4.1 - Métodos de desintegração celular usados na fase preliminar do trabalho.

Método	Legenda	Recuperação, %
MS	moagem do material seco	2
HM 1min	homogeneizador mecânico 10000 rpm 1 min	4
M+E	moagem → enzima	2
P+E	pressão → enzima	5
HM 24000 rpm	homogeneizador mecânico 24000 rpm, 1 min	6,5
H A	hidrólise ácida	10
P+U	pressão → ultrassons	5,5
P branco	Pressão (68 atm)	8,5
MC	moagem criogénica	3,5
MC+U	moagem criogénico → ultrassons	3,5
HM 5min	homogeneizador mecânico 10000 rpm 5 min	11,5
H A2	hidrólise ácida	11,5

Face aos resultados obtidos, verifica-se que a biomassa seca e submetida a moagem apresenta enorme dificuldade em ser extraída; dentro das extrações realizadas com biomassa húmida (tudo o resto), as extrações precedidas de hidrólise ácida, homogeneização mecânica e pré-tratamento a alta pressão são as mais promissoras. Com base nestes resultados, os estudos posteriores foram realizados com estes processos mais promissores.

As tabelas 4.2 e 4.3 registam os valores dos volumes de solventes usados e efetivamente recuperados nos processos de extração. Relativamente aos volumes recuperados face aos usados, verifica-se que existiram algumas perdas, que ficaram a dever-se à dificuldade do processo de filtração usado para remover os resíduos de biomassa existente nos extratos. De notar que a centrifugação nem sempre é adequada para remover os resíduos sólidos, já que estes apresentam menor densidade do que o clorofórmio. Este assunto carece que reflexão futura.

Por outro lado, verifica-se, de acordo com o expectável, que ocorre mistura de solvente; i.e. uma parte do metanol é miscível com o clorofórmio e parte do n-hexano é miscível com o clorofórmio.

Tabela 4.2 - Volumes de solventes aplicados no processo de extração.

	volume teórico (ml)			total
	metanol + Água	clorofórmio	n-hexano	
hidrolise acida	80	60	40	180
homogenizador 24000 rpm	80	60	40	180
homogenizador 10000 rpm	80	60	40	180
alta pressão 68 atm *	110	60	60	230

\* : foi adicionado 20 ml extra de n-hexano; devido à diluição foi adicionado cerca de 30 ml de água

Tabela 4.3 - Volumes de solventes efetivamente medidos após o processo de extração.

	volume real obtido (ml)			total
	metanol + água	clorofórmio	n-hexano	
hidrolise acida	60	80	20	160
homogenizador 24000 rpm	40	82	30	152
homogenizador 10000 rpm	79	80	20	179
alta pressão 68 atm	90	130	10	230

A figura 4.4 mostra as massas de extrato recuperado para os diferentes processos de extração e para os diferentes extratos (metanol/água; clorofórmio; n-hexano). Ao contrário do que aconteceu nos ensaios preliminares, os valores recuperados nos 3 extratos não fazem sentido já que se partiu de 200 mg de biomassa (base seca). Estes valores anormalmente elevados podem ter ficado a dever-se a residuais de solventes e/ou eventualmente a erros de pesagem. Apesar deste contratempo, avançou-se para a identificação dos compostos existentes nos diferentes extratos.

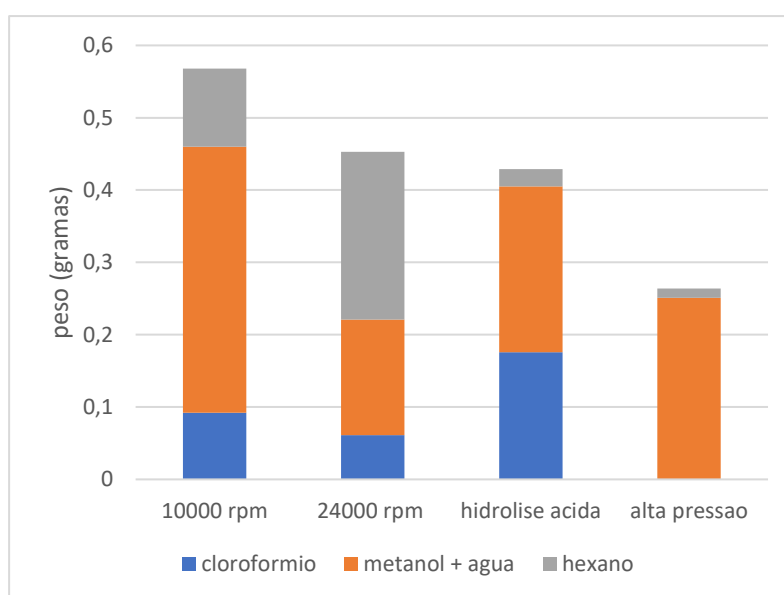


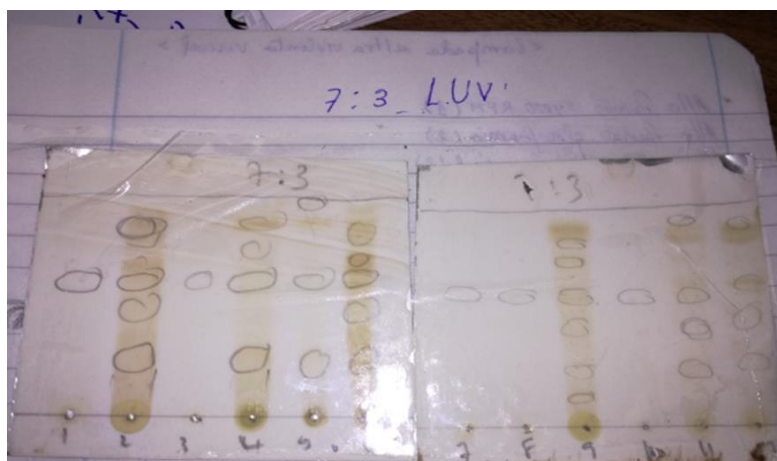
Figura: 4.4- Massa de extrato obtida, para diferentes condições de desconstrução celular.

#### 4.2.2 Identificação dos componentes dos extratos

Numa primeira fase, testou-se o potencial da cromatografia líquida (HPLC-MS) para tentar identificar e quantificar alguns componentes dos extratos metalónicos, mas o processo foi mal sucedido, devido à falta de sensibilidade do sistema de MS para identificar os compostos e à indisponibilidade de padrões.

Note-se que os extratos de clorofórmio e hexano, de natureza hidrofóbica, estavam destinados à derivatização e à análise por GC-MS. Na realidade também se fez a derivatização dos extractos de metanol.

De acordo com o previsto, os vários extratos acima referidos foram esterificados com diazometano e posteriormente analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. Previamente, analisou-se o seu comportamento em cromatografia em camada fina, conforme se ilustra na figura seguinte.



**Figura: 4.5-** Visualização da migração de compostos numa proporção de 7:3 lâmpada ultravioleta do hidrolisado da biomassa.

A figura 4.5 mostra os cromatogramas obtidos para o extracto de clorofórmio e metanol para o material resultante da hidrólise ácida da biomassa algas. Os resultados sugerem que as proporções relativas dos diferentes compostos nos dois extractos são diferentes, mas uma parte dos compostos parece ser comum. Ainda assim, uma análise adequada evidencia que há compostos no extracto de metanol que não estão no extracto de clorofórmio; porém as suas quantidades são baixas e não permitiram a sua identificação. A figura 4.6 ilustra o espectro de massa do pico dos 23min:55 segundos do extracto de clorofórmio.

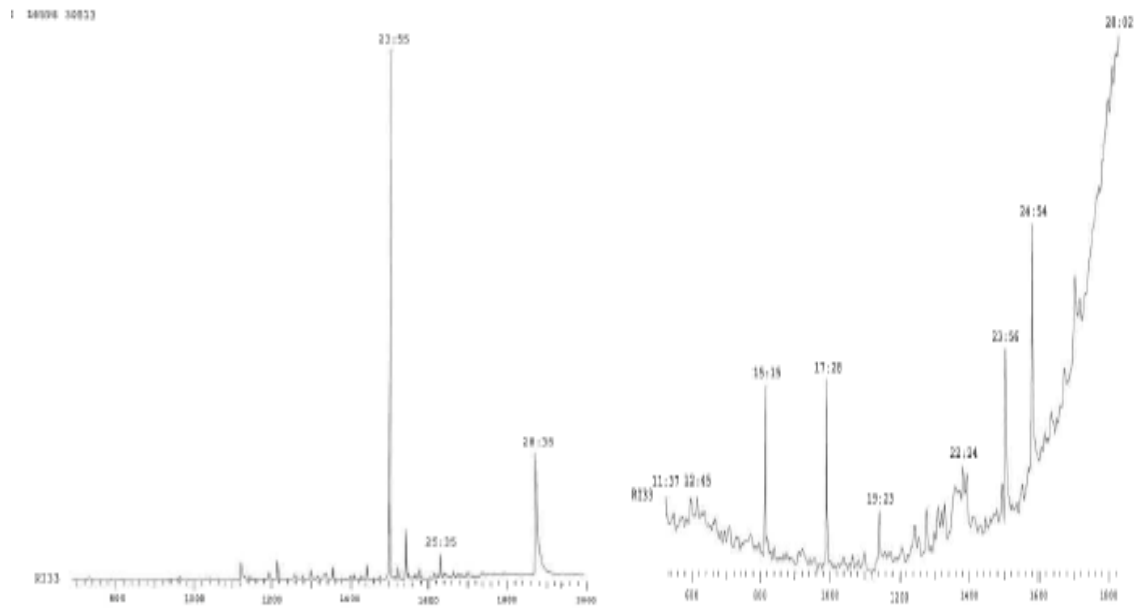


Figura 4.6- Cromatograma (GC) do extracto de clorofórmio (esquerda) e metanol (direita) da biomassa algas após a desconstrução celular com ácido sulfúrico.

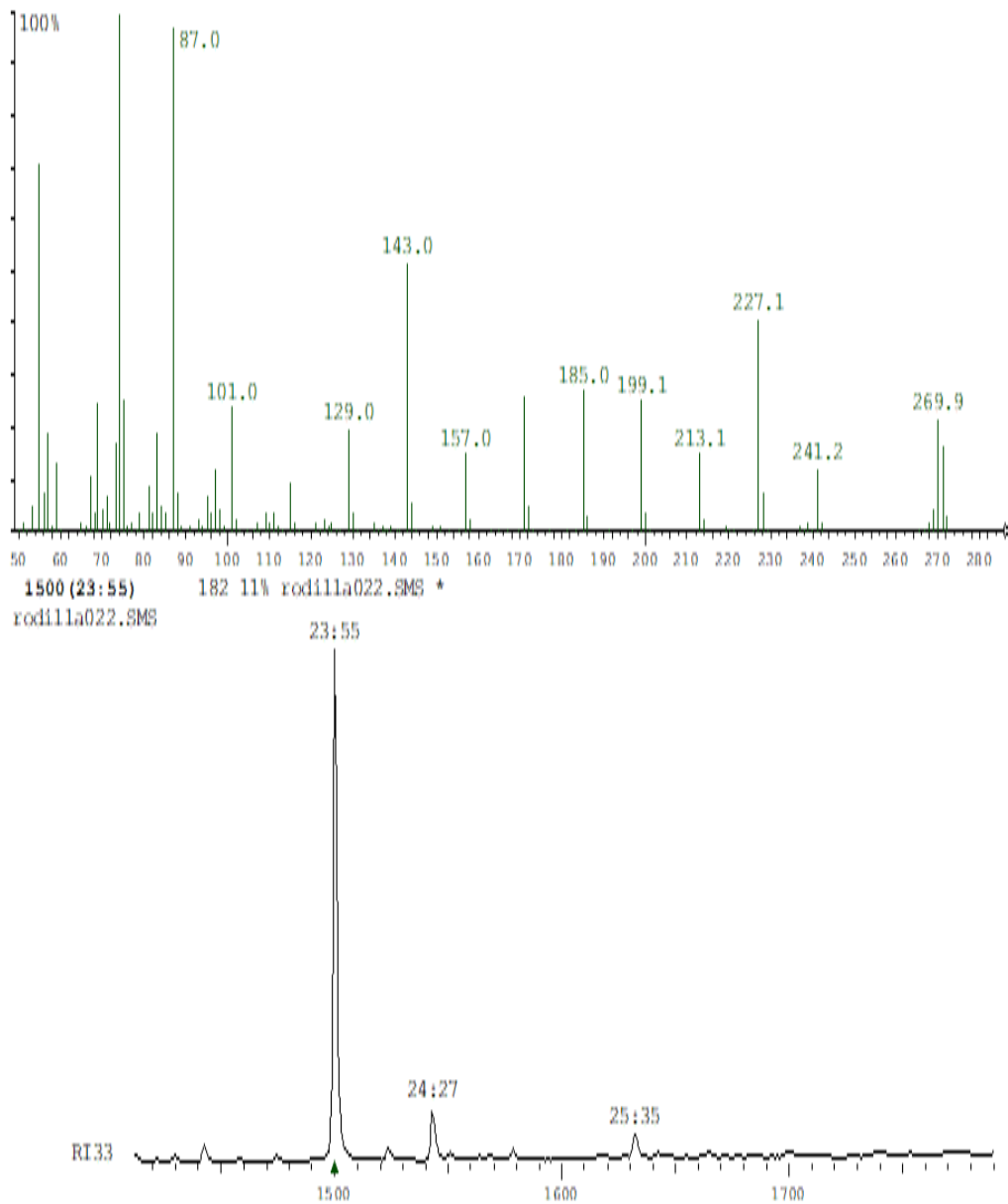


Figura 4.7 Espectro de massa do pico dos 23min:55 seg.

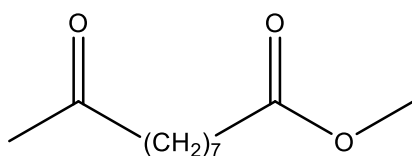
A tabela 4.4 resume alguns aspectos qualitativos dos cromatogramas. Confirma-se que muitos compostos estão distribuídos pelos diferentes solventes, o que não seria à primeira vista de esperar. Tal pode ocorrer pelo carácter anfipático (parte hidrofílica e parte hidrofóbica) das moléculas originais na biomassa. Assim, do ponto de vista das extracções sucessivas que se realizaram, no futuro deve eventualmente equacionar-se a possibilidade de hidrolisar a ligação entre estas duas partes antes das etapas de extracção. Do ponto de vista prático, não parece fazer sentido extracções sucessivas com diferentes solventes; a mistura de solventes parece mais apropriada.

Tabela 4.4 - Aspectos qualitativos dos cromatogramas.

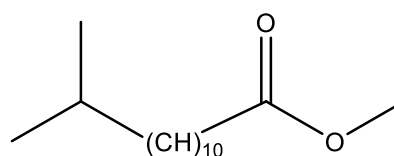
	Observações sobre o GC-MS dos extratos		
	metanol (M)	clorofórmio (C)	n-hexano (H)
hidrolise acida (HA)	vários picos significativos	vários picos significativos	sem picos significativos
homogenizador 24000 rpm (H)	picos semelhantes a outros	pouco material	picos semelhantes a AP-H
alta pressão 68 atm (AP)	picos semelhantes a AP-H	picos na gama 21-25 min	picos semelhantes ao HA-C

As análises realizadas por GC-MS dos diferentes extratos permitiram identificar os ésteres metílicos de ácidos carboxílicos presentes nos triacilgliceróis presentes nos extratos. Temos a destacar alguns compostos encontrados nos lípidos: 9-Oxodecanoato de metilo; nonanodioato de dimetilo; 12-Metiltridecanoato de metilo; hexadecanoato de metilo; Ftalato de butilo e isobutilo; heptadecanoato de metilo; octadecanoato de metilo; 14-metilhexadecanoato de metilo. Estes ácidos apresentam cadeias saturadas e insaturadas de nove até dezoito átomos de carbono. O ácido predominante nesta análise é o ácido hexadecanóico. Temos a destacar as suas estruturas (figura 4.8) de acordo com a nomenclatura acima mencionada.

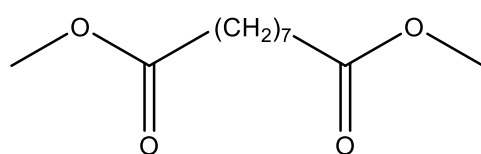
De realçar que não foi possível identificar ácidos gordos polinsaturados, o que pode ter ficado a dever-se a várias razões: o seu baixo teor, face aos saturados; oxidação no processo de extracção e análise; outros



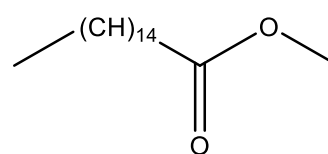
(9-Oxodecanoato de metilo)



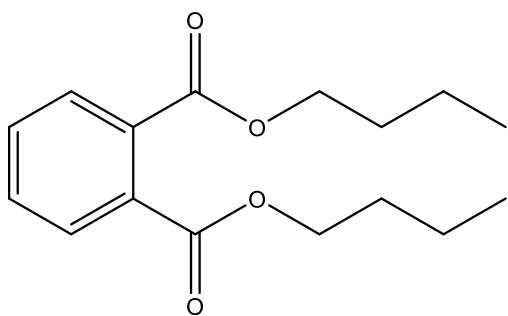
(12-Metiltridecanoato de metilo)



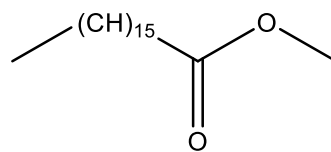
(Nonanodioato de dimetilo)



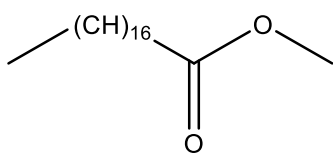
(Hexadecanoato de metilo)



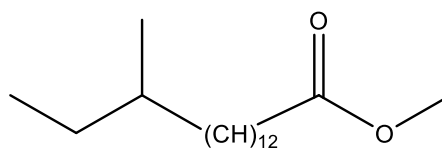
(Ftalato de butilo ou de isobutilo)



( Heptadecanoato de metilo)



(Octadecanoato de metilo)



(14-Metilhexadecanoato de metilo)

Figuras 4.8 estruturas destacadas de acordo com a nomenclatura acima mencionada.

As estruturas foram desenhadas no programa chemoffice 2015 por Cahilo Manuel Martins

# Capítulo 5

## Conclusões e perspectivas futuras

A biomassa algas tem potencial para que num futuro próximo possa constituir uma alternativa para a obtenção de produtos de valor acrescentado para a incorporação em alimento, fármacos, entre outros, e ao mesmo tempo mitigar as emissões de gases de efeito estufa, tais como o CO<sub>2</sub>. No entanto, existem ainda variadíssimos trabalhos a ser realizados nas várias áreas ligadas à produção e disrupção deste microrganismo até que a sua utilização plena à escala industrial seja uma realidade.

Neste trabalho foi possível concluir através de dois ensaios efectuados no reator “flat-plate” e no reator de cilíndrico de cinco litros (5l), que a produção de biomassa pode ser superior no reator “flat-plate”, devido à sua maior área de captação de luz.

Relativamente à desintegração celular/extração, foi possível concluir que para a espécie utilizada neste trabalho, a secagem da biomassa não compensa o gasto energético e de recursos em relação à utilização de biomassa húmida aquando da sua desconstrução.

Os processos de desconstrução mais promissores foram a hidrólise ácida, o pré-tratamento a alta pressão e a homogeneização mecânica (rotor/estator a elevada rotação).

Apesar da proporção relativa dos diferentes compostos variar com os solventes de extração usados, n-hexano, clorofórmio e metanol, os solventes não evidenciaram seletividade para compostos específicos, o que pode indicar que os compostos originais (não hidrolisados) teriam partes hidrofílicas e partes hidrofóbicas.

A esmagadora maioria dos ácidos gordos identificados são de cadeia saturada, não tendo sido possível identificar ácidos gordos insaturados, provavelmente devido à sua baixa concentração nos extratos ou eventualmente à sua instabilidade nos processos de desconstrução e extração usados.

Para trabalho futuro seria importante analisar as razões para a baixa seletividade dos solventes e esclarecer a presença dos ácidos gordos insaturados, em termos de teor e em termos de composição.

Com vista ao aumento da produtividade, seria necessário estudar o efeito da área interfacial específica (m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup> de meio) para a transferência de massa através do aumento do caudal de ar comprimido entregue às culturas através de uma placa porosa, reduzindo desta forma as dimensões médias das bolhas e aumentando o carbono inorgânico inserido no meio.

# Capítulo 6

## Referência bibliografia

- 1- ARJUNA, (2014) A production of polynsaturated fatty acids by fungi: Review. International Journal of Pharma and Bio Sciences, v 25;
- 2- HALIM. R.; GLADMAN, B.; DANQUAH, M.K.; WEBLEY, P. A-(2012) Oil extraction from microalgae for biodiesel production: A review. Biotechnol, Adv. 30. Pp. 709-732;
- 3- KARINA.HM.; GUARATINI M.P. B.; VANESSA R. F.; AANGELA P. T.; NORBERTO P. L.;SARA C.;MOACIR A. T.;ANDERSON (2007).;Pio C.;Ernani P. Bioquímica Comparativa e Fisiologia Parte C: Toxicologia e Farmacologia: review v. 146, pp 60-78;
- 4- CARL. J.; RICHARD.; MADEEP.; HECTOR (2009). Ácidos graxos polinsaturados com omega-3 e doença cardiovasculares,
- 5- TRARCILLA.; COSTA.; YIZHOU.; ERIC.; SHAHZAD.; JUAN.; DAVID (2016). a expressão de genes que codificam enzimas que regulam o metabolismo da gordura é afetada pelo nutriente materno quando os cordeiros recebem algas alta em ômega-3;
- 6- CARL. J.; RICHARD.; MADEEP.; HECTOR (2009). Ácidos graxos polinsaturados com omega-3 e doença cardiovasculares.
- 7- CADOZO KHM (2017), Estudo de compostos fotoprotetores da radiação ultravioleta em algas; aminoácidos tipo micospirinas (MAAs).
- 8- CARDOZO KHM, Guaratni T, Barros MP, Falcão VR, Tonon AP, Lopes N, et al (2007). Metabolites from algae with economical impact. Comp Biochem Physiol C- Toxicol Pharmacol, 146: 60-70;
- 9- CRISTAL ZUÑIGA, C.-T. L. (2016). modelo metabólico de escala genômica para a alga verde *Chlorella vulgaris* UTEX 395: previsão com precisão de fenótipos sob condições autotróficas, heterotróficas e condições de crescimento mixotrófico;
- 10- DU, Y. et al (2015) Opportunities for switchable solvents for lipid extraction from algal biomass: an energy evaluation. Algal Research, v.11, p. 271 - 283;

- 11- EDUARDO SANTILLAN-JIMENEZ a, r.p. (2016). Extração, caracterização, purificação e atualização catalítica de lípidos de algas para hidrocarboneto semelhante combustível;
- 12- GRIFFITS. M. J. & HARRISON. S. T (2009). Lipid productivity as a key characteristic for choosing algae species for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.*; 21(5) 493-507;
- 13- HE, Y. et al (2016). Analysis and model delineation of marine microalgae growth and lipid accumulation in flat-plate photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 111, p.108 - 116;
- 14- HOANG SH NGUYEN, I. H.-A. (2016). extração de lípidos de chlorella algas por hexano supercrítico e demonstração de sua hidroxidação catalítica subsequente;
- 15- JANG, H. D.; LIN, Y. Y.; YANG, S. S (2005) Effect of culture Media and conditions on polyunsaturated fatty acids production by *Mortierella alpine* *Bioresource Technology*, v.96. p.1633-1644;
- 16- KWIETNIEWSKA, E, et al (2012) Microalgae: cultivation and application of biomass as source of energy: a review, *Instytut Agrofizy*;
- 17- LI. Q.; DU, W.; LIU, D.(2008) Perspectives of microbial oil for biodiesel production *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 80, p. 704-756;
- 18- LIANG, Y., SARKANY, N. e CUI, Y.(2009). Biomass and lipid productivity of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions, *Biotechnol. Lett*, 31(7), 1043-1049;
- 19- MACHECHA, H.S.; FRANCISCO, A.; BEIRÃO, L. H.; BLOCK, J. M; SACCOL, A; CARRASCO (2012), S.P. importância de ácidos gordos poliinsaturados presentes em peixes de cultivo e de ambiente natural para a nutrição humana. *Boletim do Instituto de Pesca*. São Paulo, v.28(1), p.101-110;
- 20- MERCER, P. AND ARMENTA, R.E.(2011); Developments in oil extraction from microalgae. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113:5, pp. 539-547;

