



Universidade do Estado do Rio Grande do Norte – UERN
Programa de Pós-graduação em Ciências Naturais - PPGCN
Mestrado em Ciências Naturais - MCN



ROSINERE FERREIRA DA COSTA REBOUÇAS

Estudo do Teor de Lipídios e Avaliação dos resíduos das Algas Marinhas: *Gracilaria caudata*, *Gracilaria birdiae*, *Gracilaria domingensis* para preparação de Biodiesel e Biofertilizante.

Mossoró - RN

2013

Rosinere Ferreira da Costa Rebouças

Estudo do Teor de Lipídios e Avaliação dos resíduos das Algas Marinhas: *Gracilaria caudata*, *Gracilaria birdiae*, *Gracilaria domingensis* para preparação de Biodiesel e Biofertilizante.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte – UERN, área de concentração: Recursos Naturais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga de Oliveira Matias

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz di Souza

Mossoró - RN

2013

Catlogação da Publicação na Fonte.

Universidade do Estado do Rio Grande do Norte.

Rebouças, Rosinere Ferreira da Costa.

Estudo do Teor de Lipídios e Avaliação dos resíduos das Algas Marinhas: *Gracilaria caudata*, *Gracilaria birdiae*, *Gracilaria domingensis* para preparação de Biodiesel e Biofertilizante. / Rosinere Ferreira da Costa Rebouças. – Mossoró, RN, 2013.

78 f.

Orientador(a): Prof. Dr. Luiz Gonzaga de Oliveira Matias

Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais). Universidade do Estado do Rio Grande do Norte. Programa de Pós-graduação em Ciências Naturais

Bibliotecária: Elaine Paiva de Assunção CRB 15 / 492

Ofereço este trabalho à minha família, em especial a Maria Júlia (filha), Francisca (mãe) e Alexandre (esposos), pelo apoio, amor e dedicação que foram fundamentais nessa etapa importante da minha vida. Sem eles e sem Deus eu nada seria.

Agradecimentos

Este trabalho, não teria sido realizado se não fosse à ajuda de muitas pessoas, empresa e instituições, cujo conhecimento, incentivos, apoios e financiamentos foram de extrema importância.

Ao meu orientador, Prof^o. Dr. Luiz Gonzaga de Oliveira Matias, por ter acreditado em mim, pela paciência durante esses anos de trabalho e por ter me dado oportunidade de realizar uma pós-graduação.

Ao Prof^o. Dr. Dárlcio Inácio Alves Teixeira, pelas valiosas contribuições que me ajudaram a construir essa dissertação e por ter tornado realidade o cultivo de algas marinhas no litoral leste do Ceará.

Ao Banco do Nordeste do Brasil, pela bolsa e auxílios concedidos a esse projeto.

À Universidade Estadual do Rio Grande do Norte (UERN) e Departamento de Química, pela realização dos experimentos em laboratório, em especial, Adriano, Williane e Adriana.

Ao Prof. Dr. Luiz di Souza, o qual se dispôs a me aceitar como co-orientanda, com toda paciência, estando presente em todas as etapas desta dissertação.

Aos grandes amigos e companheiros de mestrado Anderson e Louise, pelos bons tempos de convivência e momentos de amizade nas contribuições com as disciplinas.

À Secretaria de Desenvolvimento e Meio Ambiente, SEDEMA, na pessoa de Francinildo e Mauro, pela compreensão das minhas ausências de trabalho durante esse mestrado.

A minha querida irmã e Professora de Português Rosiane, pela ajuda na escrita, pelos momentos de calma e perseverança, com suas incansáveis frases de estímulo: “Não desista!”;

Ao Projeto “Mulheres de Corpo e Alga”, por ter me ajudado em campo na coleta das algas marinhas, em especial a Leandra, por sempre estar disponível em contribuir com essa dissertação.