- 21- MOTONOBU GOTO.; HIDEKI KANDA.; WAHYUDIONO.; SITI MACHMUDAH (2015). Extração de carotenóides e lipídios de algas por CO<sub>2</sub> supercrítico e éter dimetílico subcrítico. review v.96 pp 245-251;
- 22- PEREIRA, L., A. M. AMADO, A. T. CRITCHLEY, F. VAN DE VELDE AND P. J. A. RIBEIRO-CLARO. (2009)A. Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). Food Hydrocolloids 23(7): 1903-1909;
- 23- PRAGY,N.; PANDEY, K. K.; SAHOO, P. K.(2013) A review on harvesting, oil extraction and biofuel production technologies from microalgae. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 24, p. 159-171;
- 24- REDDY, H. K et al (2014). Subcritical water extraction of lipid from wet algae for biodiesel production. Fuel, v.133, p.73-81;
- 25- ROCHA FD, PEREIRA RC, KAPLAN MAC, TEIXEIRA VL (2007). Produtos naturais de algas marinhas e seus potenciais antioxidação. Rv Bras Farmacogn; 17 (4): 631-9;
- 26- SALAM, K. A.; VELASQUEZ-ORTA, S.B.; HARVEY, A. P. A(2016) sustainable integrated in situ transesterification of microalgae for biodiesel production and associated co-products; a review Renewable and Sustainable Energy Review, v. 65, p. 1179 .1198;
- 27- SAULI, E. R. SARBATLY (2012). Conversion of microalgae to biofuel renewable & Sustainable Energy Reviews, v 16;
- 28- SHU YZ.(1998) Recent Natural Products Based Drug Development: A Pharmaceutical industry Perspective.JNat Prod ;61: 1053-1071;
- 29- SMIT AJ.(2004) Medicinal and Pharmaceutical uses of Seaweed natural products: a review J Appl Phycol; 16:245-262;
- 30- SOUZA, N. E. DE; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J.V (2012). Ácidos groxos. Estruturas classificação, nutrição e saúde. Arquivo do Museu Dinâmico Interdisciplinar, v,2, n.2 p.102-107;

- 31- VAN DEN HOEK C, MANN DG E JAHNS HM (1995) *Algae: Na introduction to phycology*. Cambridge: Cambridge Unisersity Presse. 623p;
- 32- MOSTAFA M.SHEEKH.; RAGAA A. HAMOUDA (2016). Extração de lipídios da alga verde *Ankistrodesmus falcatus* usando diferentes métodos. V. 27, pp 589-595;
- 33- RAFAEL SILVA MENEZES.; MARIA INÊS G. LELES.; ALINE TERRA SOARES.; PEDRO IVO BRADÃO.; NELSON ROBERTO (2013). Avaliação da potencialidade de microalgas como fonte de matéria prima graxa para a produção de biodiesel: universidade federal de goias, campus II samambaia cp131;
- 34- FOTI M, PIATTELLI M, AMICO V, RUBERTO G.(1994) Antioxidante actuvity of phenolic meroditerpenoids fron marine algae. J photochem photobiol Bbiol ; 26 159-164;
- 35- GOMBOTZ WR WEE SF (1998). Protein release from alginates matrices Adv Drug Deliv Rev; 31 (3):267-285;
- 36- VAN DEN HOEK C, MANN DG e JAHNS HM. ALGAE (1995): An introduction to phycology. Cambridge: cambrige University Press. 623p;
- 37- SYLVANIA (2000), "Photosynthetically Active Radiation (PAR) Units," p. 46074;
- 38- ACKMAN, R. G. WCOT (1987) capillary gas-chromatography. In: **Analysis of Oils and Fats**. Eds. HAMILTON, R. J. & ROSSEL, J. B. Elsevier Applied Science, Essex, p.137;
- 39- BLIGH EG, DYER WJ.(1959) A rapid method of total lipid. Extraction and purifi cation. Can J Biochem Physiol; 37:911-7;
- 40- PUJA KUMARI A.J. BIJO; VAIBHAV A. MANTRI, READDY BHAVANATH (2013), análise de ácido gordos de macroalgas marinhas tropicais, uma análise de perspectivair quimioterapia e nutricionais v. 86, pagina 44-56
- 41- FOLCH J, LEES M, STANLEY GHS (1957). A simple method for the isolation and purifi cation of total lipids from animal tissues. J Biol Chem; 226: 497-509;

- 42- ELSABETH GEGIS, ROMANO HORNEK GAUSTER, MILEK TURKER SACAN, (2016), toxicidade única e mista de produtos farmacêuticos e clorofonios em algas de água doce *Chlorella vulgaris* pp.189-198;
- 43- PENGYING ZHANG, SHAN GHAO LIU BAILING, GUANGTING WU LEU, XUEZHENG LIN JIHANG SHEN, XIAOHANG HUANG (2011), uma nova desaturação de ácidos gordos omega-3 envolvidos em processo de climatização de condições polares de algas de gelo antráticas *Chlamydomonas* sp. V ;13 pag 393-401 biotecnologia marinha;
- 44- MOSTAFA M. EL-SHEEK, RAGOA A. HMOUDA (2016) extração de lípidos de algas verdes *Ankistrodesmus falcautus* usando diferentes métodos. V:27 pagina 589-595;
- 45- PALVO BAHUSTSKYI, STEVEN CHOW, BEN KATTER; CORAL FUNG, SHEK DEAN YACAR YUSTING TANG MARK ZIVOJNOVICH, MICHAEL J. BETEMBAUGH, EDUARDO J. BAUWER (2016), fitorremediação do escoamento da agricultura para por poli-cultura de algas filamentosas para produção de biometano recuperação de nutriente para cultivo secundário de microalgas gerador de lípidos.

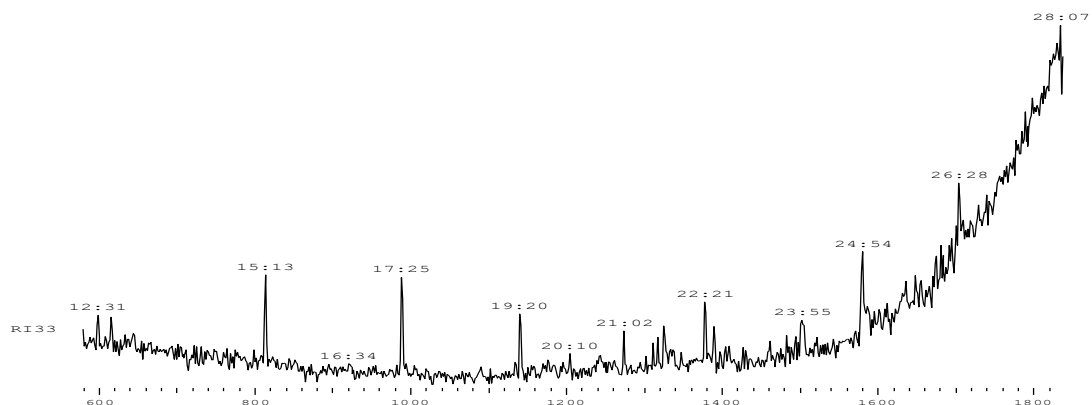
# Anexos

## Anexos de aspectos das estruturas dos lípidos

Amostras e extrações da biomassa de Microalgas: RS - 1 (HA - hexano, peso 0,024 mg)

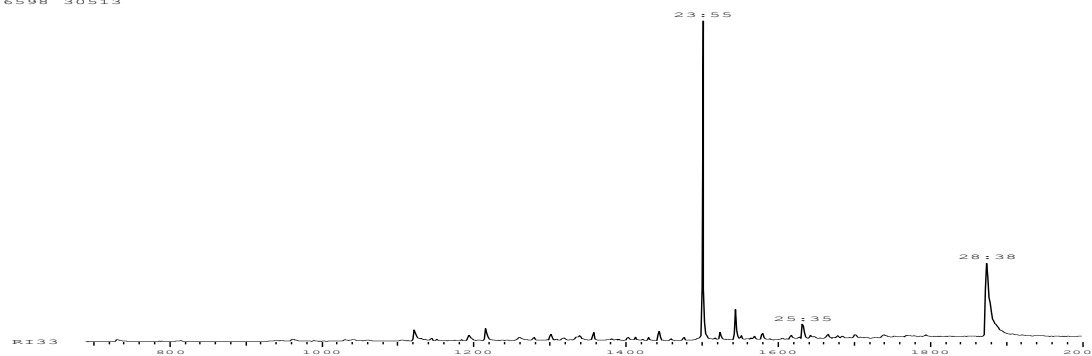
Cromatograma:

rodilla021.SMS \*  
MaxE0 SumE1  
RI 2211 67432

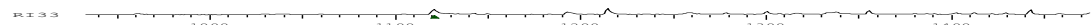
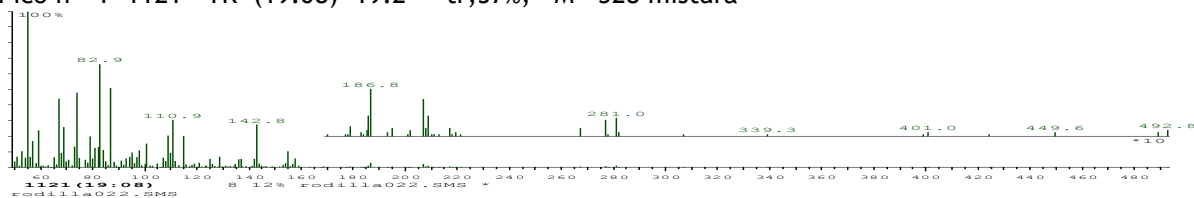


Pico nº 1 987 TR (17.25) 36.24 17,57%, M ----- não tem sinais importantes  
RS - 2 (HA - clorofórmio, peso 0,176 mg). Cromatograma:

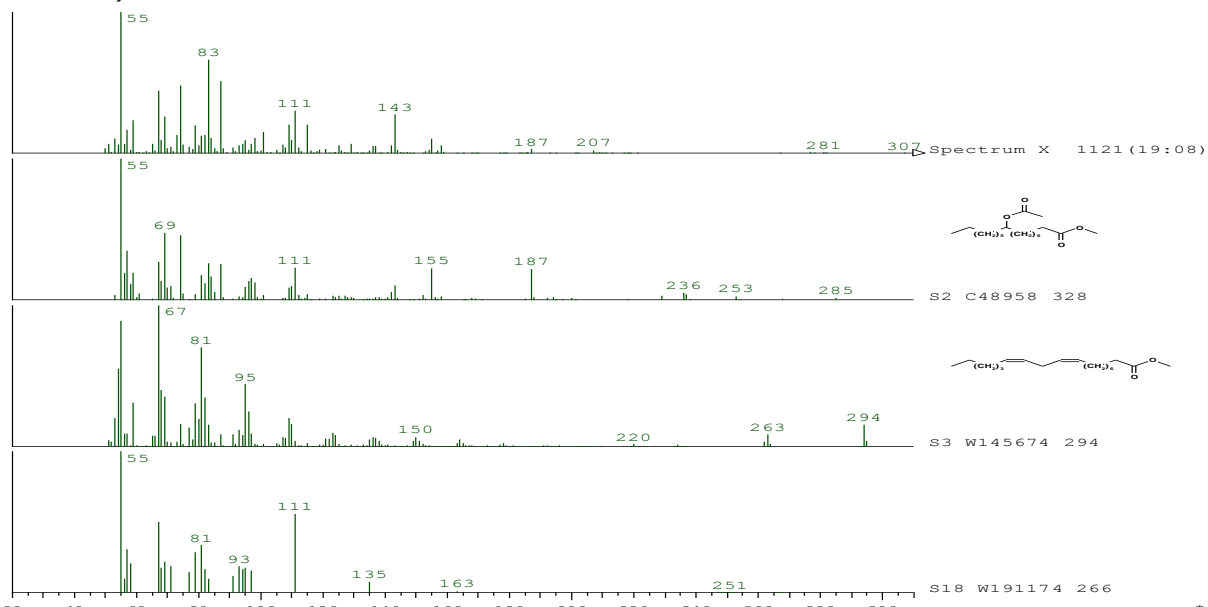
rodilla022.SMS \*  
MaxE1 SumE2  
RI 16598 30513



Pico nº 1 1121 TR (19:08) 19:2 tr,57%, M 328 mistura

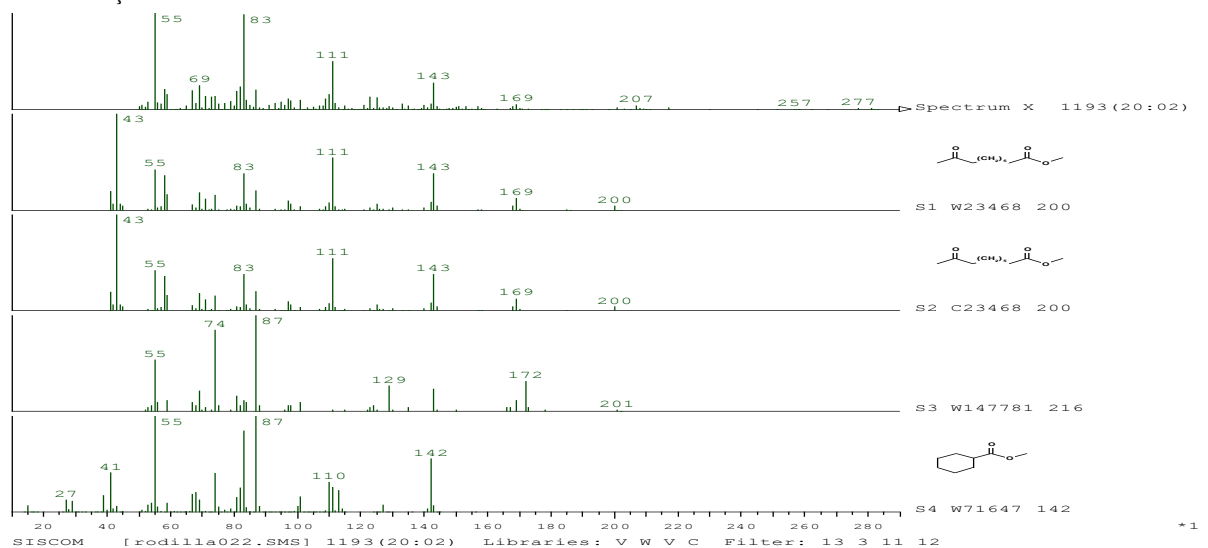


Identificação:

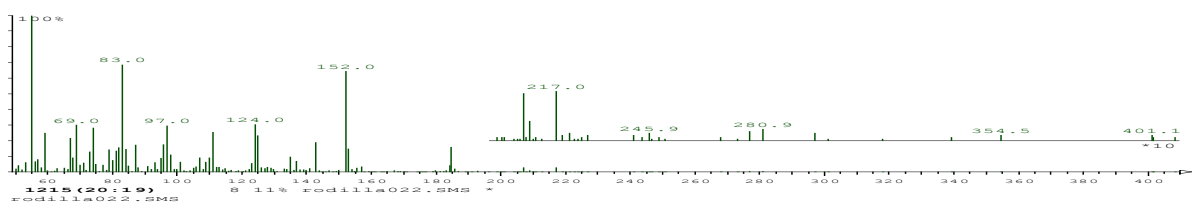


Pico nº 2, 1193 TR (20:02) 20:2 tr,57%, M 200 9-oxodecanoato de metilo

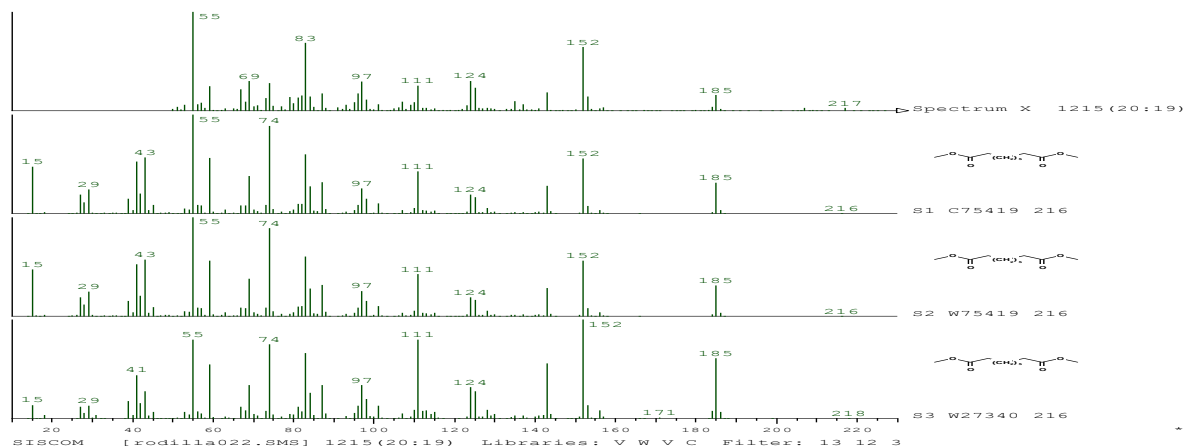
Identificação:



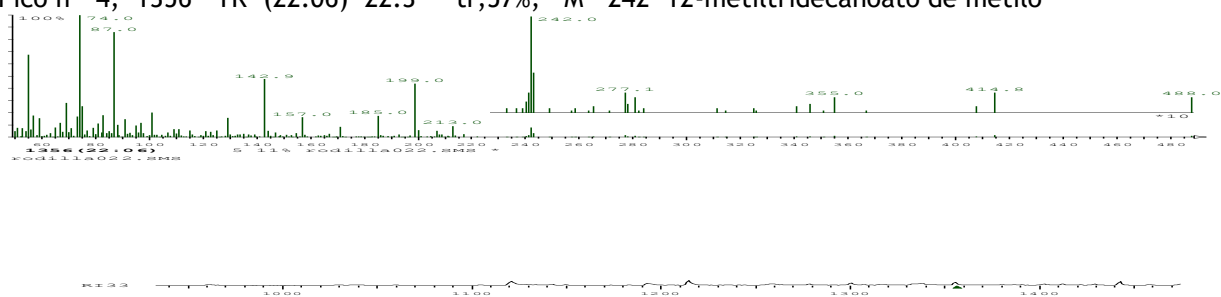
Pico nº 3, 1215 TR (20:19) 20:3 tr,57%, M 216 nonanodioato de dimetilo



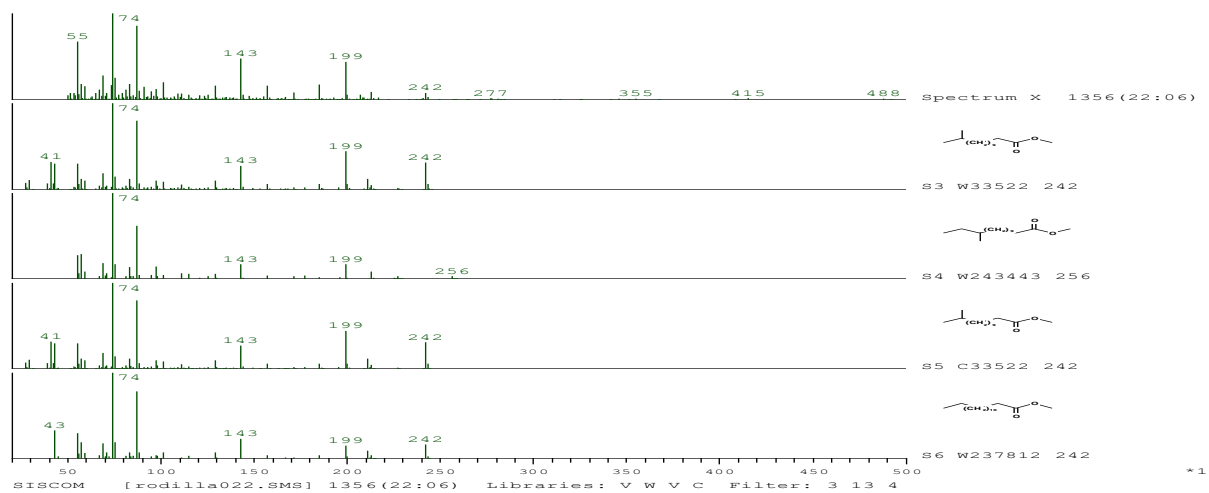
Identificação:



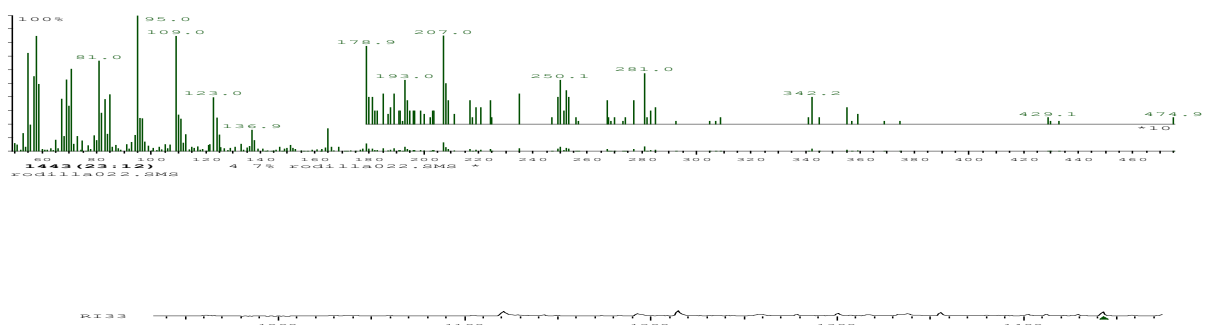
Pico n° 4, 1356 TR (22:06) 22:3 tr,57%, M 242 12-metiltridecanoato de metilo



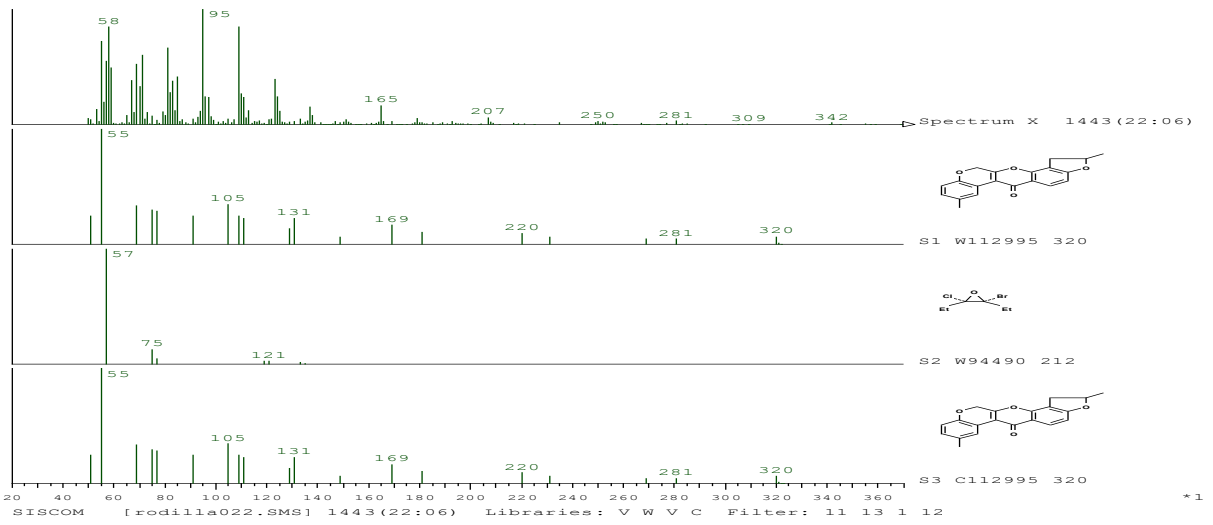
Identificação:



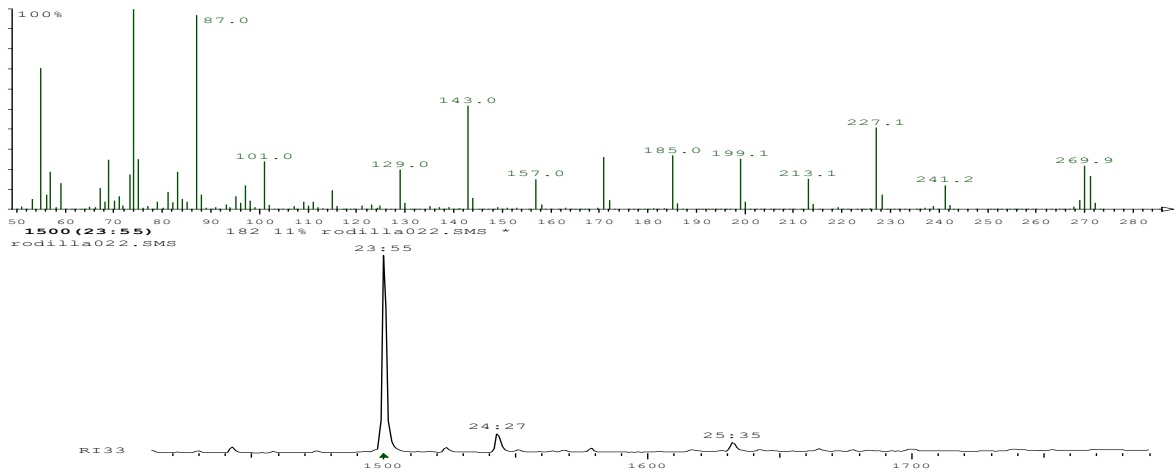
Pico n° 5, 1443 TR (23:12) 23:3 tr,57%, M 250 NI