Ao Sr. Raimundo Sebastião da Silva, “Sêu Mundinho”, que com toda sua experiência de pescador, me ensinou que o saber popular é a base de orientação de toda pesquisa científica e pela ajuda em manter o cultivo de algas.

À Fundação Brasil Cidadão, na pessoa da Leinad, pelo incentivo, oportunidade e apoio em todo meu crescimento profissional e pessoal;

Ao meu grande amigo, o Prof^o. Jeovah Meireles pelas valiosas dicas de como fazer uma verdadeira pesquisa científica e pela sua busca incansável de conservar nossos ecossistemas costeiros, muito importantes para minha compreensão de ambientalista.

À minha família maravilhosa: Maria Júlia (filha), Alexandre (esposo), Francisca (mãe), Neri (pai), Aninha, Meirinha, Leninha (irmãs), Evandro e Edilson (irmãos), que sempre estiveram ao meu lado em todas as minhas decisões, nos momentos bons e ruins, por ter acreditado em minha capacidade de estudo e ter me deixado mais tranqüila para realização desse trabalho.

Muito obrigada!

**Tente ser uma pessoa de sucesso, mas efetivamente,
tente ser uma pessoa de valor.**

Albert Einstein

RESUMO

Estudos recentes mostram a presença de ácidos graxos em macroalgas direcionando a produção destas espécies para uma nova aplicação até então muito pouco explorada mundialmente como fonte de energia renovável. A motivação de se investir em biodiesel está relacionada, principalmente, ao conceito de desenvolvimento sustentável. Para isso, os aspectos sociais, econômicos e ambientais deverão estar equilibrados, permitindo sua viabilidade. Dentro destas exigências, os triglicerídeos, como óleos vegetais e animais, são consideradas alternativas viáveis para o desenvolvimento de biodiesel, principalmente por se tratarem de fontes renováveis, de grande variedade e fácil biodegradabilidade. Neste sentido, as algas apresentariam a vantagem de produzirem uma grande quantidade de matéria-prima em pouco tempo, devido ao seu rápido crescimento.

Este estudo teve como objetivo determinar a potencialidade do uso de derivados das algas *Gracilaria caudata*, *Gracilaria birdiae* e *Gracilaria dominigensis* na preparação de biodiesel e de biofertilizantes. Visando o uso na produção de biodiesel, foi determinado o teor de lipídios totais que elas apresentam e os seus perfis de ácidos graxos. Determinou-se também o teor de Nitrogênio (N), Fósforo (P) e Potássio (K) visando a possível aplicação em adubos (biofertilizantes) ou rações. O trabalho foi dividido em 3 etapas: uma realizada em campo, coleta de amostras do banco natural ou cultivado, limpeza, preparo e armazenamento correto e duas em laboratório, extração do óleo das macroalgas e caracterização do óleo extraído e do resíduo resultante.

Observou-se que mesmo sendo necessário usar uma grande quantidade de matéria-prima para obter os macronutrientes destinados à produção de biofertilizantes, principalmente N, P e K, o objetivo da pesquisa é usar apenas as algas recolhidas pela comunidade, ou seja, os resíduos que não teriam nenhuma utilidade, após a extração de ágar necessário para a fabricação de cosméticos e alimentos.

O presente trabalho mostra que os lipídios de macroalgas podem ser uma matéria-prima adequada para a produção de biodiesel. Os reagentes clorofórmio/metanol, um dos sistemas de extração utilizados apresentaram maior rendimento lipídico entre os processos estudados. Portanto, seria o mais indicado para a extração. Assim, a extração de lipídios de macroalgas para a produção de biodiesel é tecnicamente viável, o que representa um ponto de partida para mais estudos destinados a avaliar o desenvolvimento deste processo em uma escala industrial.