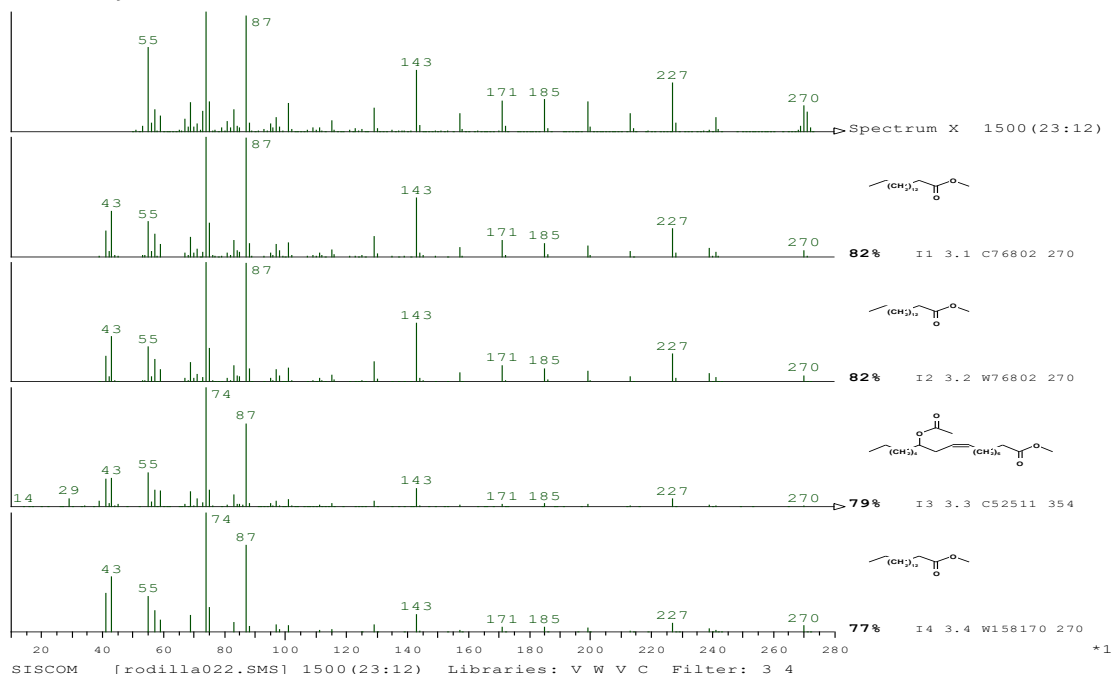
Identificação:



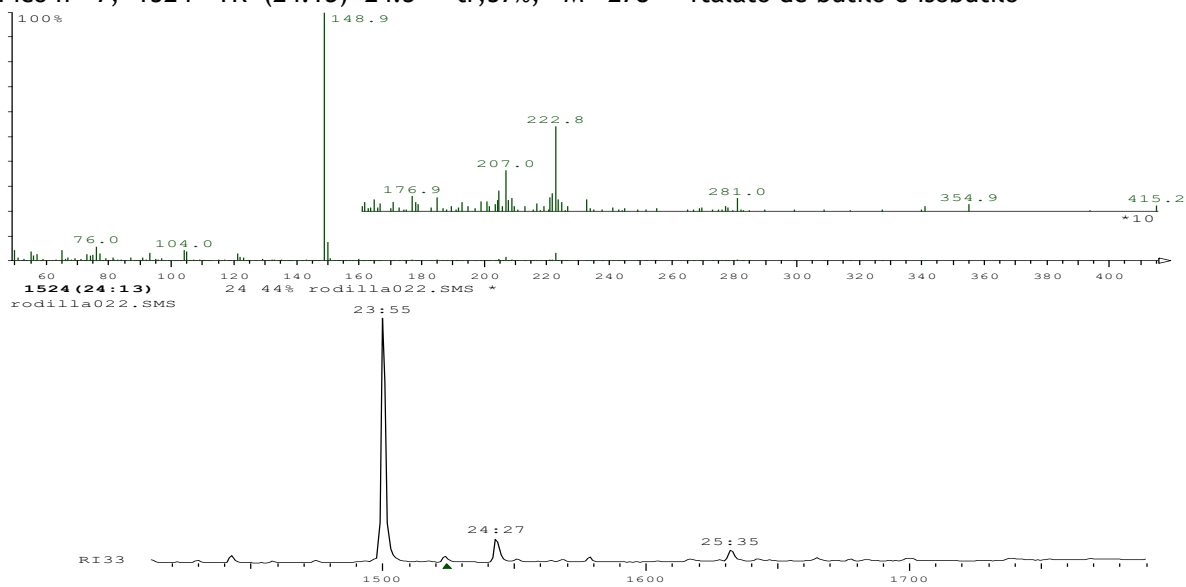
Pico nº 6, 1500 TR (23:55) 23:3 tr,57%, M 270 hexadecanoato de metilo



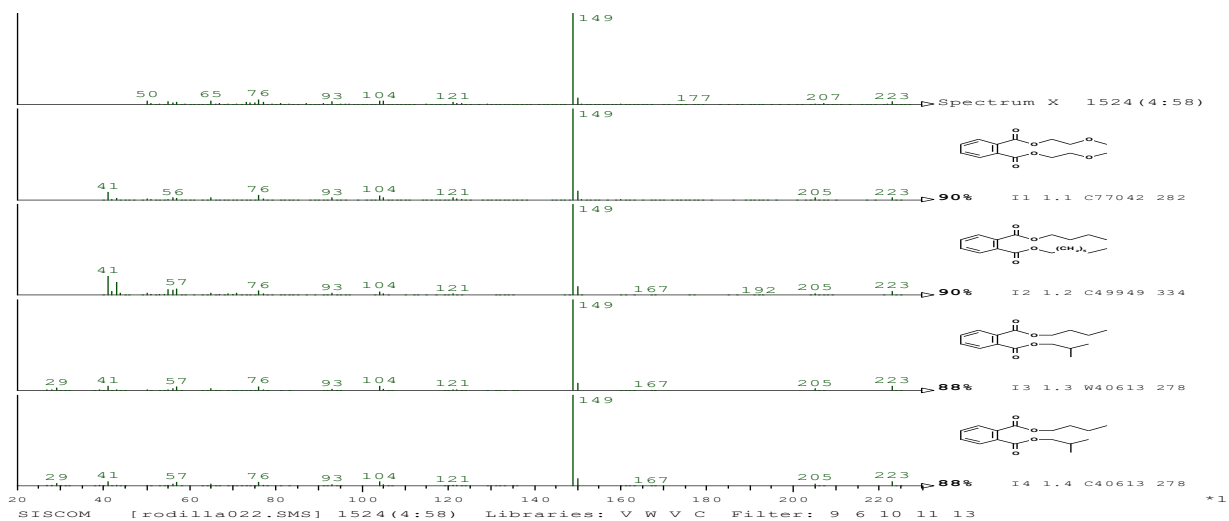
Identificação:



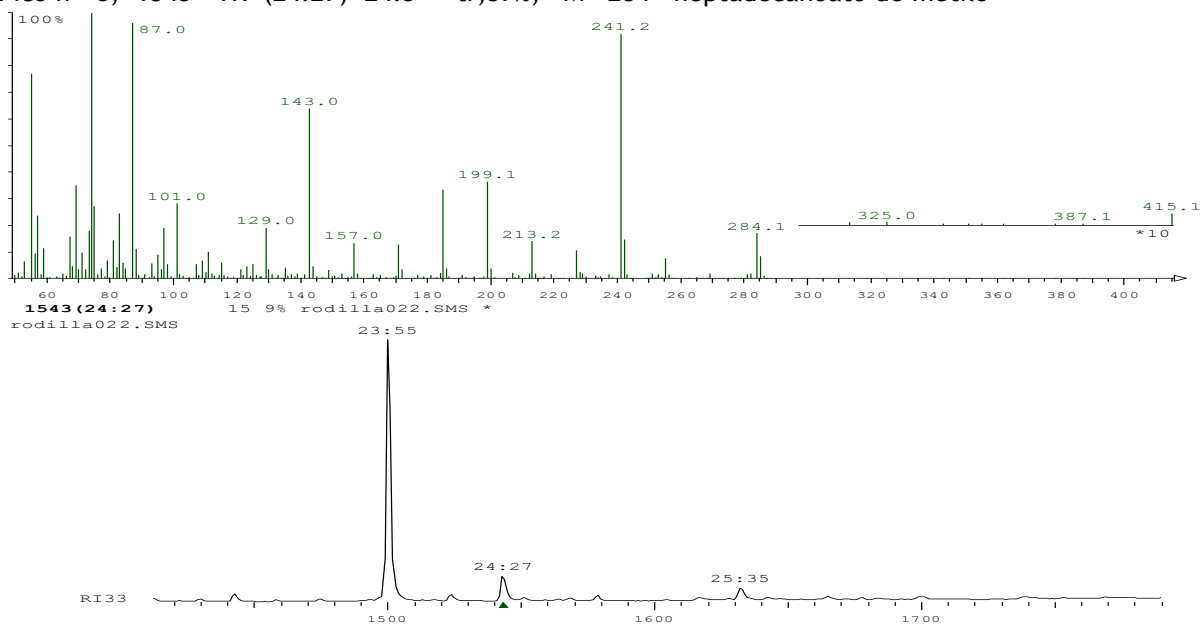
Pico nº 7, 1524 TR (24:13) 24:3 tr,57%, M 278 ftalato de butilo e isobutilo



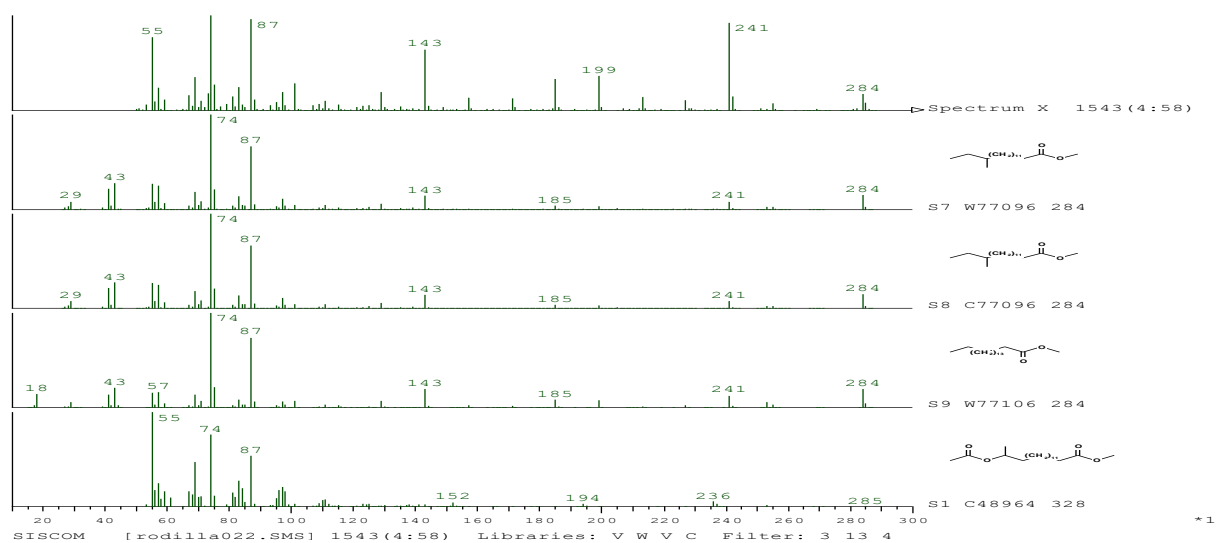
Identificação:



Pico nº 8, 1543 TR (24:27) 24:3 tr,57%, M 284 heptadecanoato de metilo

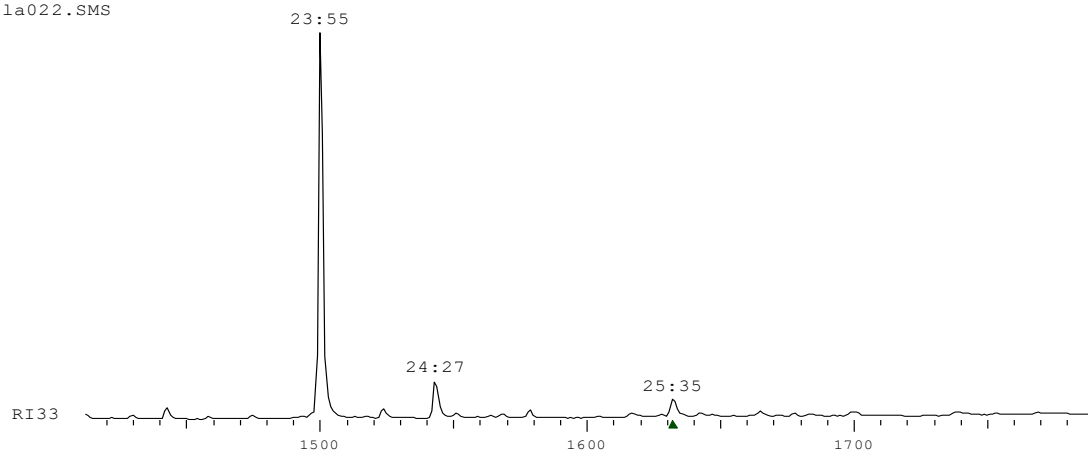
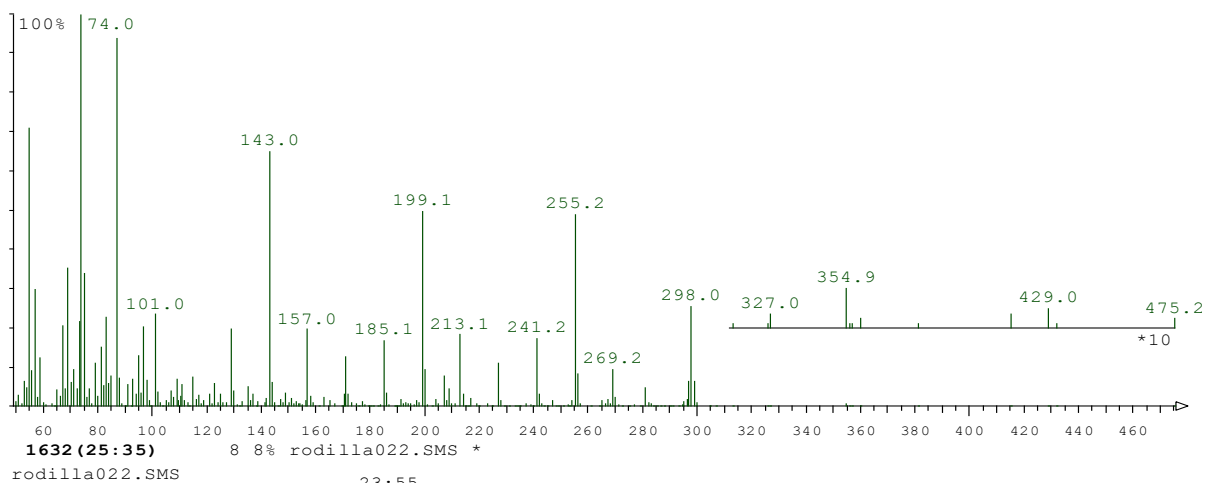


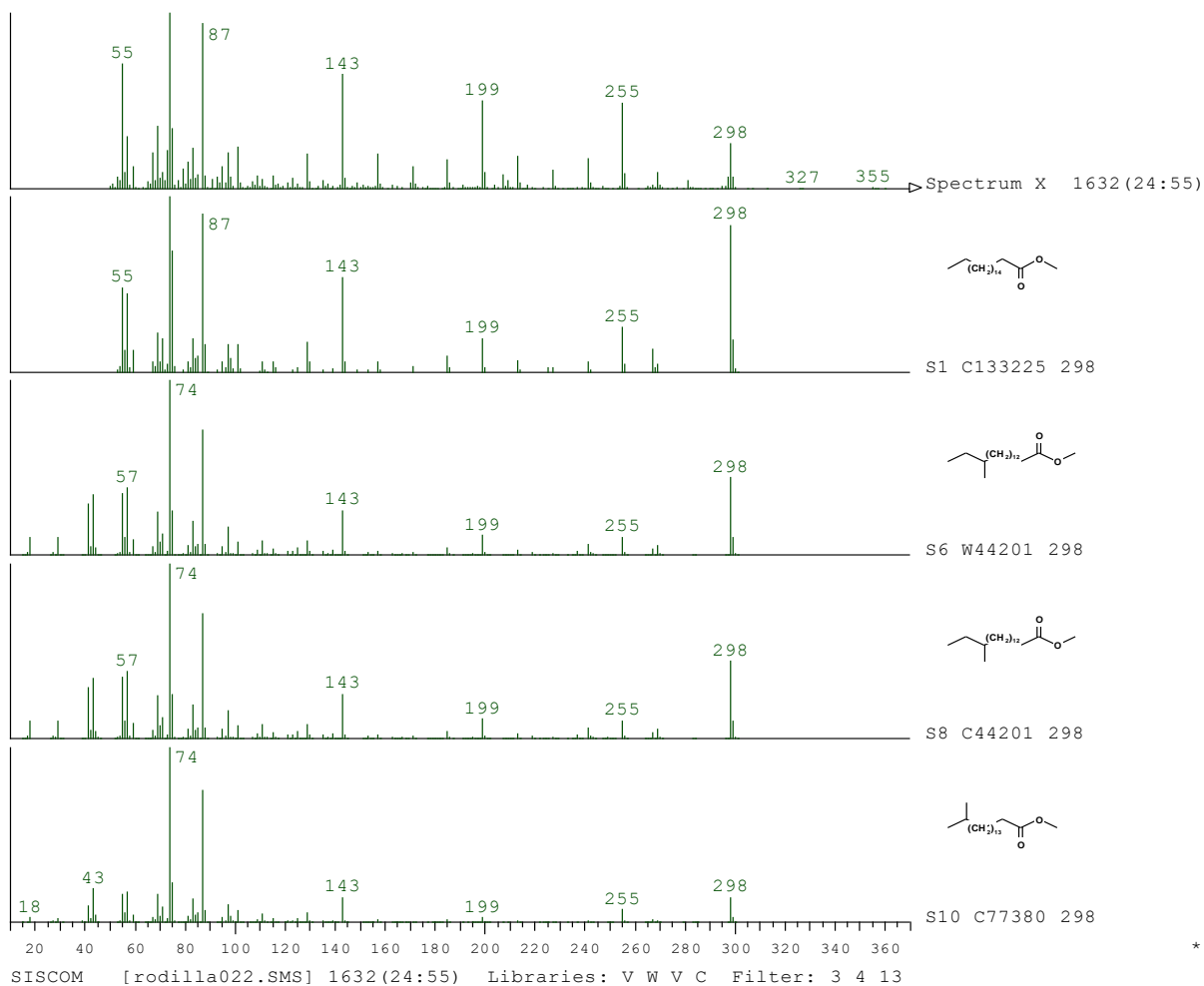
Identificação:



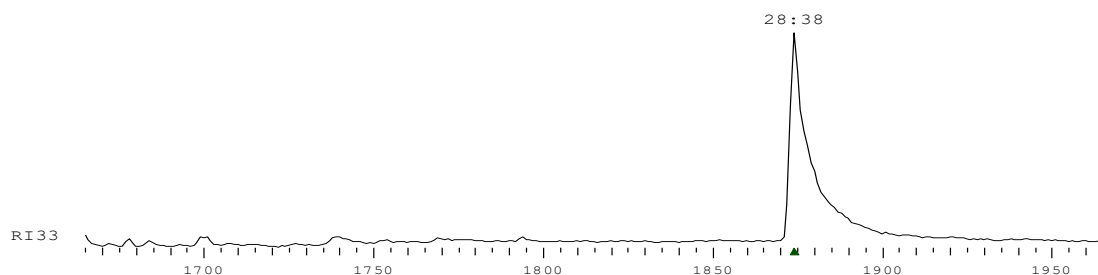
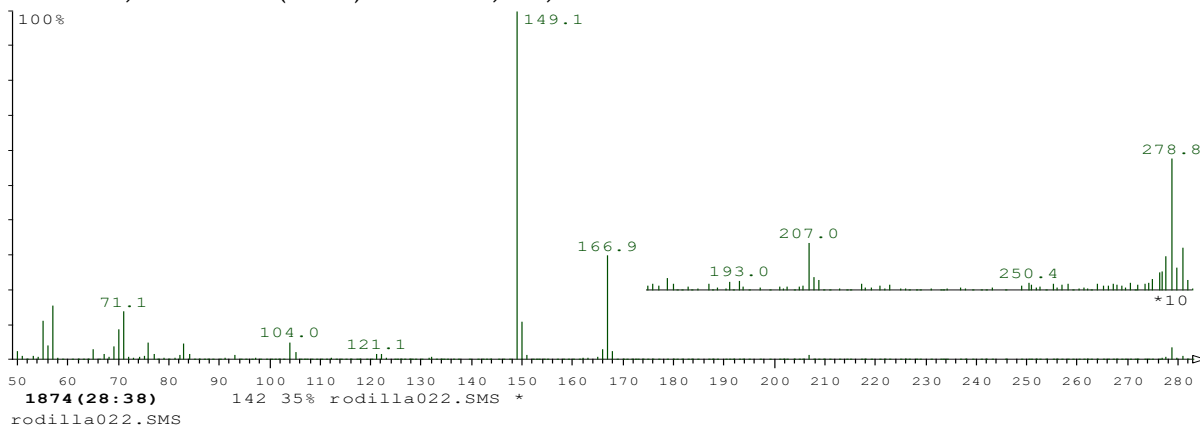
Pico nº 9, 1632 TR (25:35) 25:3 tr,57%, M 298 octadecanoato de metilo

Identificação:

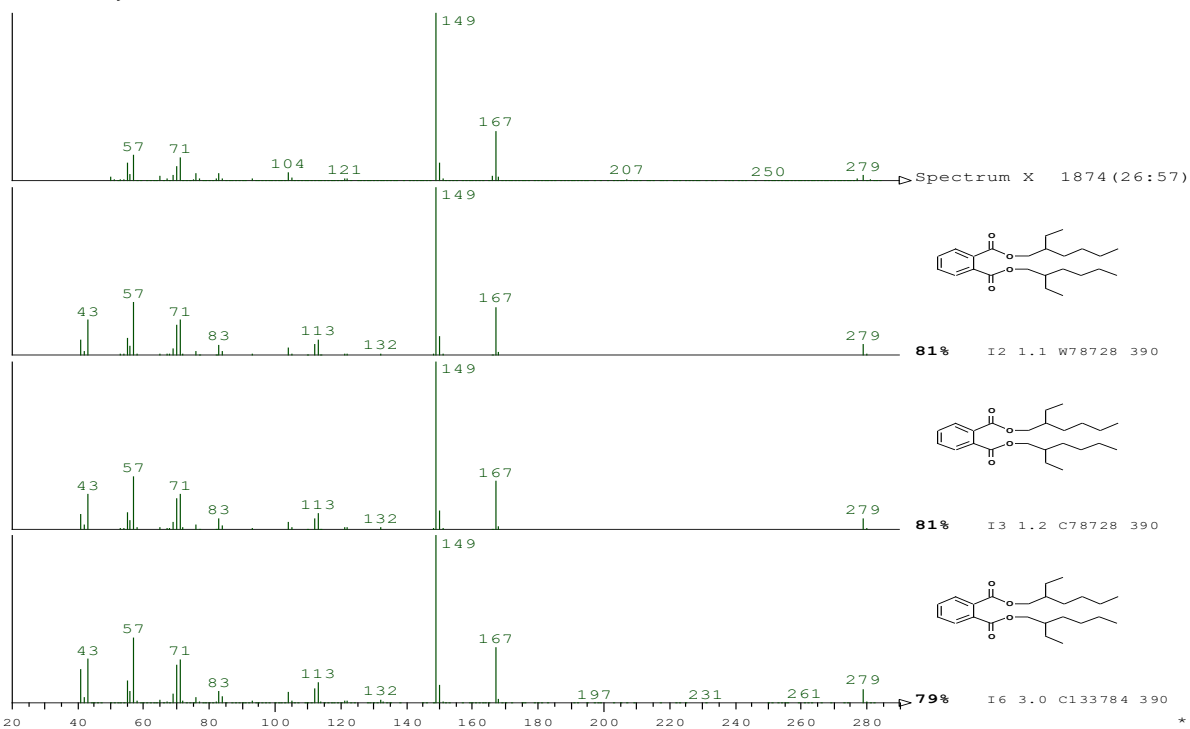




Pico nº 10, 1874 TR (28:38) 28:3 tr,57%, M 390



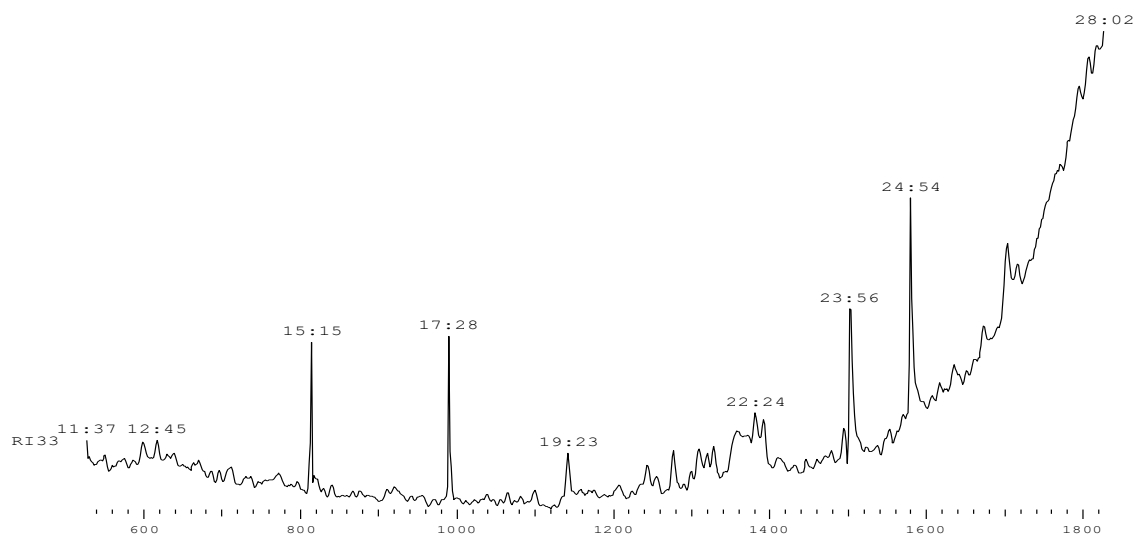
Identificação:



RS - 3 (HA - metanol, peso 0,229 mg).