Palavras-chave: Macroalgas – Biodiesel - Biofertilizante

ABSTRACT

Recent studies show the presence of fatty acids in macroalgae directing the production of these species to a new application until now little explored worldwide, as a source of renewable energy. The motivation to invest in biodiesel is mainly related to the concept of sustainable development. For this, the social, economic and environmental issues should be balanced, allowing its viability. Within these requirements, triglycerides, vegetable oils and animal, are considered viable alternatives for the development of biodiesel, mainly because they are renewable sources of variety and easy biodegradability. In this sense, the algae would present the advantage of producing a large amount of raw material in a short time, due to its rapid growth.

This study aimed to determine the potential use of derivatives algae *Gracilaria caudata*, *Gracilaria birdiae* and *Gracilaria dominigensis* in the preparation of biodiesel and bio-fertilizers. Aiming use in biodiesel production was determined total lipid content they present and their fatty acid profiles. It was also determined the levels of Nitrogen (N), Phosphorus (P) and Potassium (K) with the aim of possible application in fertilizers (biofertilizers) or rations. The work was divided into three stages: one performed in the field sampling bank natural or cultivated, cleaning, preparation and correct storage; and two laboratorial, Oil Extraction and Characterization of macroalgae oil extracted and the resulting bagasse.

It was observed that though it is necessary to use a large amount of raw material for the macronutrients for the production of bio-fertilizers, especially N, P and K, the goal of research is to use only the algae collected by the community, which would have no waste utility, after extraction of agar necessary for the manufacture of cosmetics and food.

This study shows that the lipids of macroalgae may be a suitable raw material for the production of biodiesel. Reagents chloroform / methanol extraction of the systems used showed higher lipid between the processes studied. Therefore, it would be the most suitable for extraction. Thus, extraction of lipids macroalgae for biodiesel production is technically feasible, which represents a starting point for further studies designed to assess the development of this process on an industrial scale.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 01: O banco de algas Marinhas de Icapuí – CE _____	16
Figura 02: Localização do Banco de algas de Icapuí – CE _____	17
Figura 03: Estrutura do Cultivo de Algas em Icapuí – CE _____	18
Figura 04: Atividade de manutenção do Cultivo de Algas em Icapuí – CE _____	19
Figura 05: <i>Gracilaria caudata</i> _____	20
Figura 06: <i>Gracilaria birdiae</i> _____	21
Figura 07: <i>Gracilaria domingensis</i> _____	21
Figura 08: Reações envolvidas na transesterificação de uma molécula de Triacilglicerídeo	24
Figura 09: Reação global de transesterificação de uma molécula de Triacilglicerídeo _____	25
Figura 10: Reação global da esterificação _____	25
Figura 11 e 12: Horta Comunitária _____	29
Figura 13: Localização Geográfica do Cultivo de Algas _____	37
Figura 14: Sistema soxhlet utilizado para extração à quente do material lipídico _____	38
Figura 15: Fluxograma da obtenção do Resíduo 2 _____	45
Figura 16 e 17: Extração de Lipídios usando o Ultrassom _____	52
Figura 18: Espectro infravermelho da <i>G. caudata</i> _____	55
Figura 19: Espectro RMN da <i>G. caudata</i> _____	56
Figura 20: Espectro infravermelho da <i>G. birdiae</i> _____	57
Figura 21: Espectro RMN da <i>G. birdiae</i> _____	58
Figura 22: Espectro infravermelho da <i>G. domingensis</i> _____	59
Figura 23: Espectro RMN da <i>G. domingensis</i> _____	60

GRÁFICOS

Gráfico 01: Teor de lipídios extraídos das três macroalgas á quente e á frio _____	47
Gráfico 02: Teor de óleo extraído usando diferentes misturas de solventes _____	50
Gráfico 03: Extração de lipídios via ultrassom _____	52
Gráfico 04: Extração de lipídios via ultrassom _____	53
Gráfico 05: Umidade das macroalgas _____	60