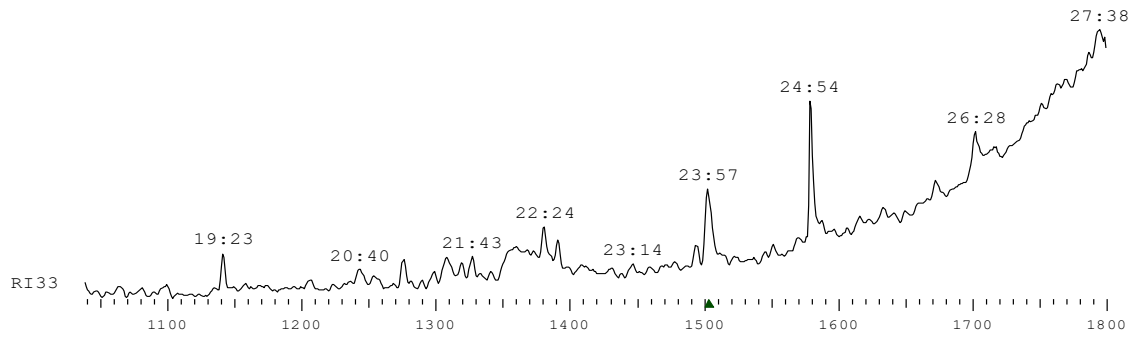
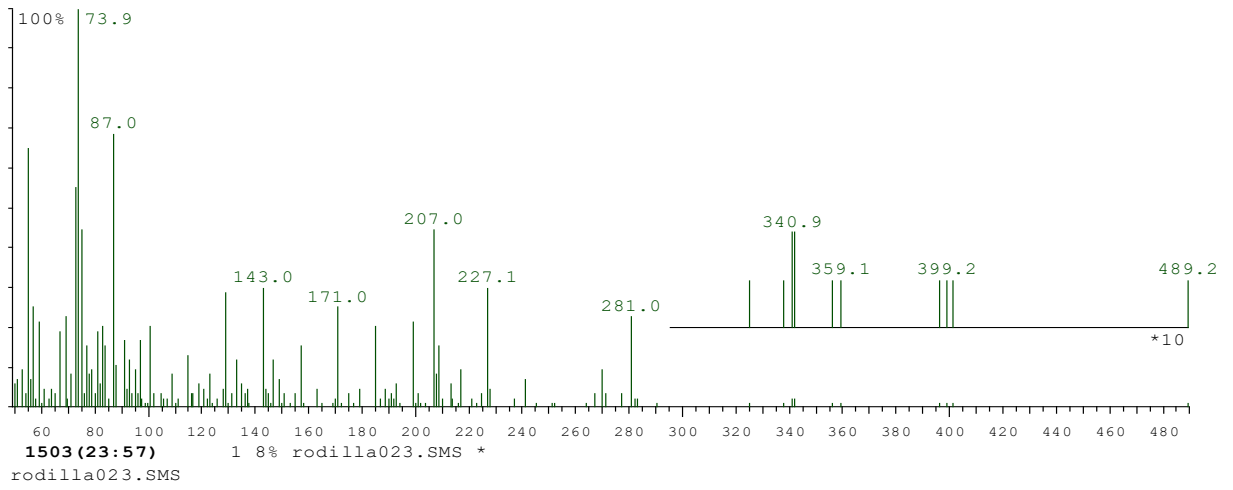
Cromatograma:

rodilla023.SMS \*  
MaxEO SumE1  
RI 2004 76562

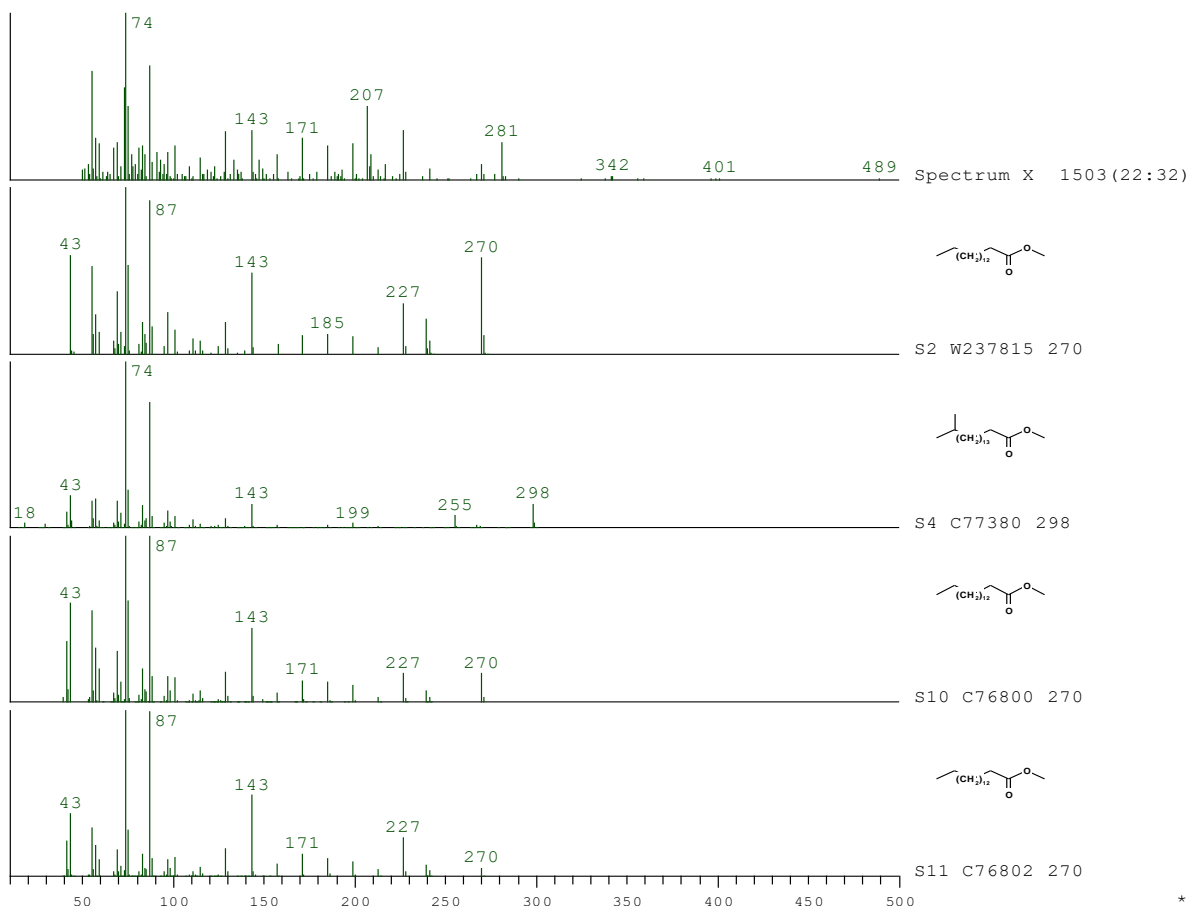


Pico nº 1 1503 TR (23:57) 23:2 tr,57%, M 280

hexadecanoato de metilo



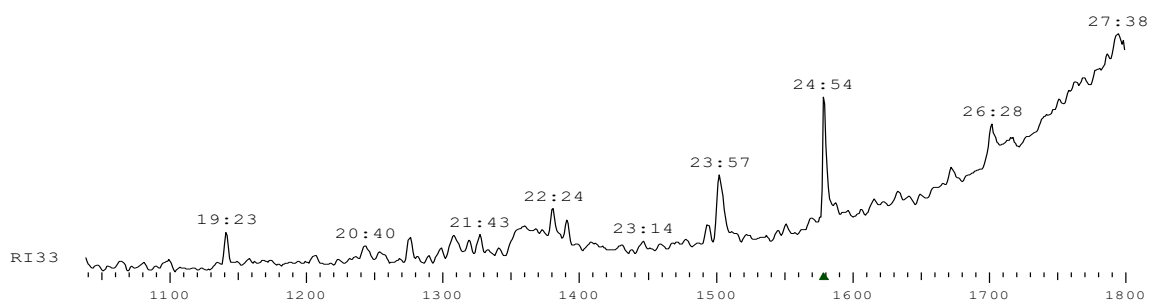
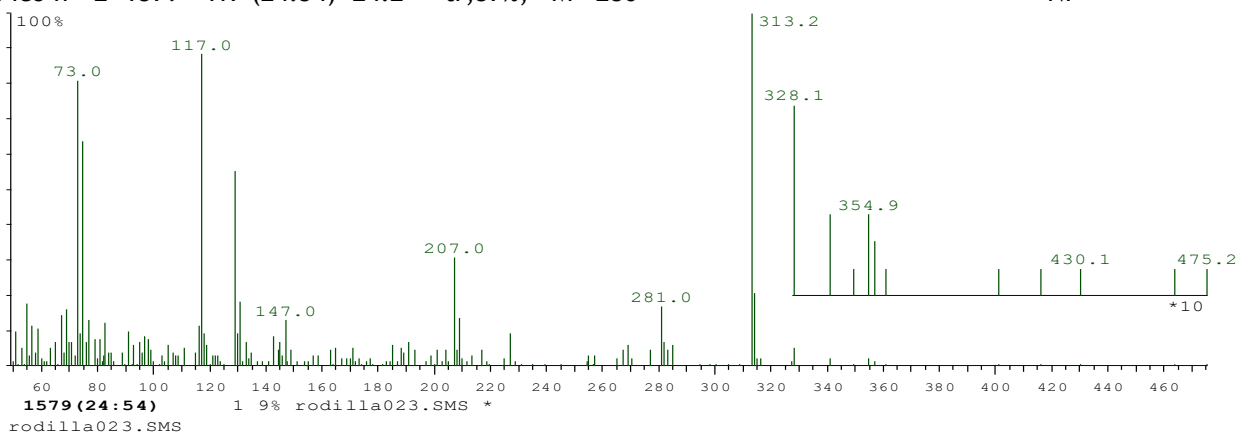
Identificação:



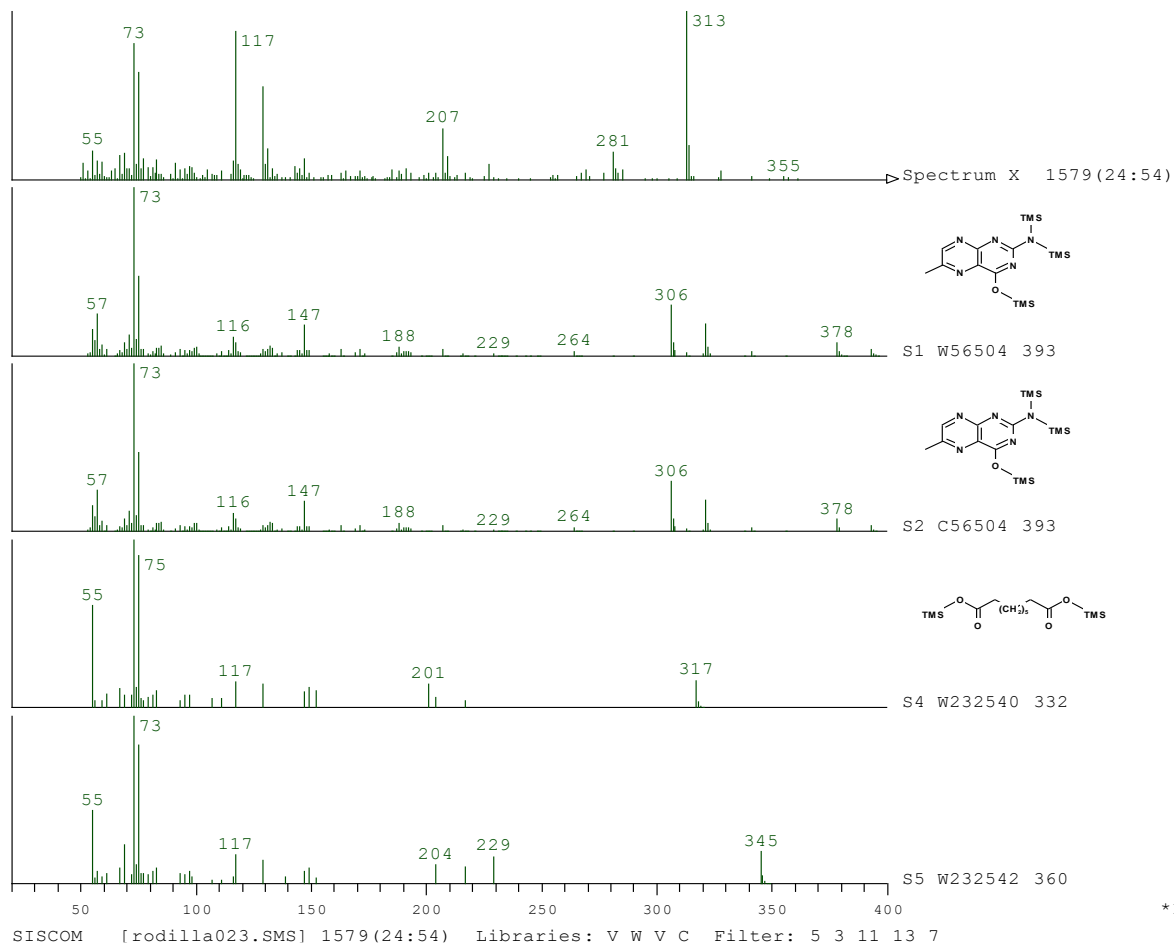
SISCOM [rodilla023.SMS] 1503(22:32) Libraries: V W V C Filter: 3 13 4 11

Pico nº 2 1579 TR (24:54) 24:2 tr,57%, M 280

NI

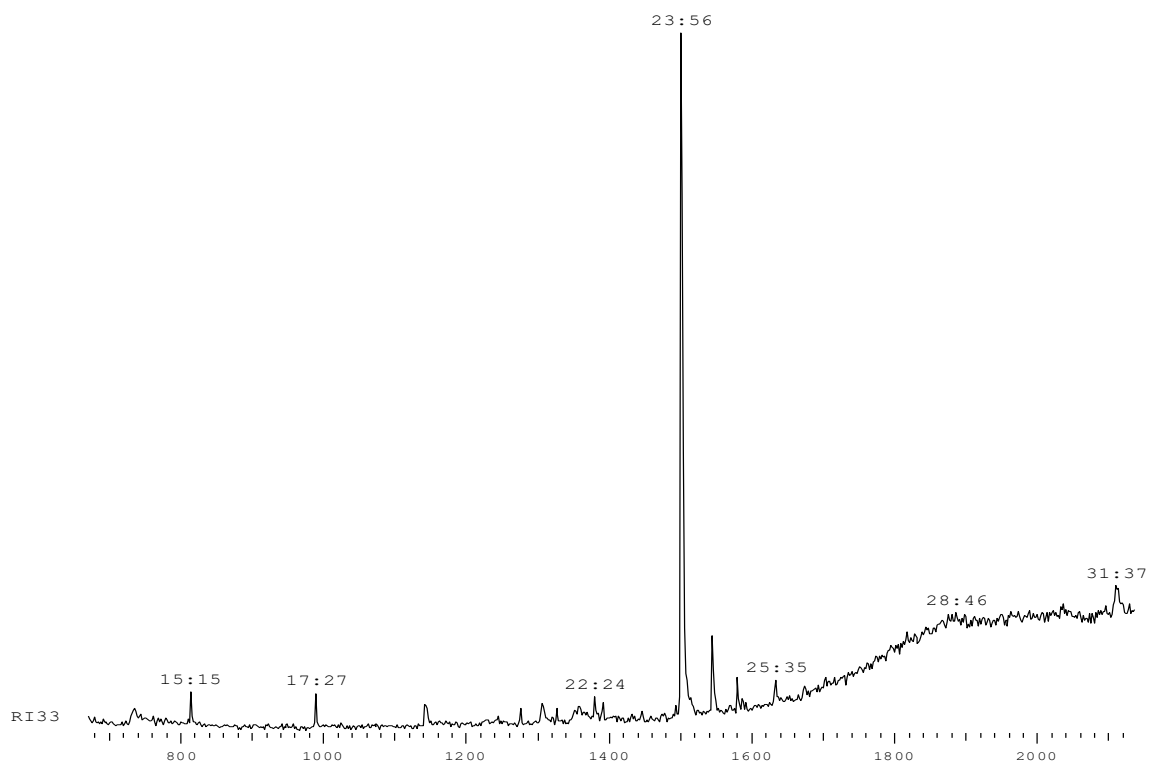


Identificação:

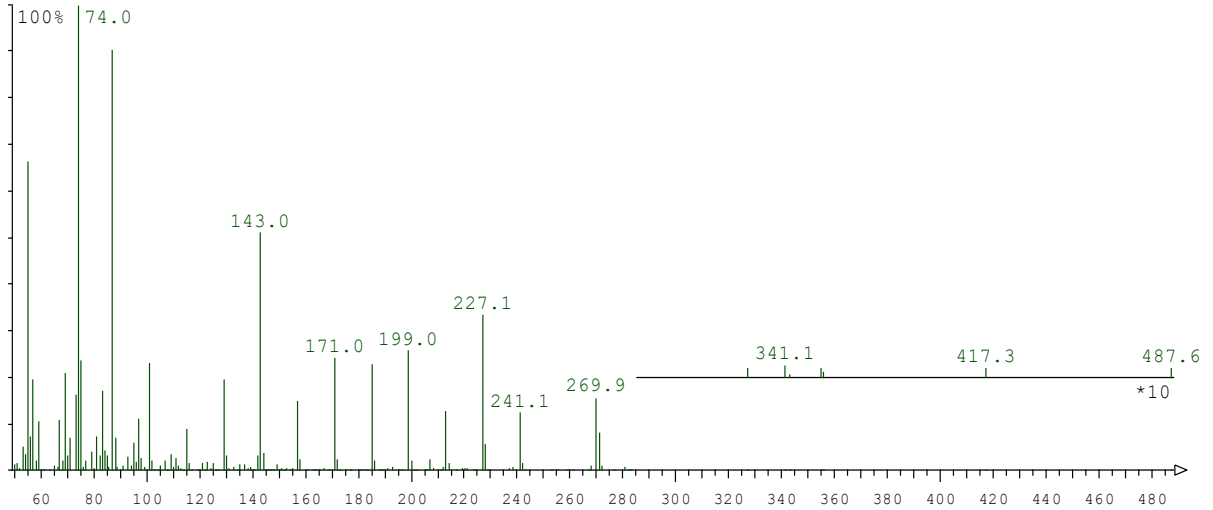


RS - 4 (AP - Hexano, peso 0,013 mg). Cromatograma:

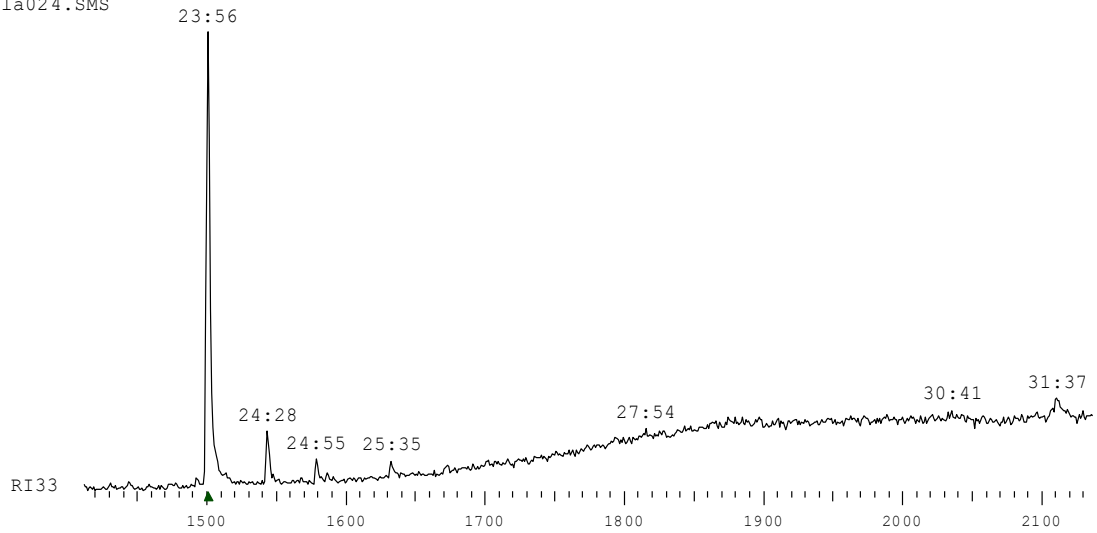
rodilla024.SMS \*  
 MaxE0 SumE2  
 RI 12004 14220



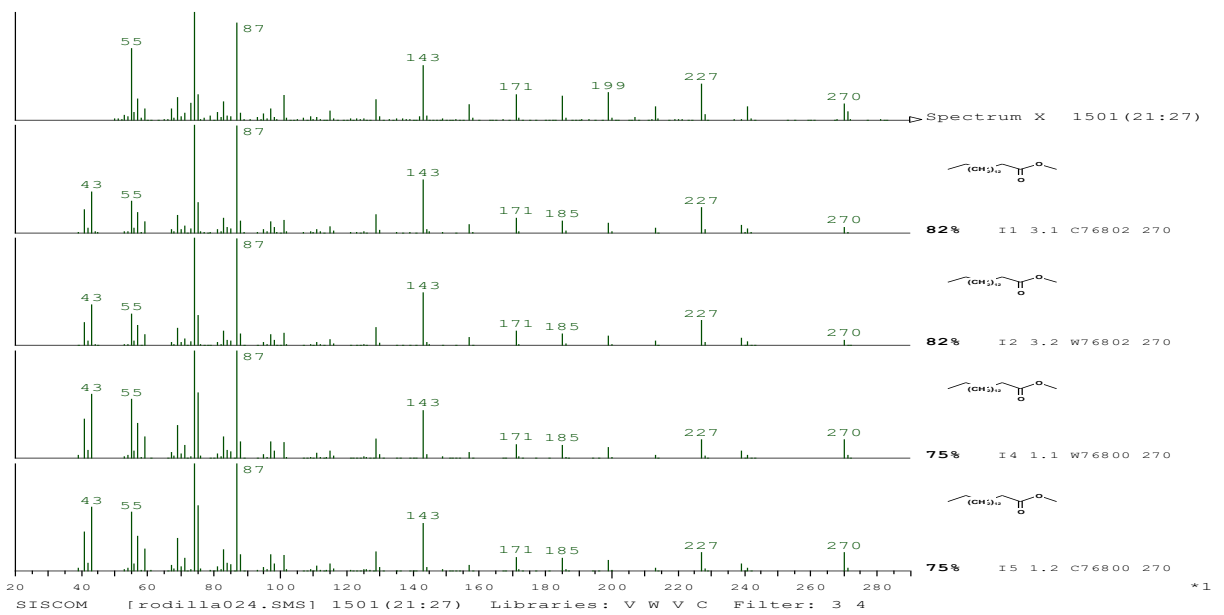
Pico nº 1 1501 TR (23:56) 23:2 tr,57%, M 270 hexadecanoato de metilo