Gráfico 06: Determinação do teor de Cinzas macroalgas em % _____	61
Gráfico 07: Determinação da matéria orgânica das macroalgas em % _____	61
Gráfico 08: Teor de Cinzas, Umidade e Matéria Orgânica das macroalgas em % _____	62
Gráfico 09: Análise de N e P _____	63
Gráfico 10: Análise de Potássio _____	63
Gráfico 11: Análise de Nitrogênio, Fósforo e Potássio _____	64
Gráfico 12: Análise de Nitrogênio, Fósforo e Potássio dos Resíduos _____	65

TABELAS

Tabela 01: Preparação de biodiesel de lipídios das macroalgas _____	54
Tabela 02: Taxa de Conversão das Macroalgas _____	55
Tabela 03: Quantidades de macronutrientes (Kg) necessários para produção de uma (1) tonelada de alface _____	65
Tabela 04: As quantidades de macronutrientes encontradas nas amostras de macroalgas foram _____	66
Tabela 05: Quantidades necessárias de “Resíduos” de algas para obtenção dos macronutrientes _____	66

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	15
1.1. ALGAS NO BRASIL	15
1.2. O BANCO DE ALGAS MARINHAS E FANERÓGAMAS DE ICAPUÍ	15
1.3. ESPÉCIES ALGAIS	19
1.4. ALGAS MARINHAS: POTENCIALIDADES ECONÔMICAS	21
1.5. CARACTERIZAÇÃO DOS MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE LÍPIDIOS	22
1.6. REAÇÕES DE OBTENÇÃO DO BIODIESEL	23
a) TRANSESTERIFICAÇÃO	23
b) ESTERIFICAÇÃO	25
c) HIDROESTERIFICAÇÃO	25
1.7. BIOFERTILIZANTES, ALIMENTOS E COMPONENTES QUÍMICOS	26
1.8. BIOFERTILIZANTES	27
1.9. CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS DAS MACROALGAS	28
1.9.1. RESÍDUOS 1	28
1.9.2. RESÍDUOS 2	29
2. OBJETIVO GERAL	29
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3. REVISÃO DA LITERATURA	30
3.1. AS MACROALGAS VERMELHAS	30
3.2. BIODIESEL	32
3.3. ALGAS MARINHAS E A AGRICULTURA	33
3.4. BIOFERTILIZANTES À BASE DE EXTRATO DE ALGAS	35
4. METODOLOGIA	36
4.1 COLETA DAS MACROALGAS	36
4.2 LAVAGEM DAS ALGAS	37
4.3 SECAGEM DAS ALGAS	37
4.4 EXTRAÇÃO DO ÓLEO DAS MACROALGAS	38
4.4.1 EXTRAÇÃO À QUENTE (VIA SOXHLET)	38
4.4.2 EXTRAÇÃO À FRIO (USO DE SOLVENTE)	38