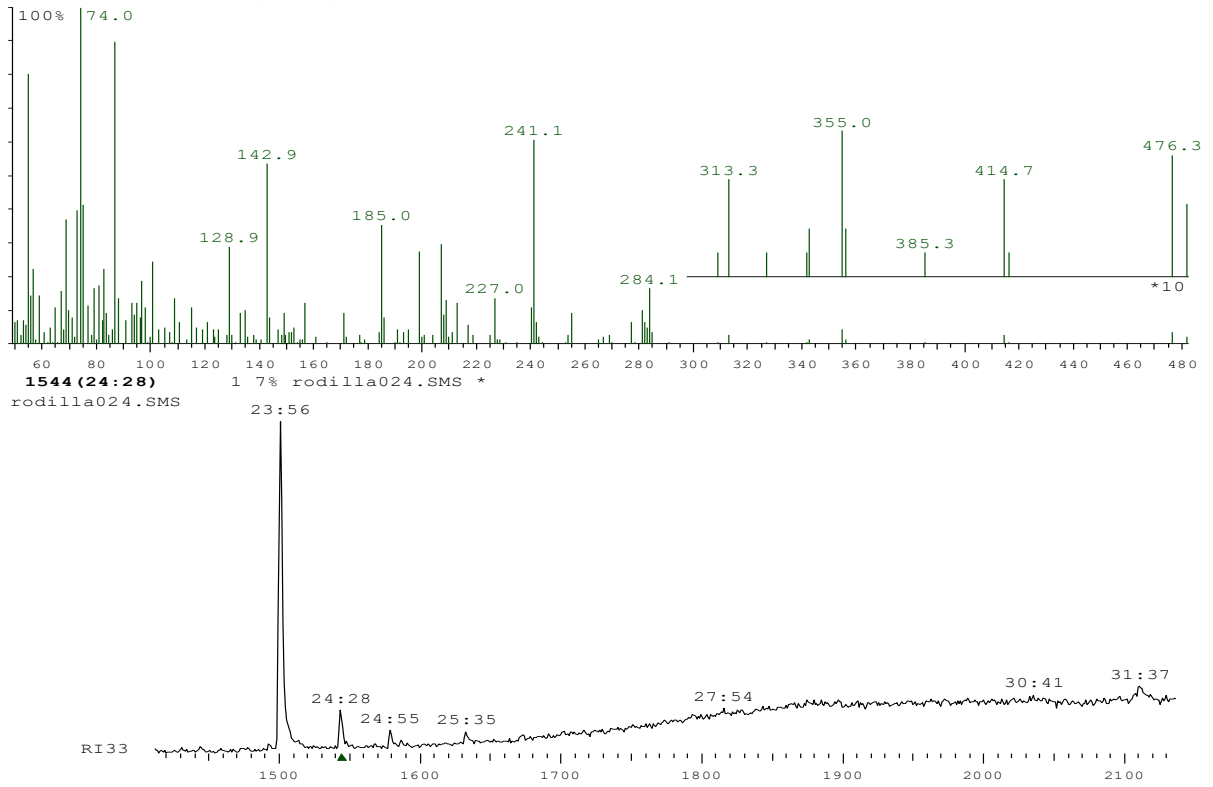
1501 (23:56) 14 12% rodilla024.SMS \*  
rodilla024.SMS



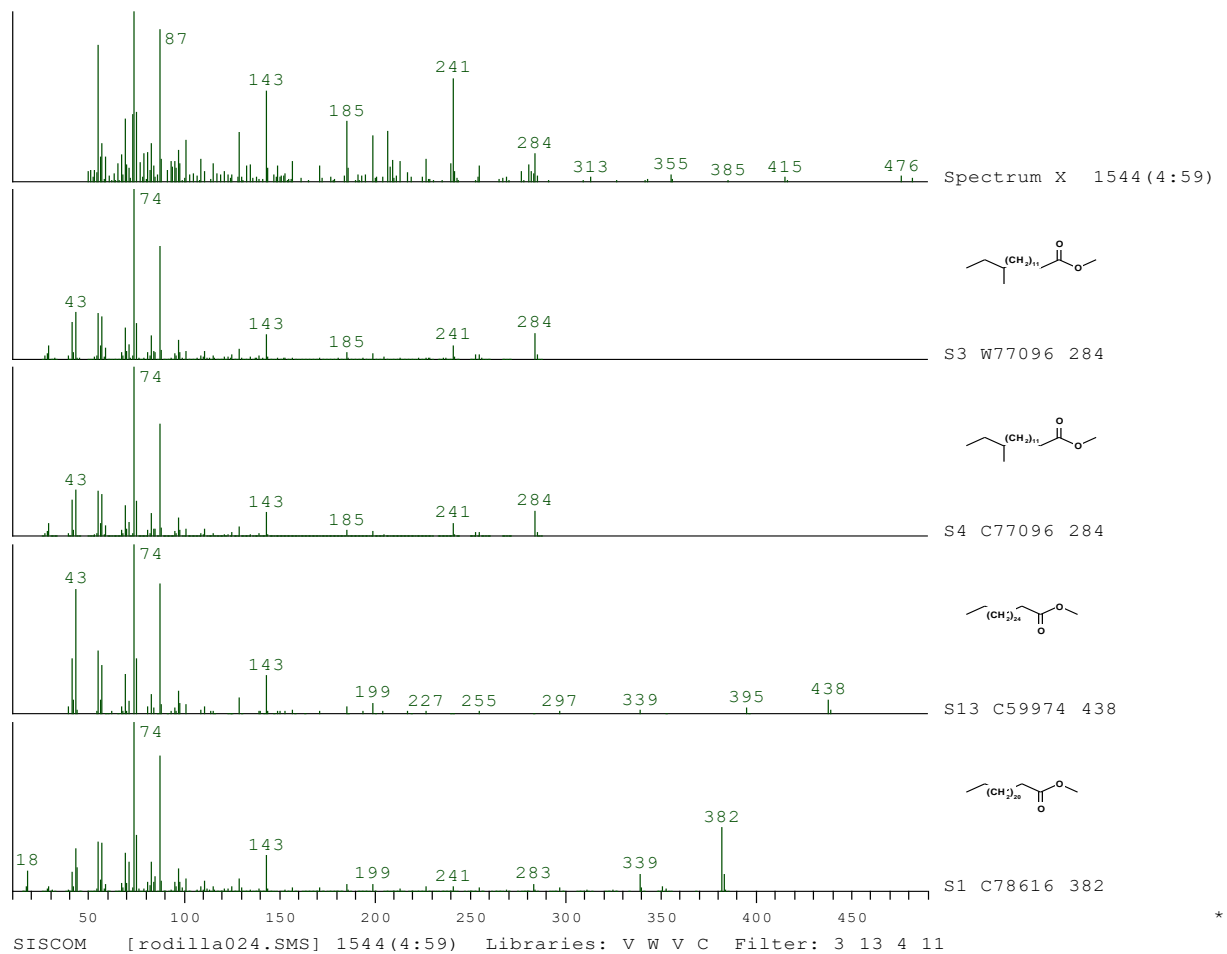
Identificação:



Pico nº 2 1544 TR (24:28) 24:2 tr,57%, M 284 14-metilhexadecanoato de metilo

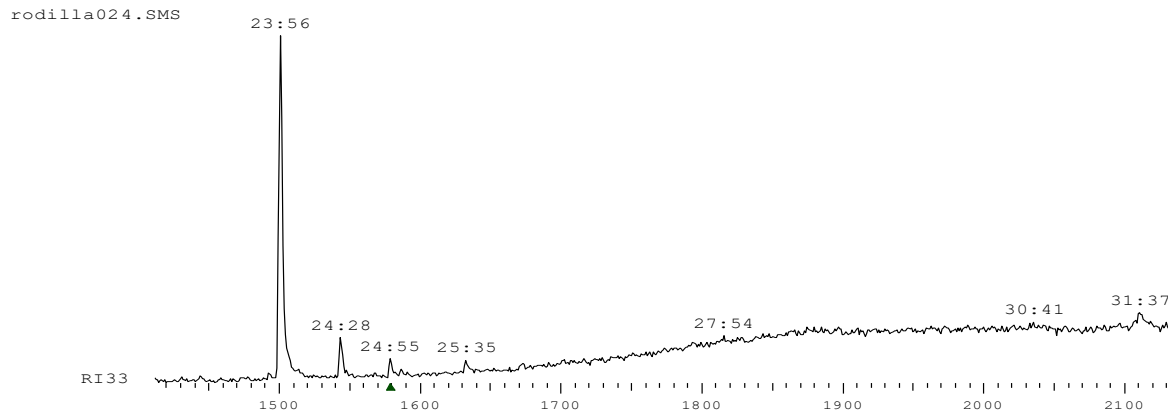
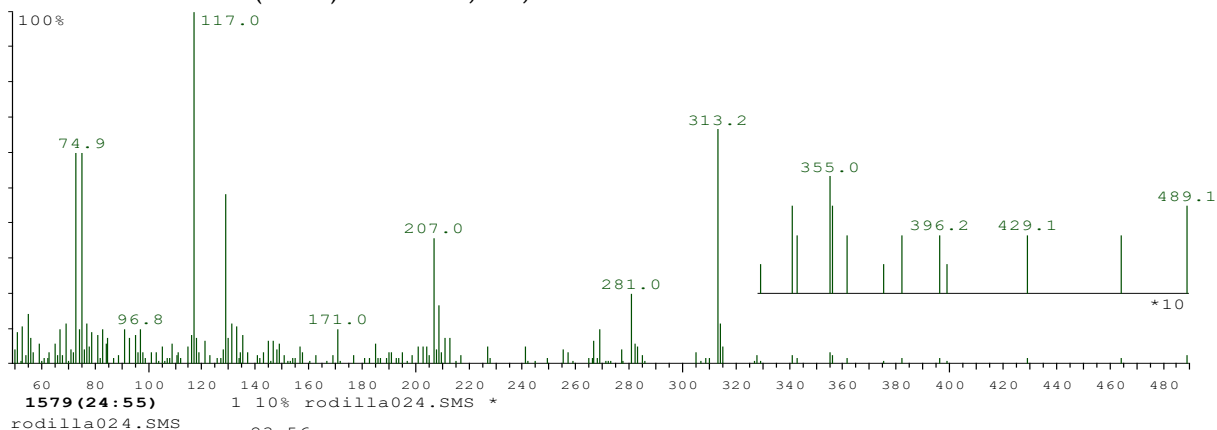


Identificação:

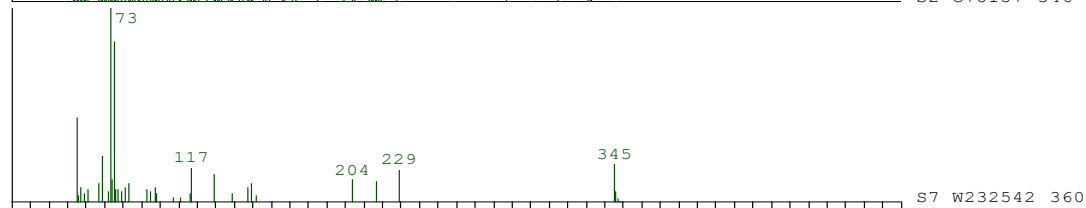
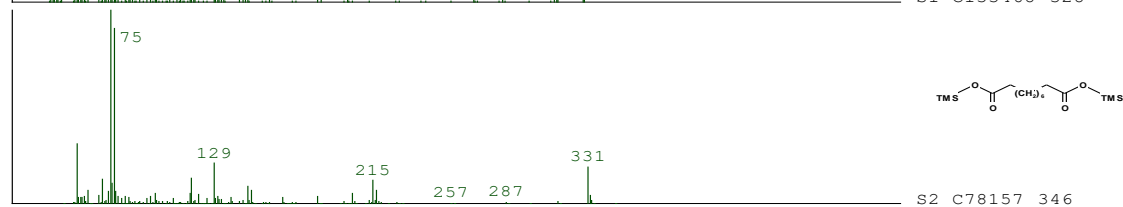
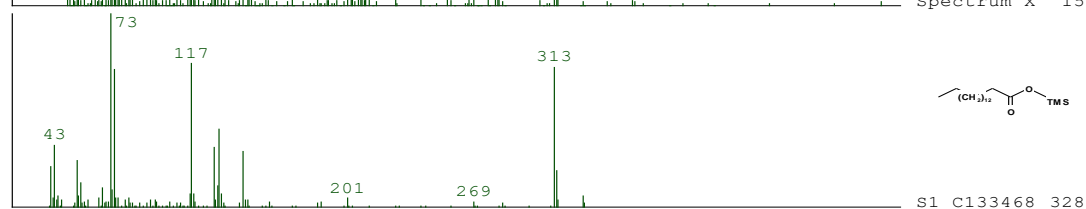
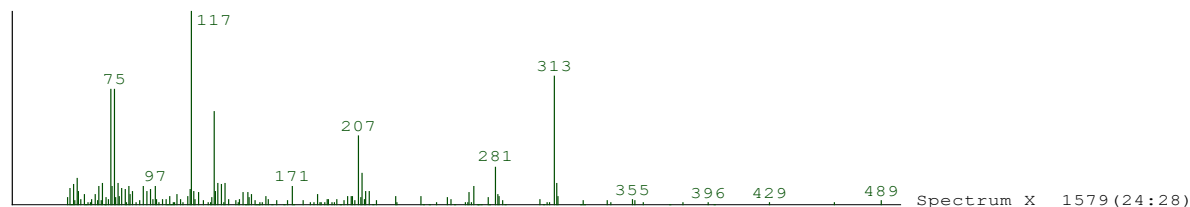


\*1

Pico nº 3 1579 TR (24:55) 24:2 tr,57%, M 396 NI



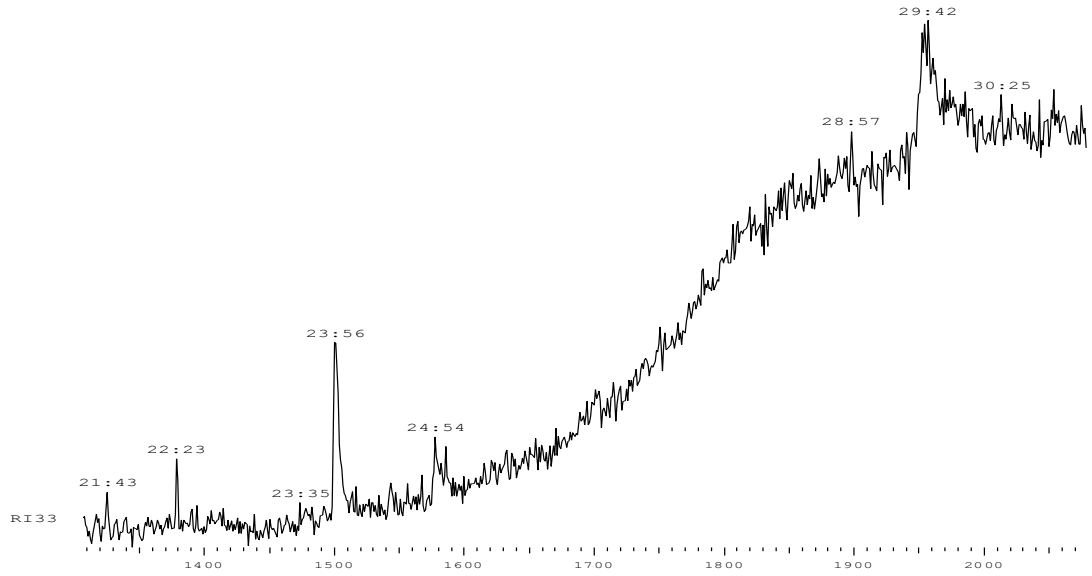
Identificação:



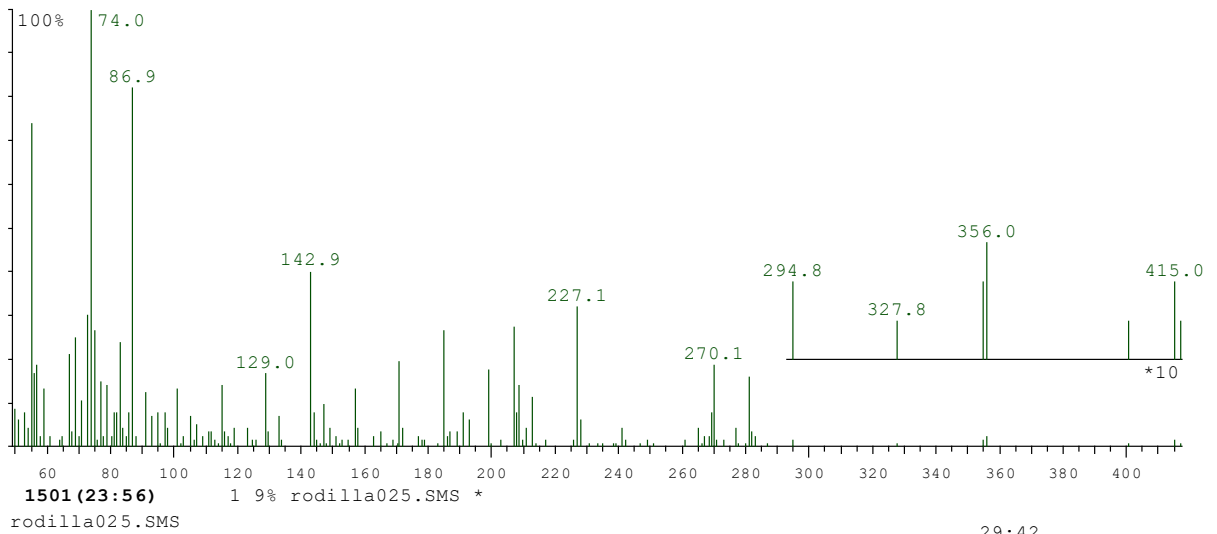
SISCOM [rodilla024.SMS] 1579(24:28) Libraries: V W V C Filter: 5 3 11 13 7 9

RS - 5 (AP - Clorofórmio, peso 0,000 ? mg). Cromatograma:

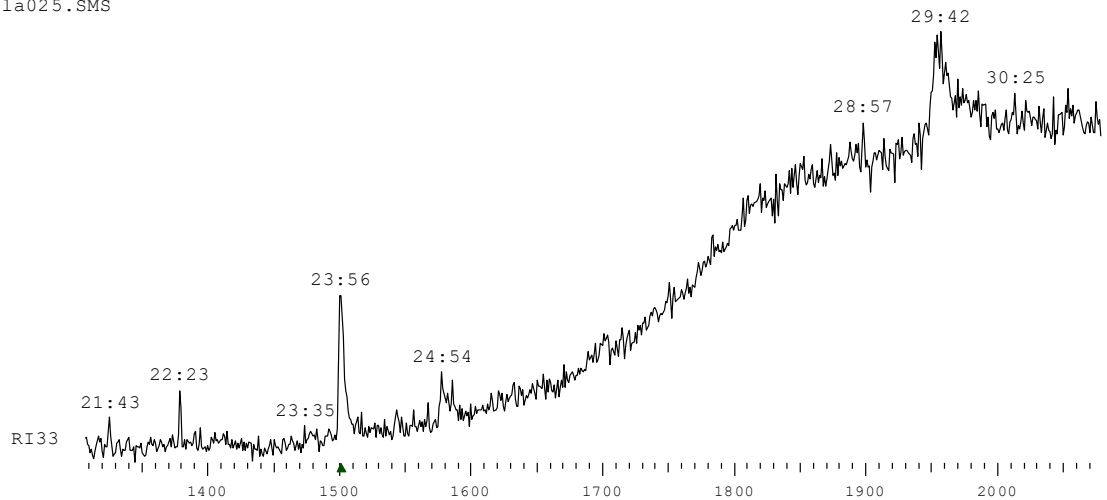
rodilla025.SMS \*  
MaxEO SumE1  
RI 2673 92257



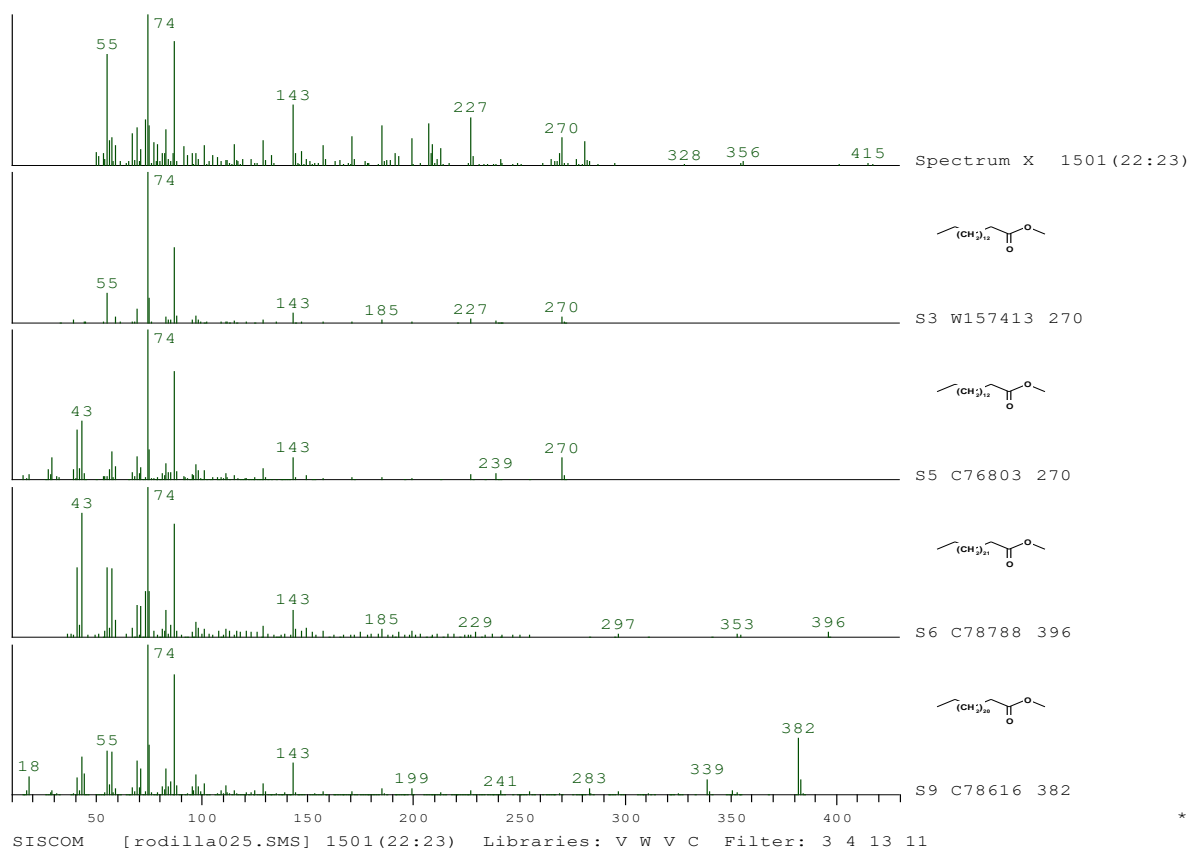
Pico nº 1 1501 TR (23:56) 23:2 tr,57%, M 270 hexadecanoato de metilo



1501 (23:56)  
rodilla025.SMS



Identificação:

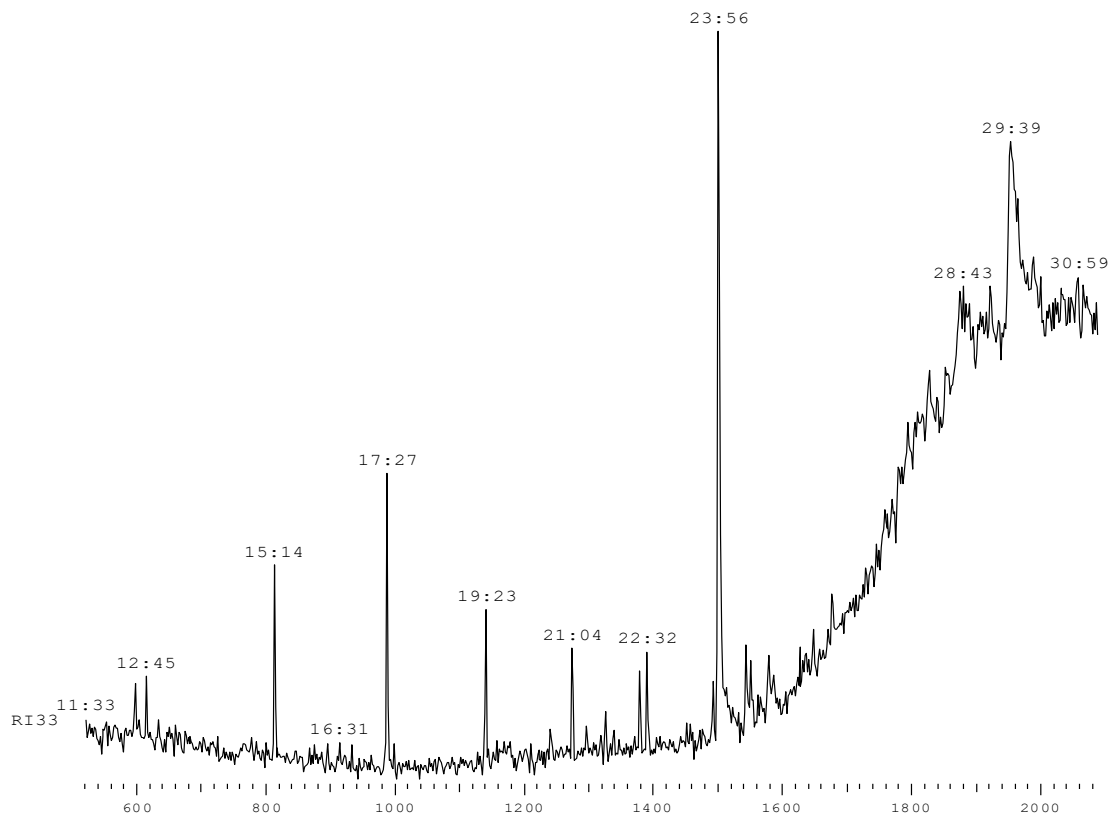


\*1

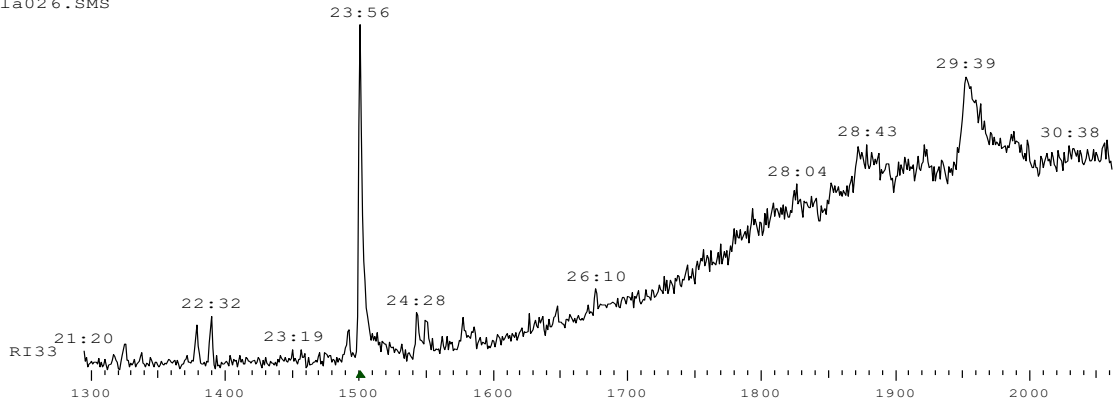
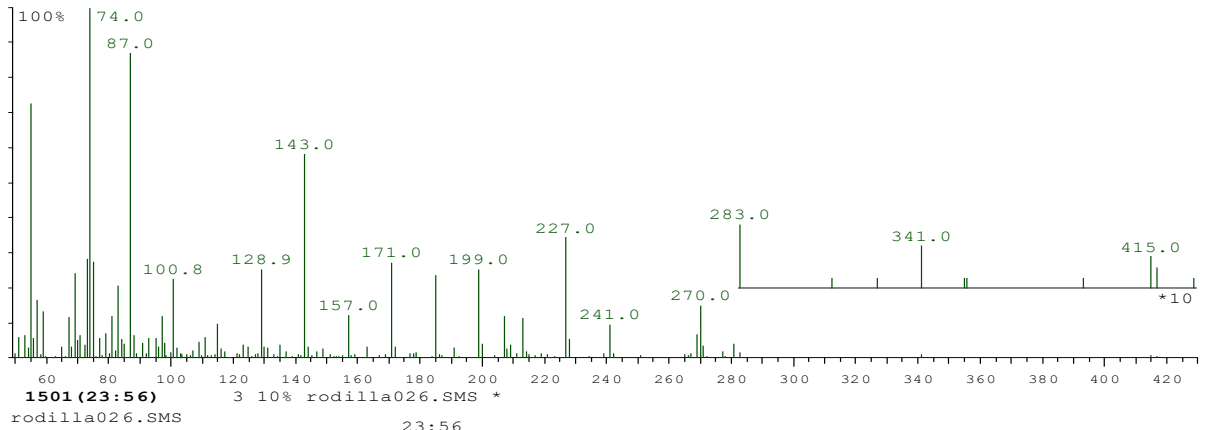
RS - 6 (AP - Metanol, peso 0,251 mg).

Cromatograma:

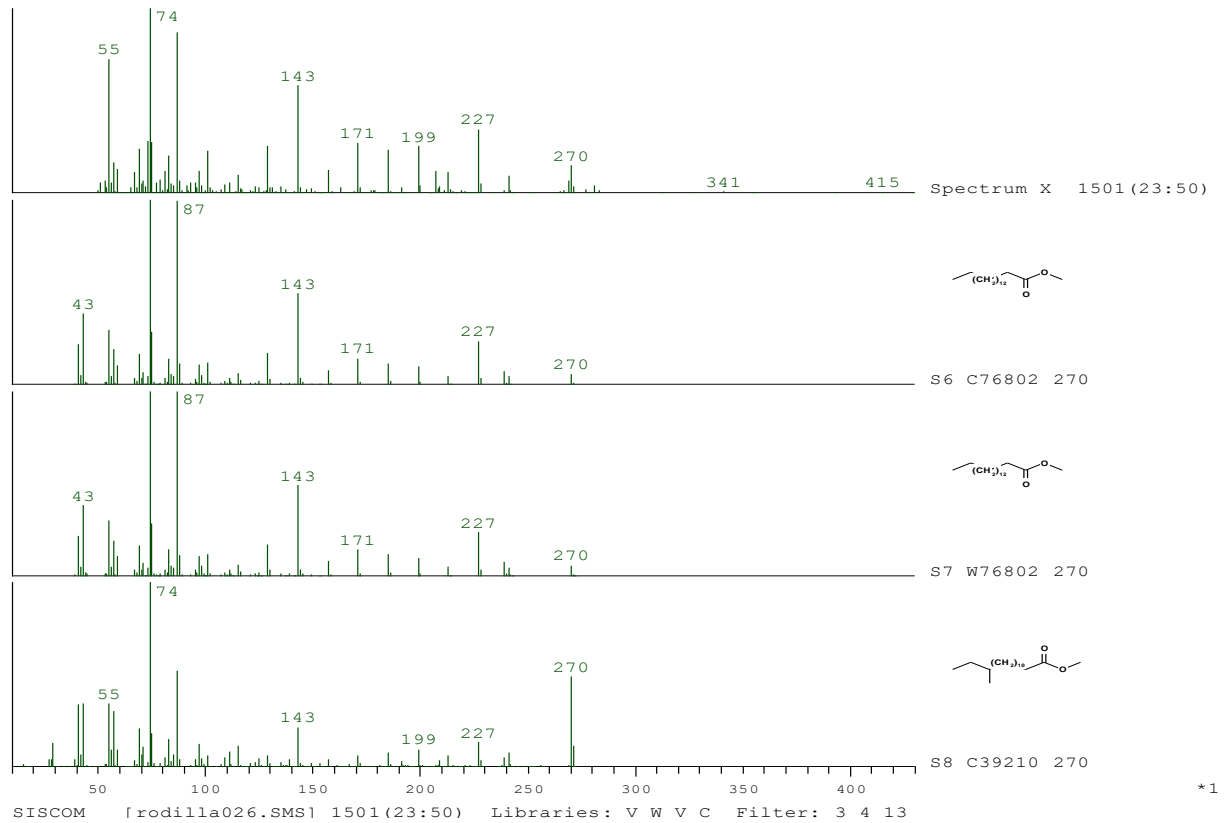
rodilla026.SMS \*  
MaxE0 SumE2  
RI 3259 12893



Pico nº 1 1501 TR (23:56) 23:2 tr,57%, M 270 hexadecanoato de metilo

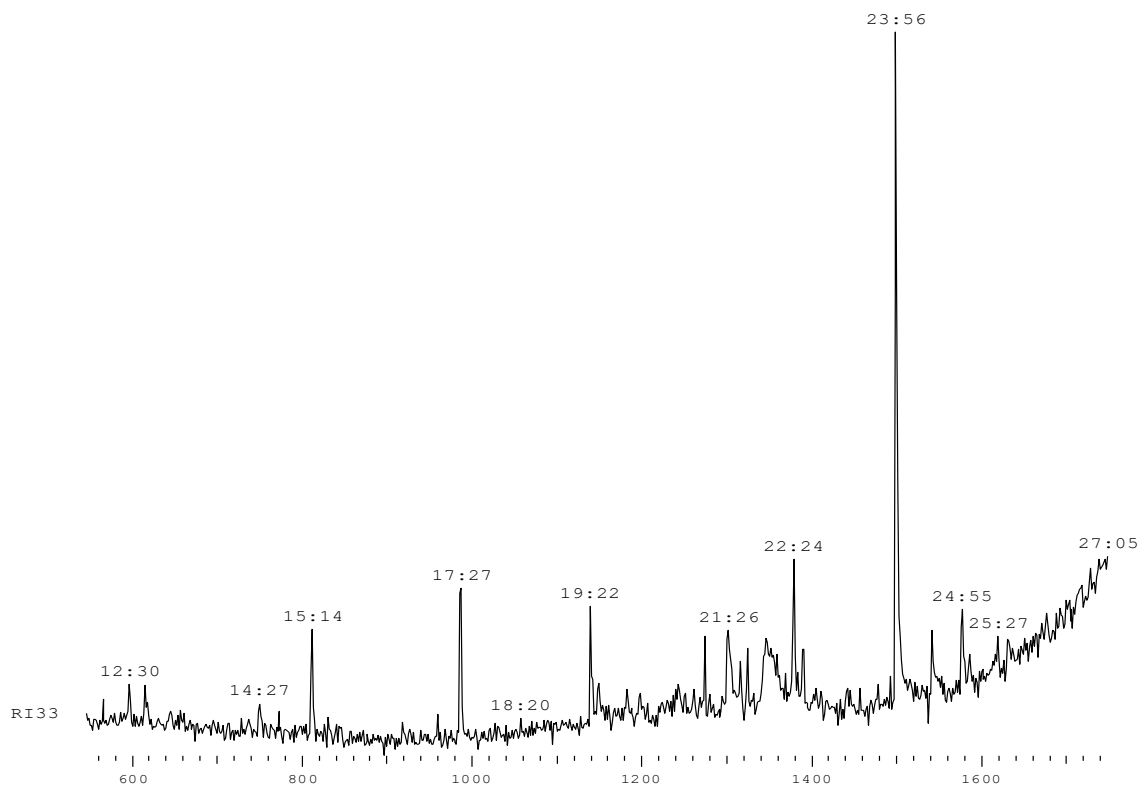


Identificação:

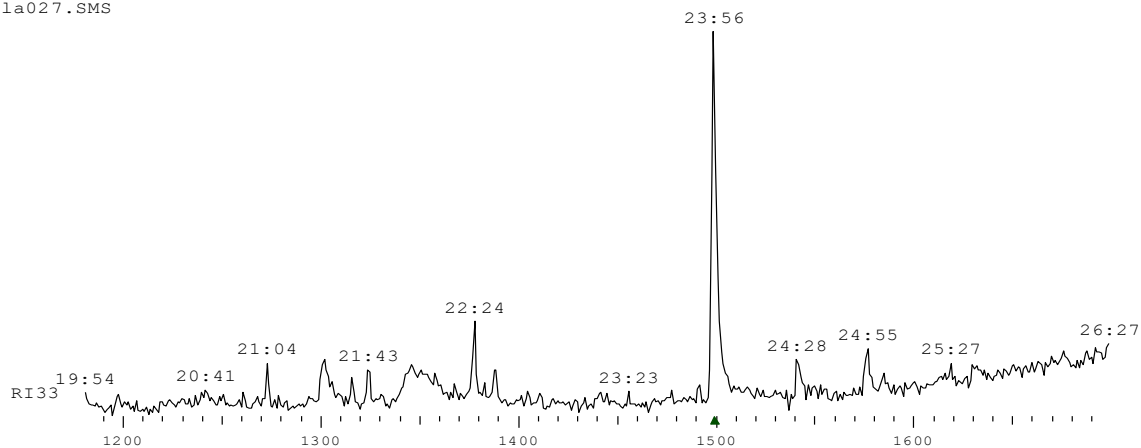
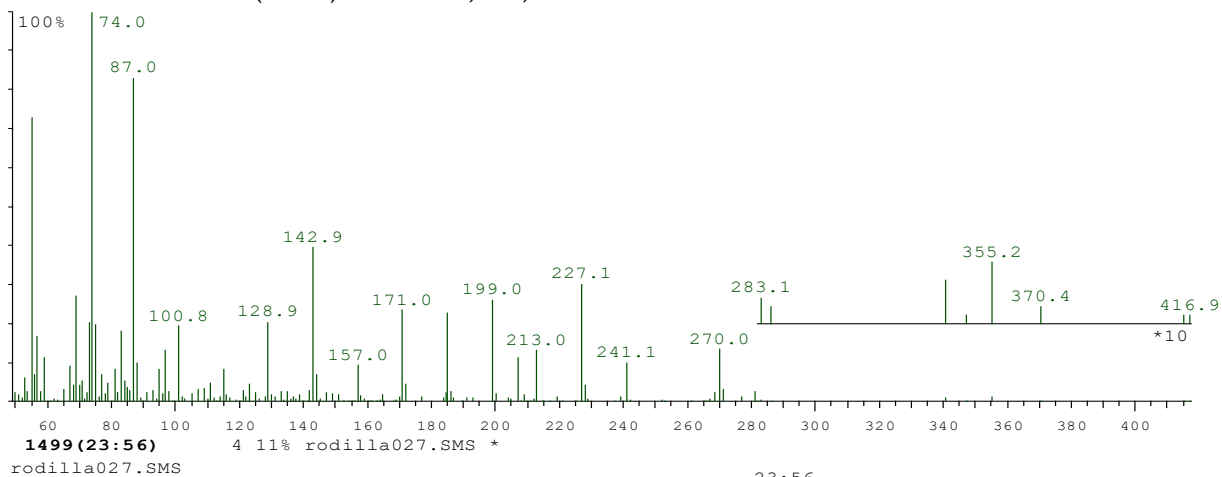


RS - 7 (24000 - Hexano, peso 0,232 mg). Cromatograma:

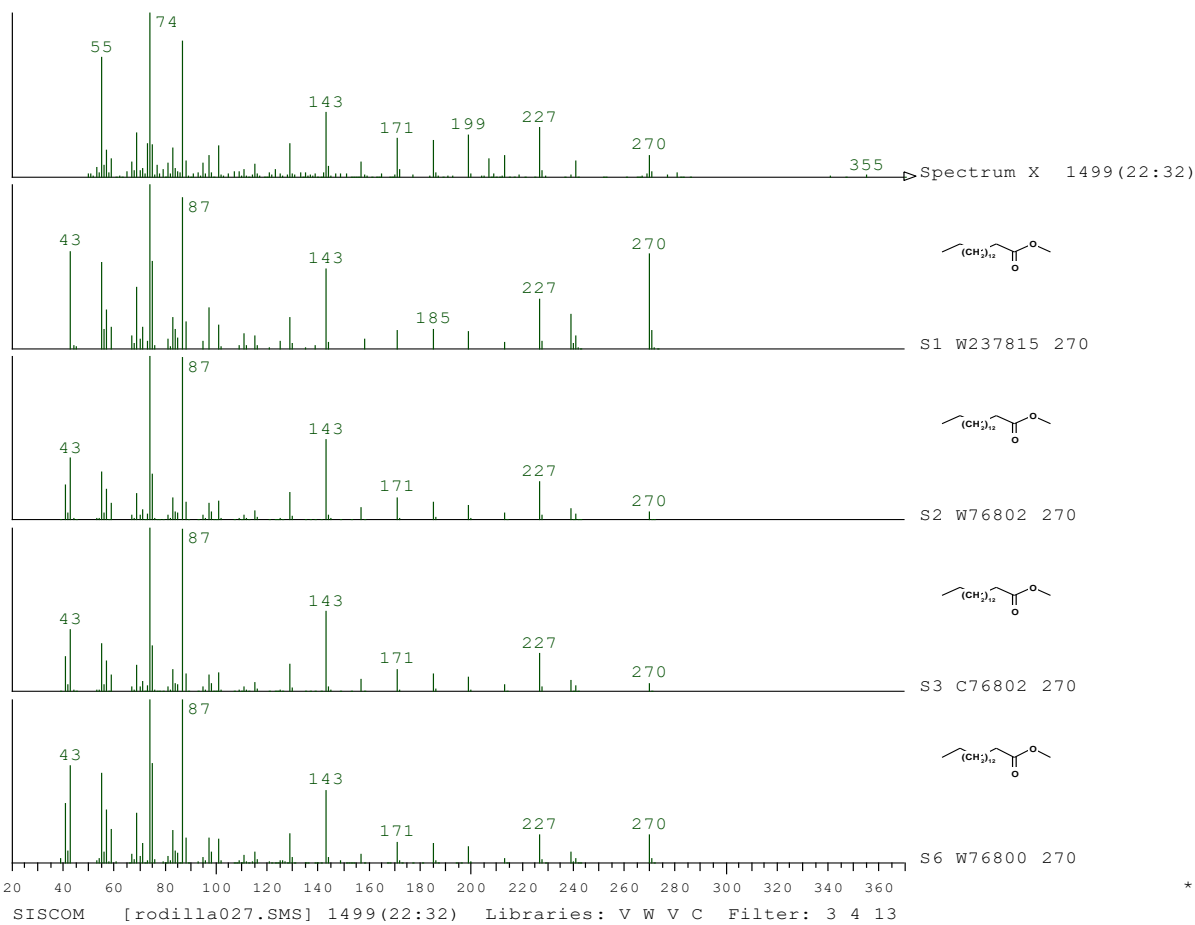
rodilla027.SMS \*  
MaxE0 SumE1  
RI 3956 70556



Pico n° 1 1499 TR (23:56) 23:2 tr,57%, M 270 hexadecanoato de metilo

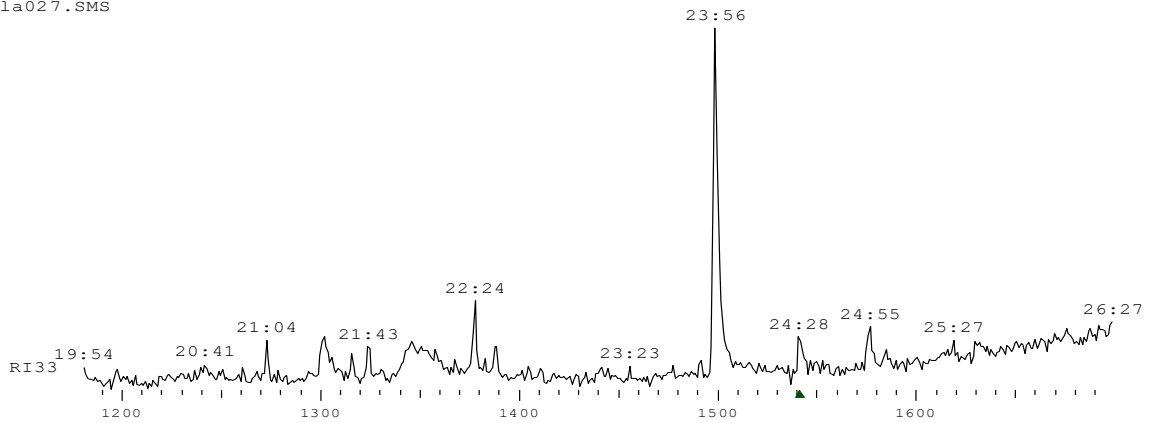
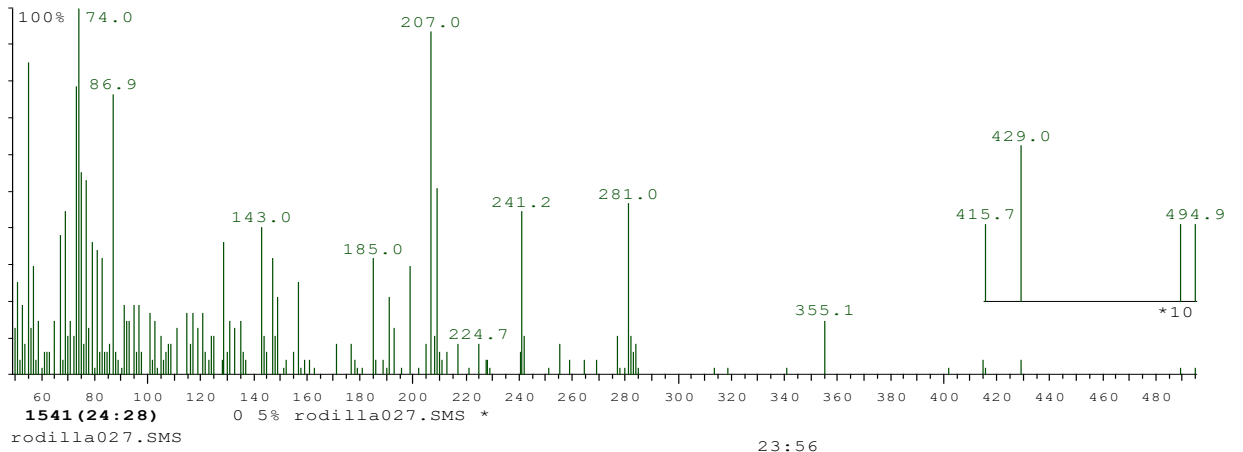


Identificação:

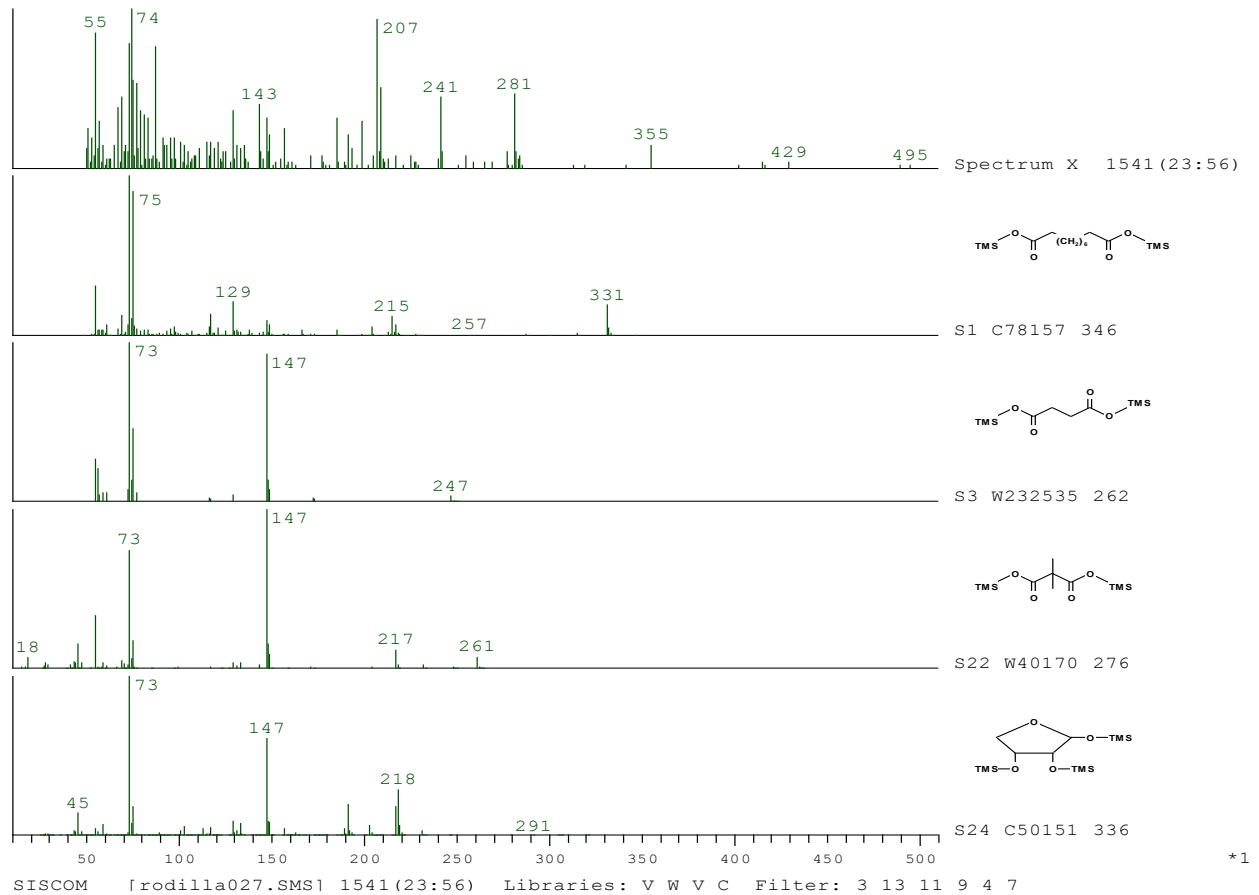


\*1

Pico nº 2 1541 TR (24:28) 24:2 tr,57%, M 282 NI



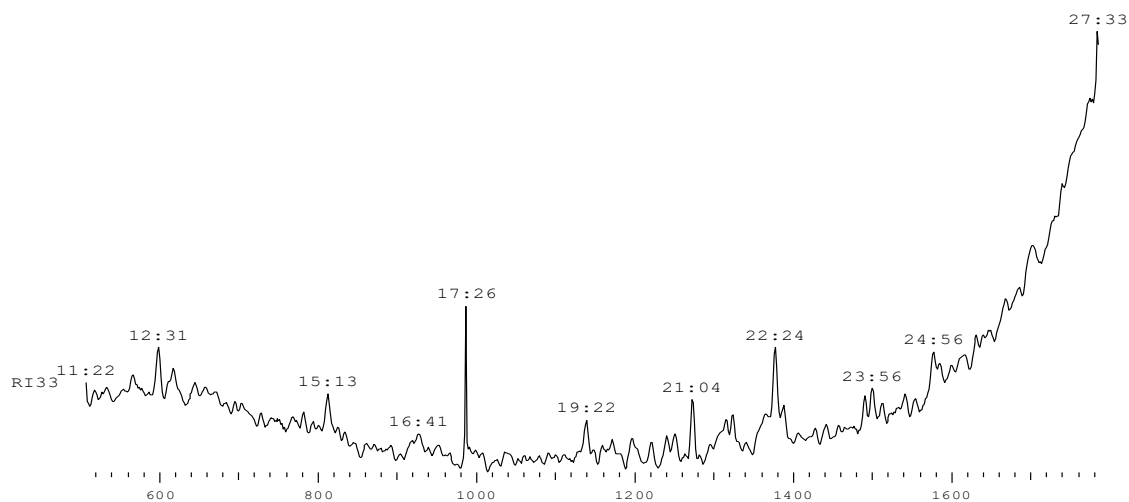
Identificação:



\*1

RS - 8 (24000 - Clorofórmio, peso 0,061 mg). Cromatograma:

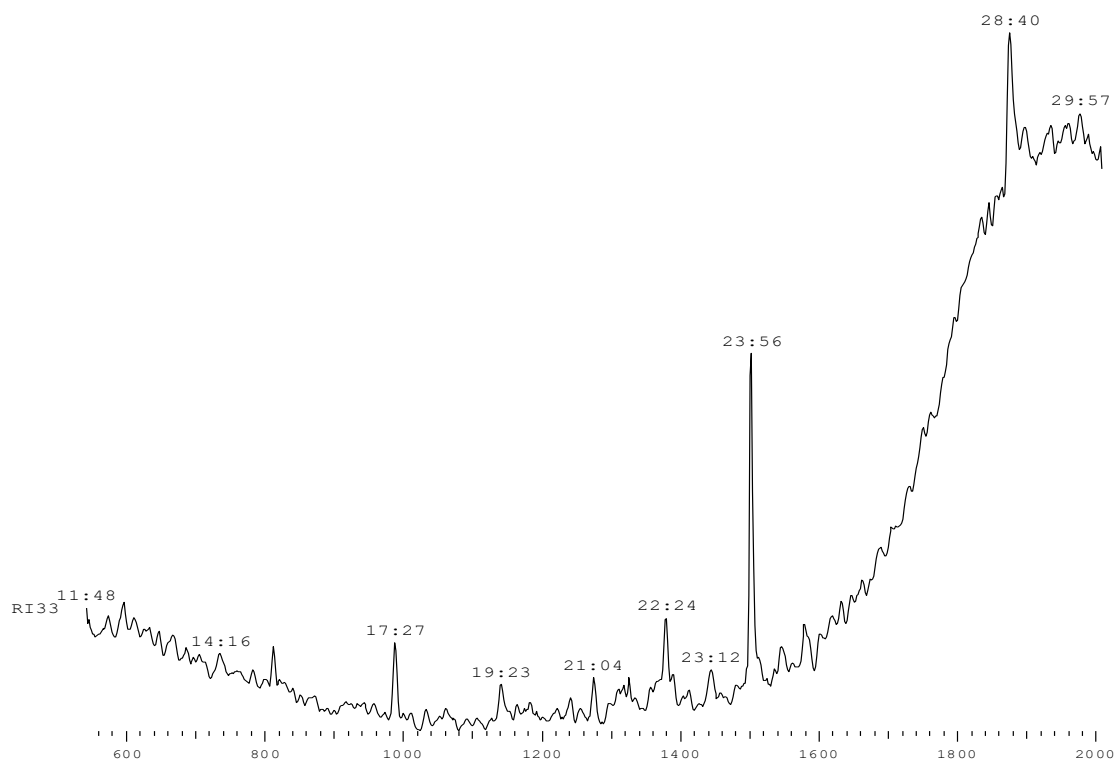
rodilla028.SMS \*  
MaxE0 SumE1  
RI 1578 69756



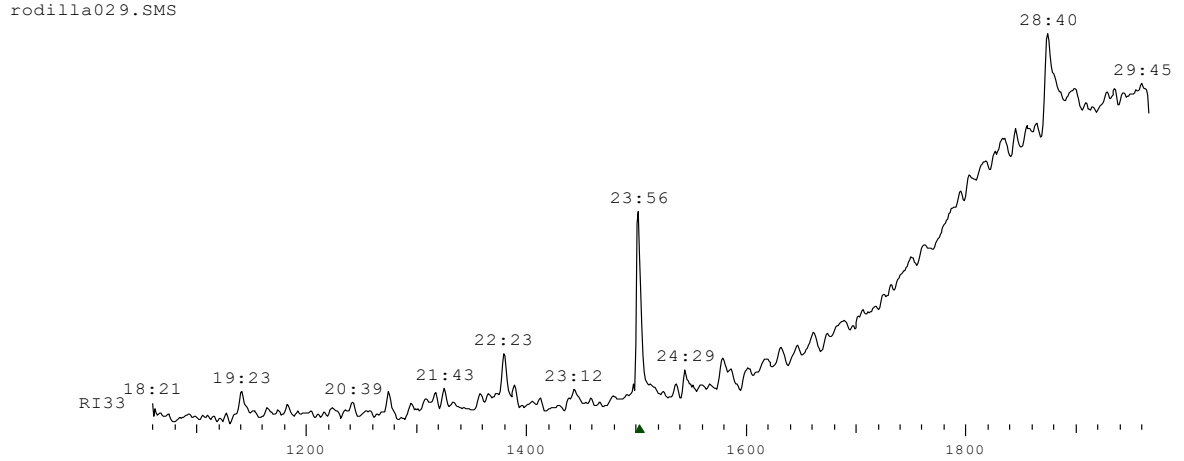
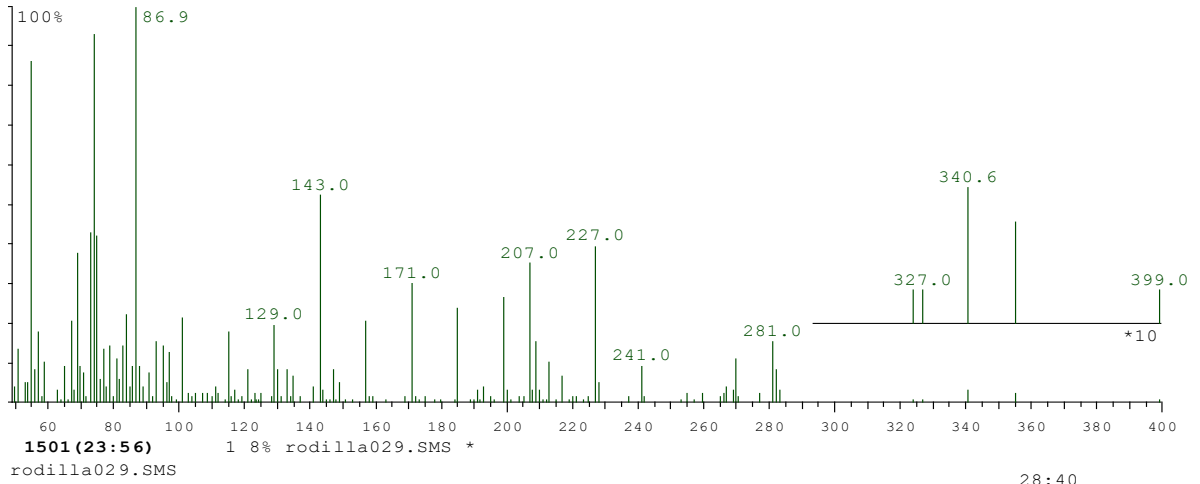
Não tem sinais

RS - 9 (24000 - Metanol, peso 0,160 mg). Cromatograma:

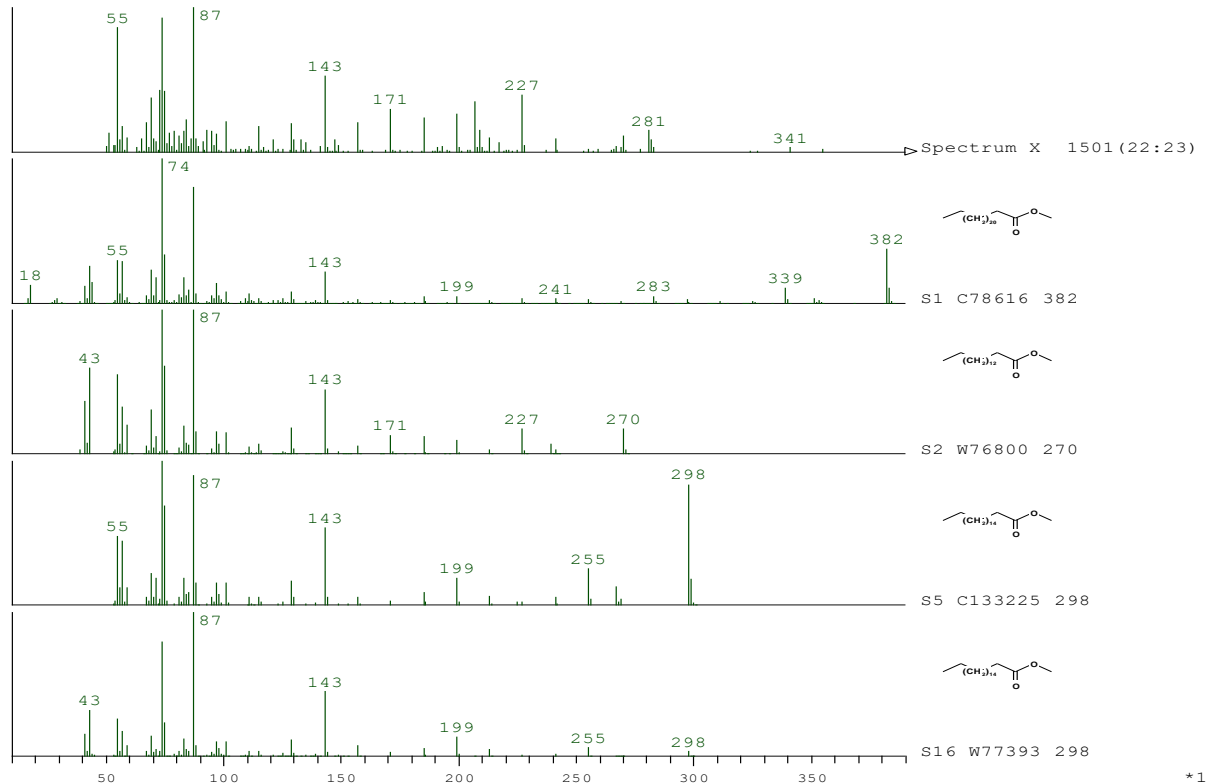
rodilla029.SMS \*  
MaxE0 SumE2  
RI 2393 11793



Pico nº 1 1501 TR (23:56) 23:2 tr,57%, M 270 mistura

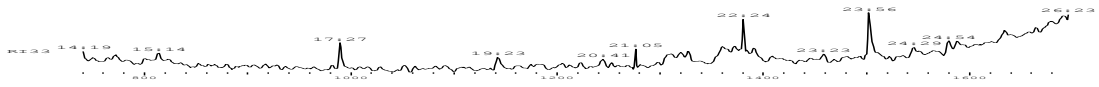


**Identificação:**

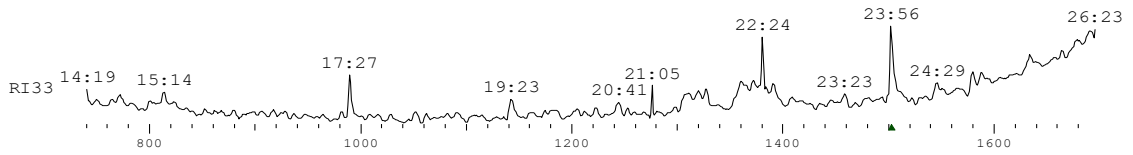
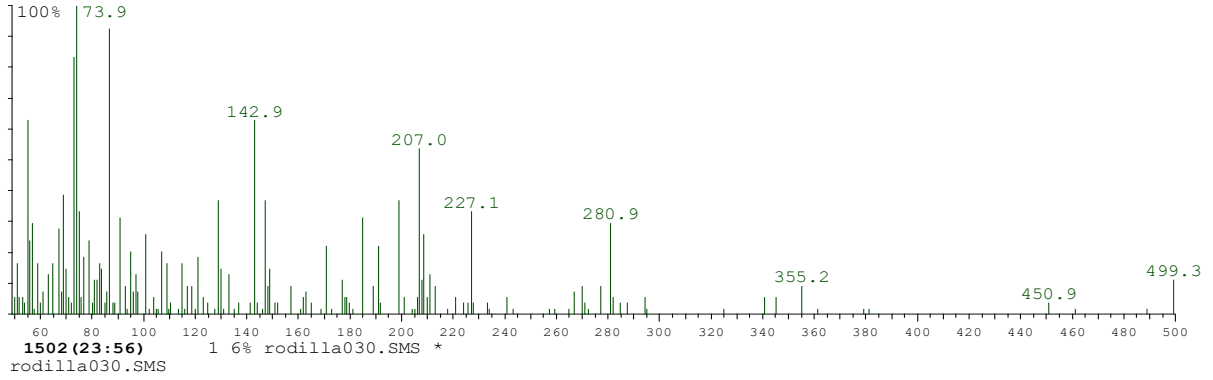


SISCOM [rodilla029.SMS] 1501 (22:23) Libraries: V W V C Filter: 3 13 4 11  
RS - 10 (10000 - Hexano, peso 0,108 mg). Cromatograma:

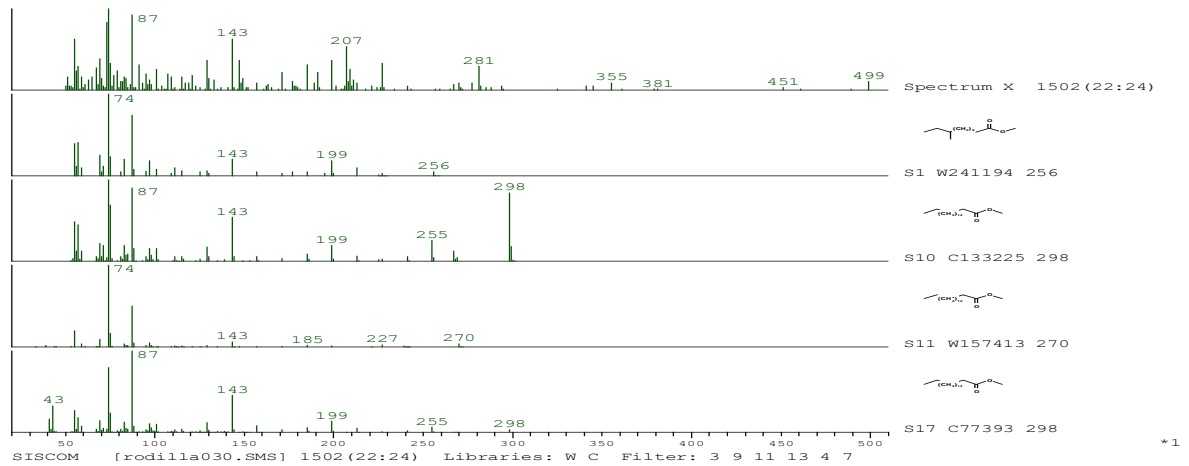
rodilla030.SMS \*  
RT 1502.23



Pico nº 1 1502 TR (23:56) 23:2 tr,57%, M 280 mistura (hexadecanoato de metilo)

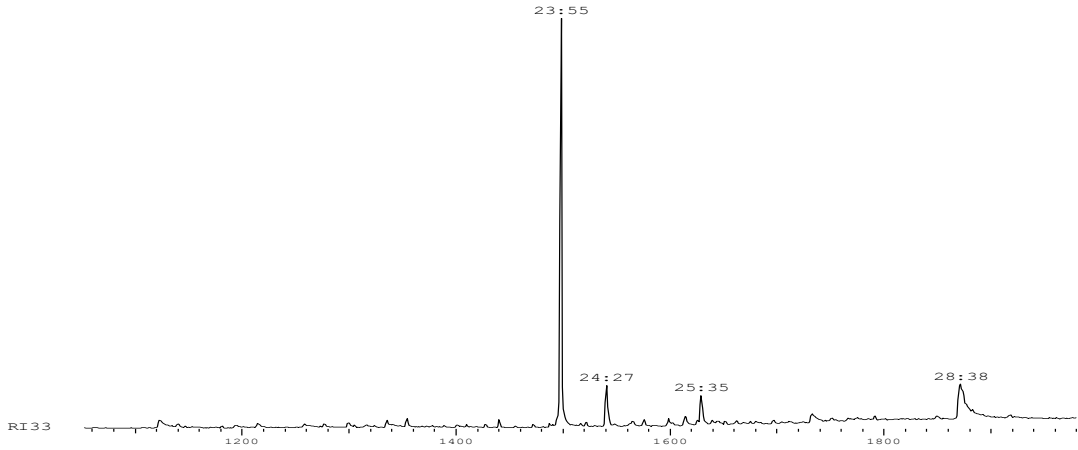


### Identificação

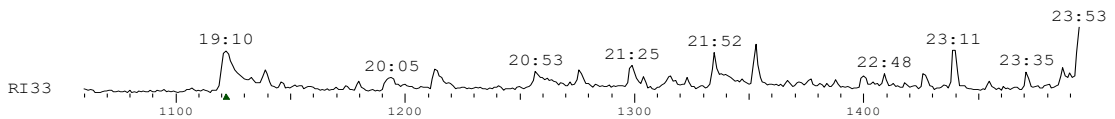
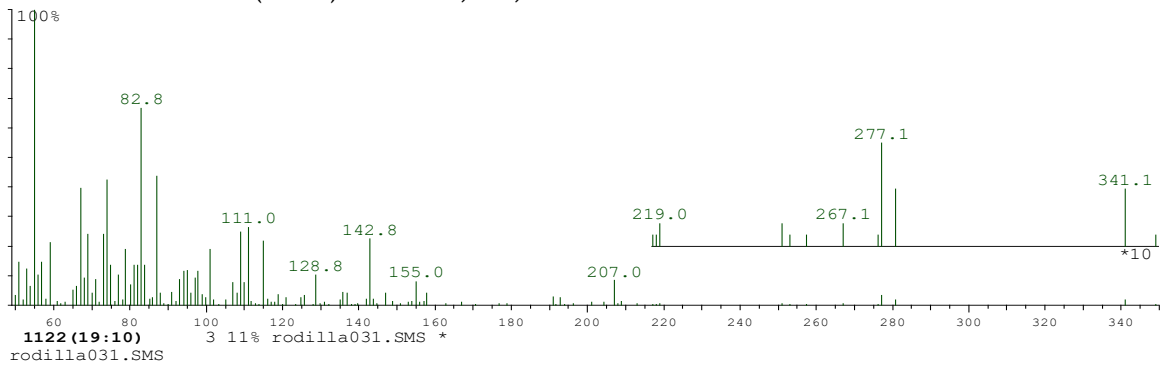


RS - 11 (10000 - Clorofómio, peso 0,092 mg). Cromatograma:

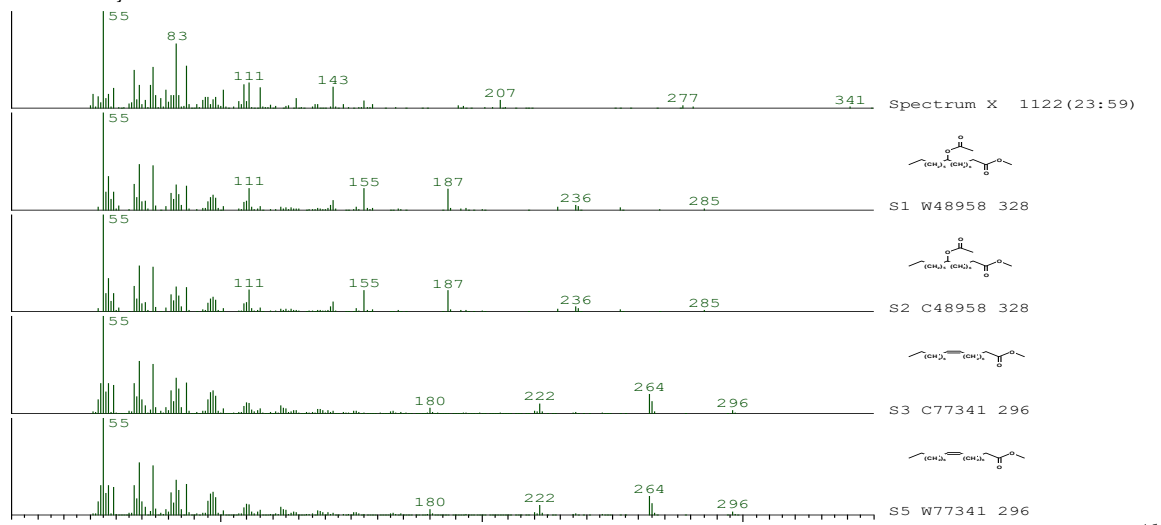
rodilla031.SMS \*  
 MaxEO SumE2  
 RI 85959 16950



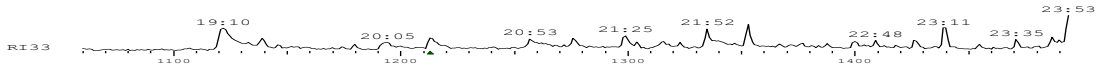
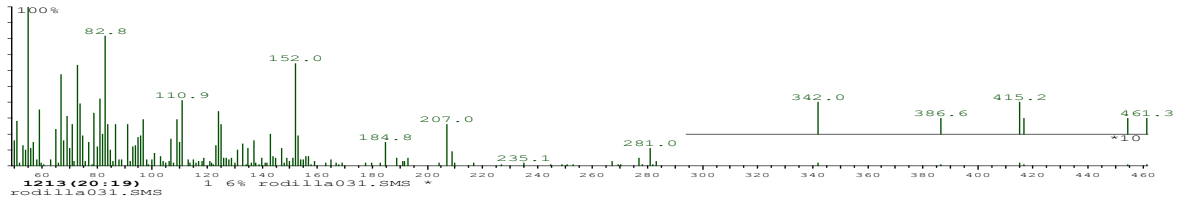
Pico nº 1 1122 TR (19:10) 19:2 tr,57%, M 270 mistura



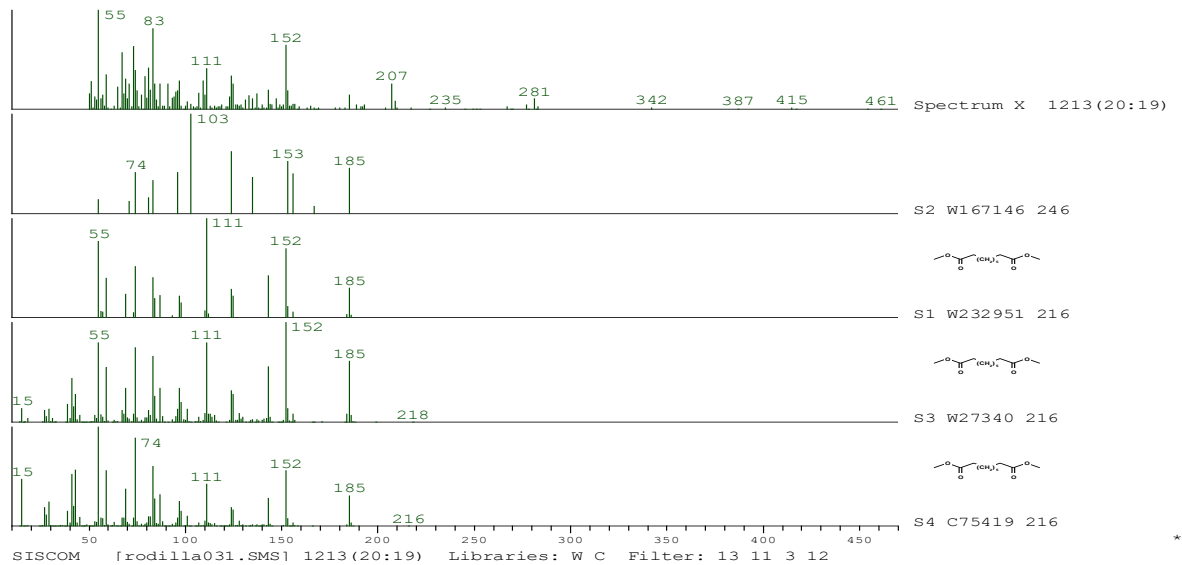
Identificação:



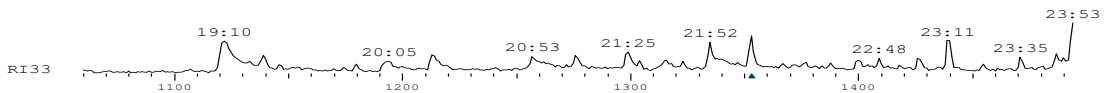
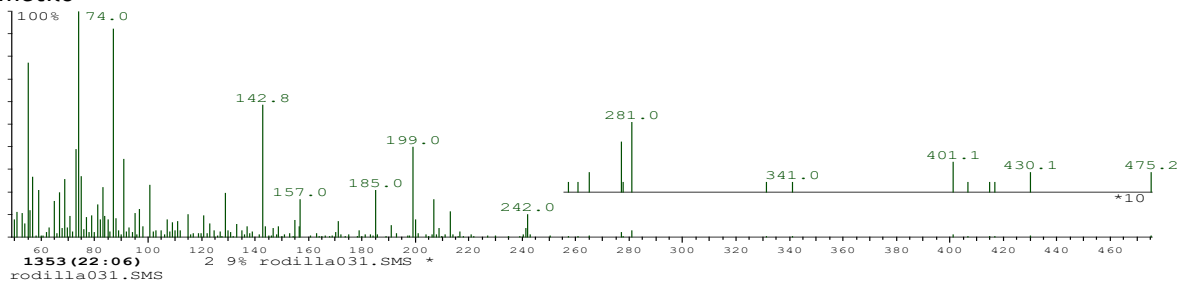
Pico nº 2 1213 TR (20:19) 20:2 tr,57%, M 216 nonanodioato de dimetilo



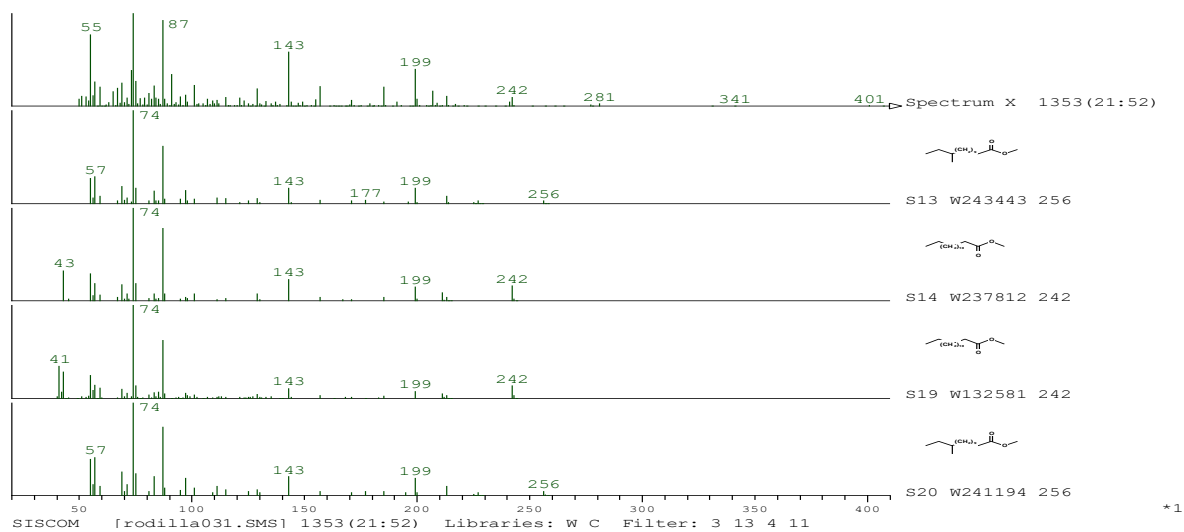
Identificação:



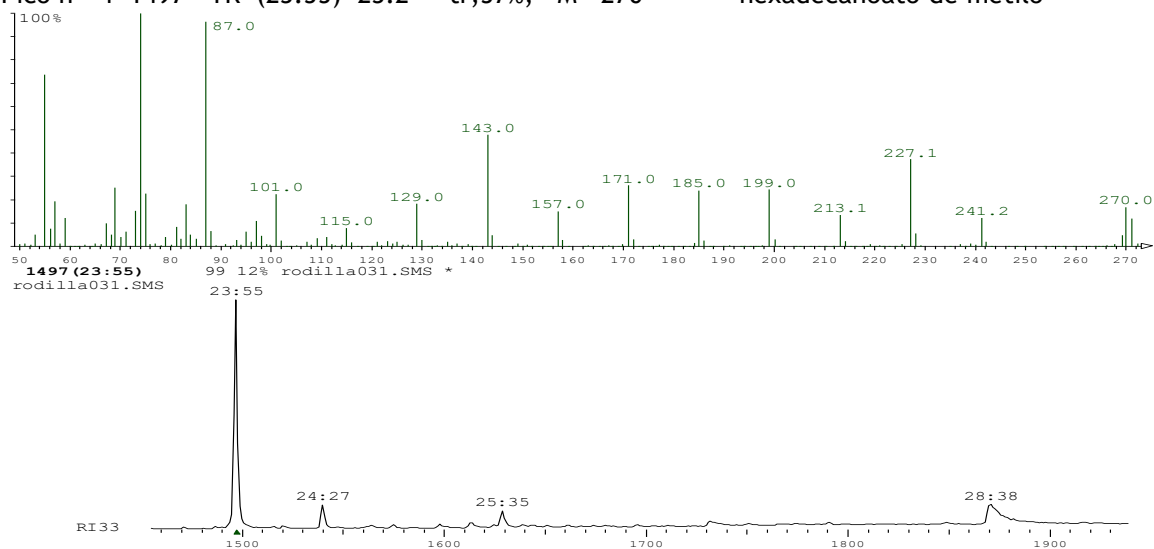
Pico nº 3 1353 TR (22:06) 22:2 tr,57%, M 242 12-metiltetradecanoato de metilo



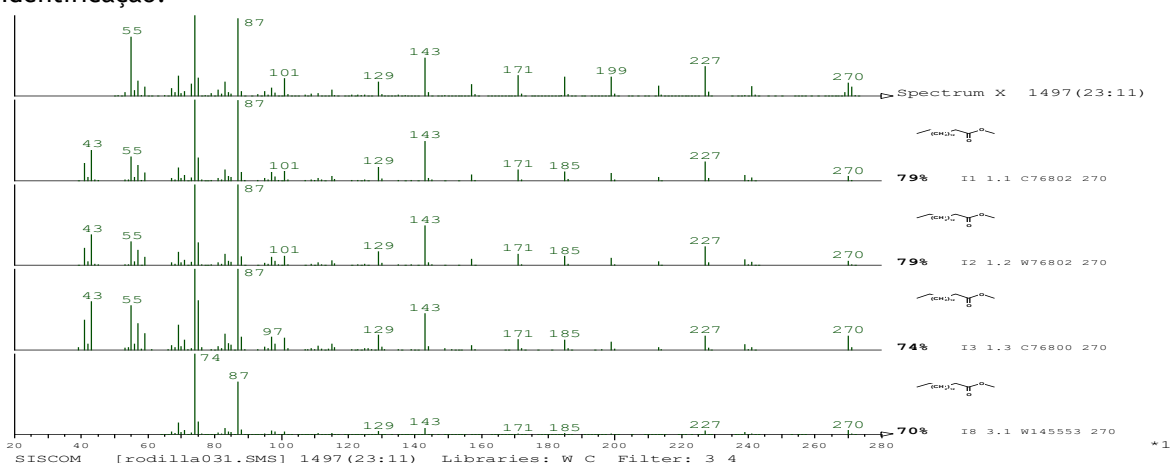
Identificação:



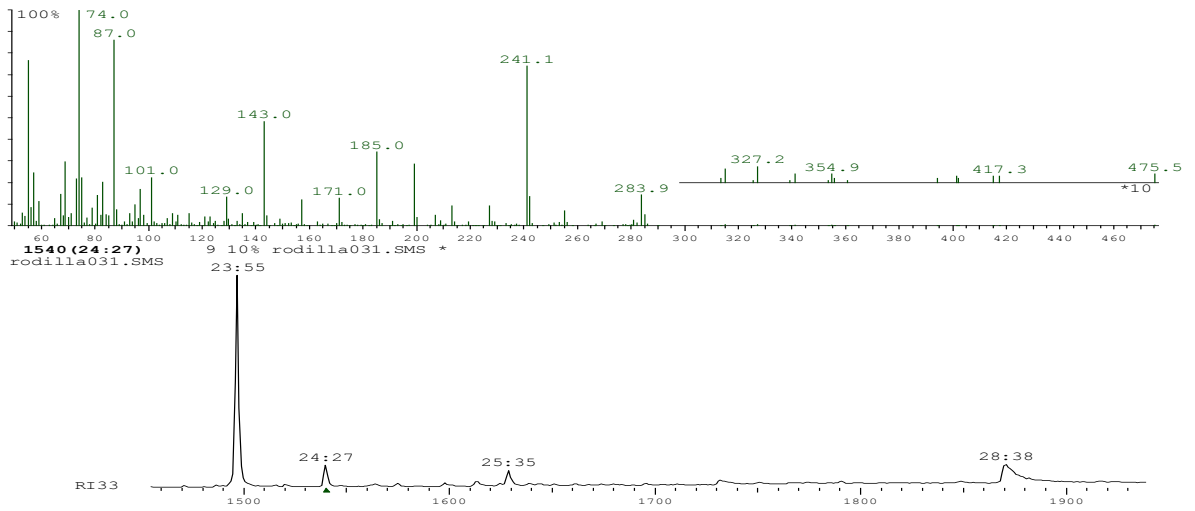
Pico nº 4 1497 TR (23:55) 23:2 tr,57%, M 270 hexadecanoato de metilo



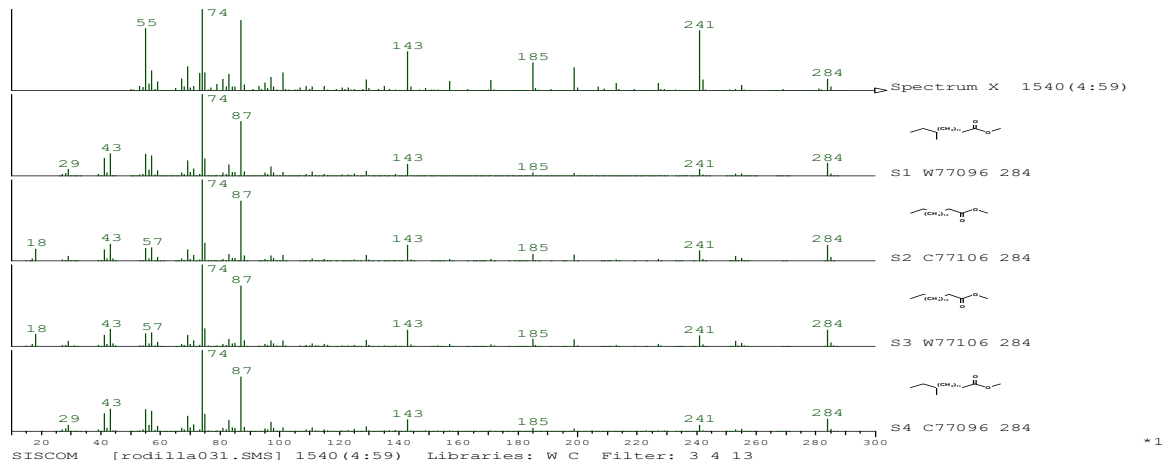
Identificação:



Pico nº 5 1540 TR (24:27) 24:2 tr,57%, M 284 heptadecanoato de metilo

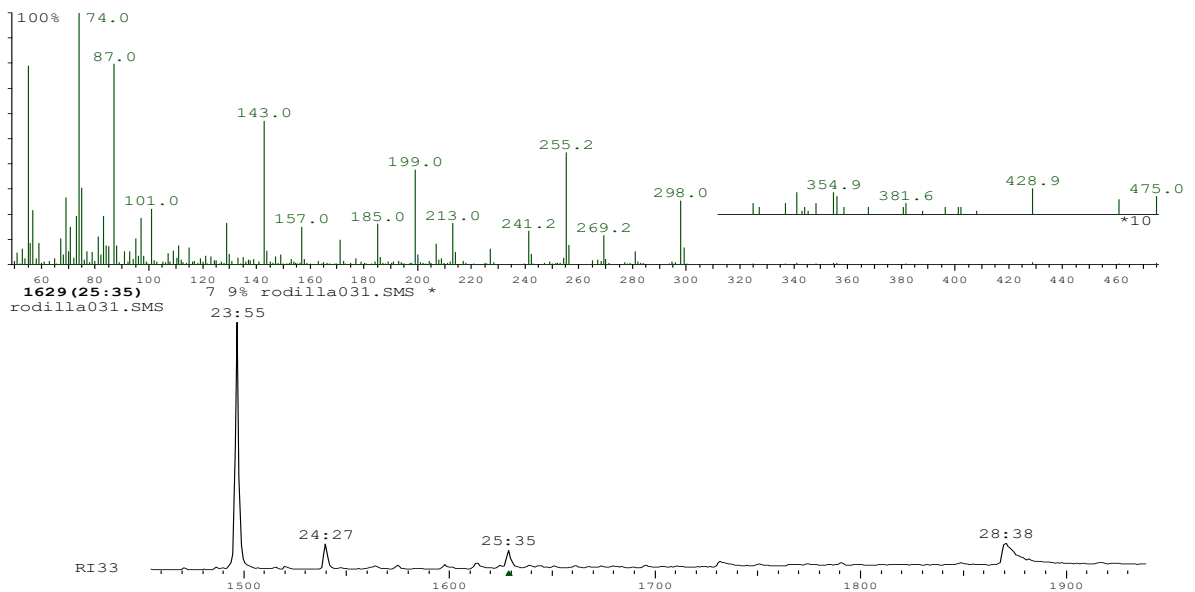


Identificação:

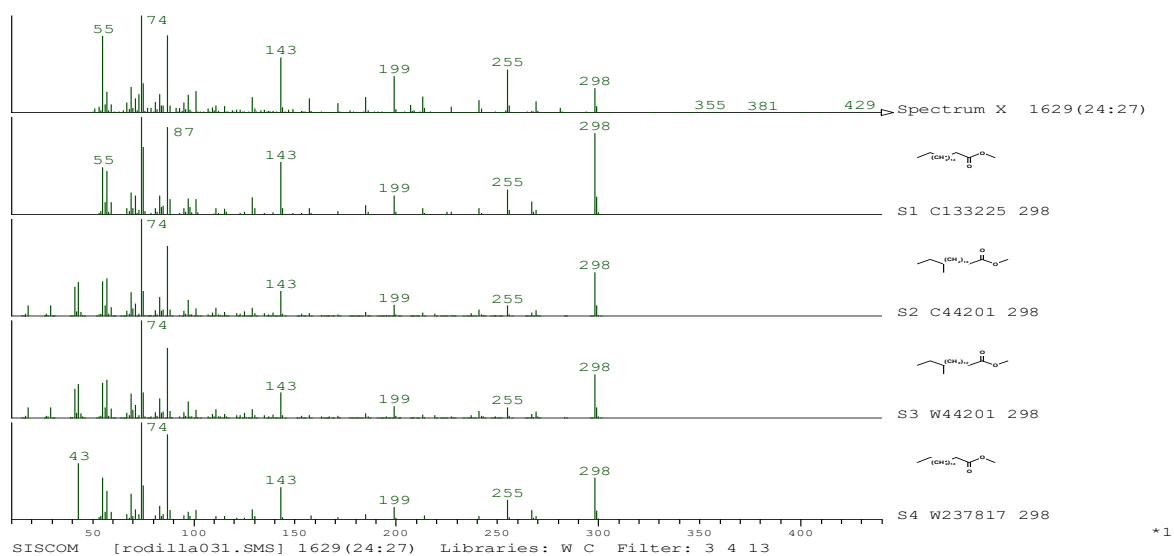


Pico nº 6 1629 TR (25:35) 25:2 tr,57%, M 298

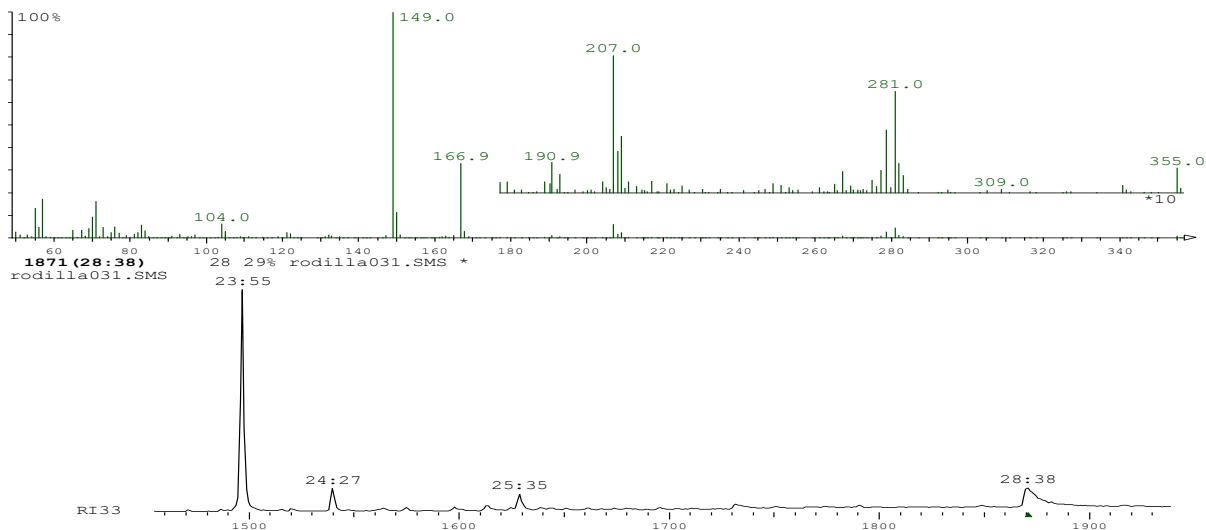
octadecanoato de metilo



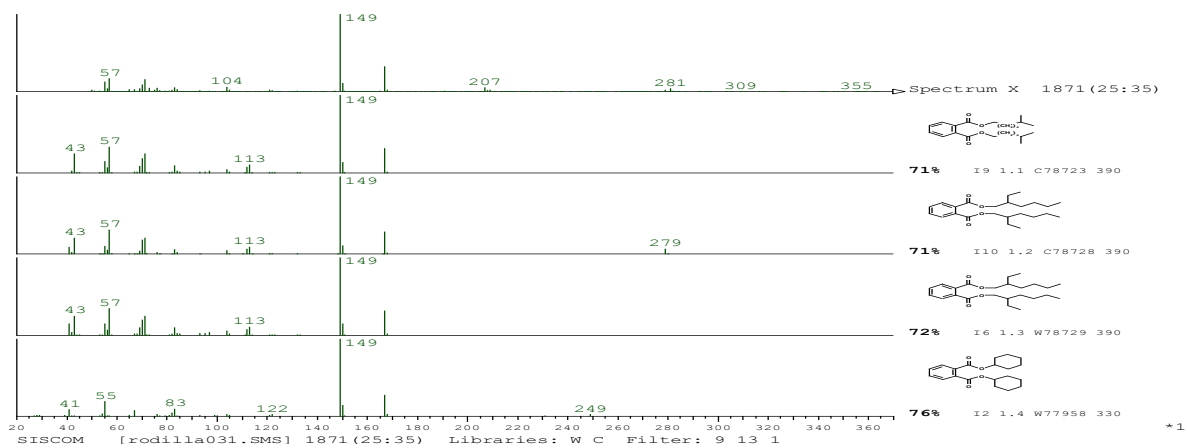
Identificação:



Pico nº 7 1871 TR (28:38) 28:2 tr,57%, M 298 ftalato de diisooctilo



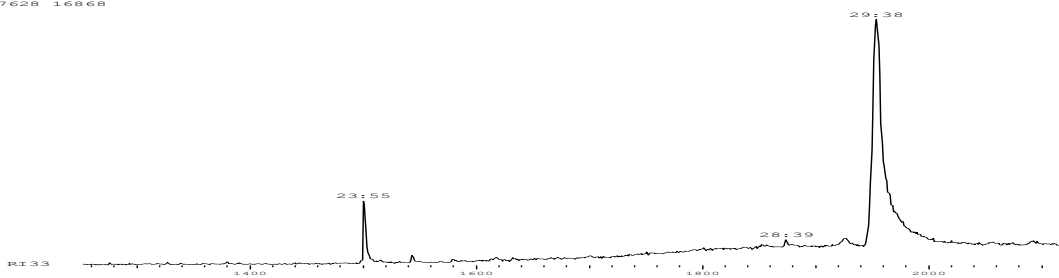
Identificação:



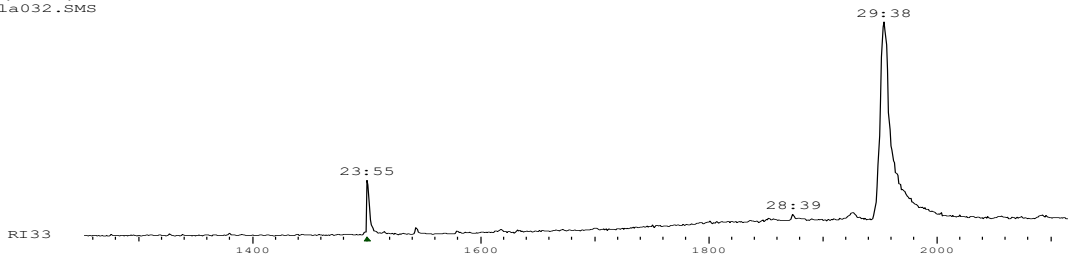
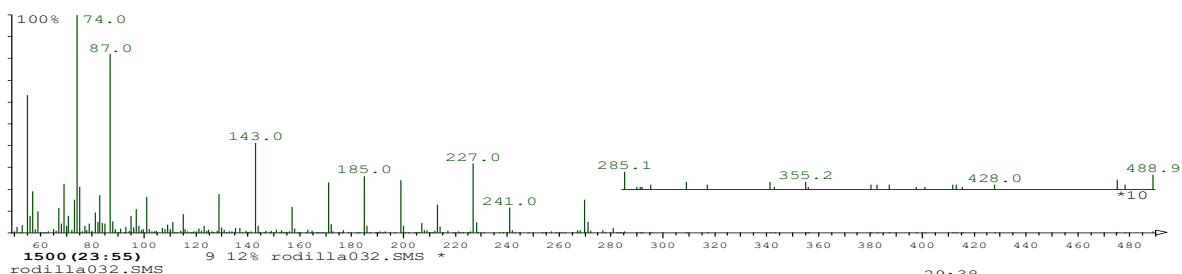
RS - 12 (1000 - Metanol, peso 0,368 mg).

Cromatograma:

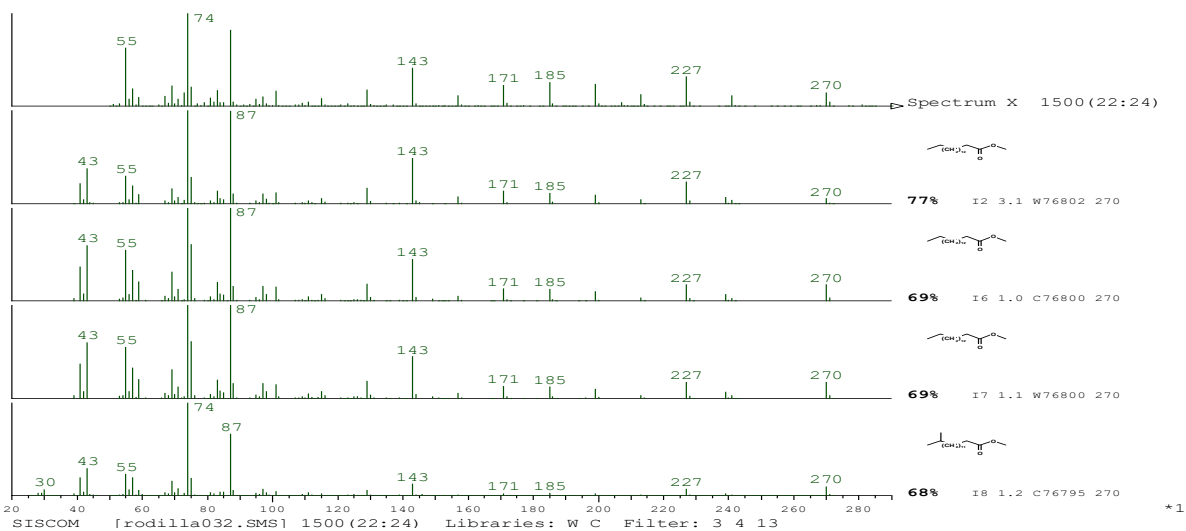
rodilla032.SMS  
M=550 SumE2  
RI 27628 16868



Pico nº 1 1500 TR (23:55) 23:2 tr,57%, M 270 hexadecanoato de metilo



Identificação:



Pico nº 2 1953 TR (29:38) 29:2 tr,57%, M 358 composto

ver