4.5 ESTUDO SISTEMÁTICO PARA DETERMINAR O MELHOR MÉTODO DE EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DAS MACROALGAS _____	39
4.5.1 DICLOROMETANO: METANOL: ÁGUA, 50:25:10 POR 4H (ABD EL-MONEIM; M.R. AFIFY; E.A. SHALABY; S.M.M. SHANAB – 2010)_____	39
4.5.2 CLOROFORMIO: METANOL: ÁGUA, 50:25:10 POR 4H (GEMMA VICENTE, L.F. BAUTISTA; R. RODRIGUES; F.J. GUTIERREZ; I. SADABA; R.MR.-VASQUEZ; S. TORRES-MARTINEZ; V. GORRE – 2009)_____	39
4.5.3 CLOROFÓRMIO: METANOL, 1:1 POR 24H (J BIOL CHEM.1957) _____	40
4.5.4 ÉTER DE PETRÓLEO POR 24H (ORHAN, B. SENER & T. ATICI, 2003) _____	40
4.5.5 HEXANO: ÉTER ETÍLICO, 1:1 POR 24H (ABD EL-MONEIM; M.R. AFIFY; E.A. SHALABY; S.M.M. SHANAB – 2010) _____	40
4.5.6 CLOROFÓRMIO: METANOL, 2:1 POR 4H (GOMES, 2011) _____	40
4.5.7 EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS DE MACROALGAS POR ULTRASSOM USANDO HEXANO _____	41
4.5.8 EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS DE MACROALGAS POR ULTRASSOM APLICANDO O MÉTODOBLOIGH AND DYER _____	41
4.6. TEOR DE ÓLEO EXTRAÍDO _____	41
4.7. PREPARAÇÃO DE BIODIESEL DE LIPÍDIOS DAS MACROALGAS _____	41
4.7.1. REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO IN SITU DAS MACROALGAS <i>GRACILARIA CAUDATA</i> , <i>GRACILARIA BIRDIAE</i> E <i>GRACILARIA DOMINGENSIS</i> EM PÓ, USANDO HEXANO COMO SOLVENTE E IODO SUBLIMADO COMO CATALISADOR, MÉTODO ADPATADO DE (SUN, 2010; VELASQUES-ORTA, 2012; KAIMAL, 2002)_____	41
4.7.2. TRANSESTERIFICAÇÃO DOS LIPÍDIOS DAS ALGAS <i>GRACILARIA CAUDATA</i> , <i>GRACILARIA BIRDAE</i> E <i>GRACILARIA DOMINGENESIS</i> _____	42
4.7.3. REAÇÃO DE HIDRO-ESTERIFICAÇÃO DOS LIPÍDIOS DAS ALGAS _____	42
4.7.4. HIDROLISE DOS LIPÍDIOS DAS ALGAS <i>GRACILARIA CAUDATA</i> , <i>GRACILARIA BIRDIAE</i> E <i>GRACILARIA DOMINGENSIS</i> _____	42
4.7.5. ESTERIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DAS ALGAS <i>GRACILARIA CAUDATA</i> , <i>GRACILARIA BIRDIAE</i> E <i>GRACILARIA DOMINGENSIS</i> _____	43
4.8. AVALIAÇÃO DA UMIDADE DAS ALGAS _____	43
4.9. MATÉRIA ORGÂNICA _____	43
4.10. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS _____	44
4.11. ANÁLISES DOS RESÍDUOS DE ALGAS _____	44

4.11.1. DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO E NITROGÊNIO TOTAL _____	45
4.11.2. DETERMINAÇÃO DE POTÁSSIO _____	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	46
5.1. EXTRAÇÕES PELOS MÉTODOS À FRIO E À QUENTE _____	47
5.2. EFEITO DO SOLVENTE NO RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO A FRIO _____	48
5.2.1. DICLOROMETANO: METANOL: ÁGUA, 50:25:10 (ABD EL-MONEIM; M.R. AFIFY; E.A. SHALABY; S.M.M. SHANAB – 2010) _____	48
5.2.2. CLOROFORMIO: METANOL: ÁGUA, 50:25:10 (GEMMA VICENTE, L.F. BAUTISTA; R. RODRIGUES; F.J. GUTIERREZ; I. SADABA; R.MR.-VASQUEZ; S. TORRES-MARTINEZ; V. GORRE – 2009) _____	49
5.2.3. CLOROFÓRMIO: METANOL, 1:1 (J BIOL CHEM.1957) _____	49
5.2.4. ÉTER DE PETRÓLEO (ORHAN, B. SENER & T. ATICI, 2003) _____	49
5.2.5. HEXANO: ÉTER ETÍLICO, 1:1 (ABD EL-MONEIM; M.R. AFIFY; E.A. SHALABY; S.M.M. SHANAB – 2010) _____	50
5.2.6. CLOROFÓRMIO: METANOL, 2:1 (GOMES, 2011) _____	50
5.2.7 EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS DE MACROALGAS POR ULTRASSOM USANDO HEXANO _____	51
5.2.8. EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS DE MACROALGAS POR ULTRASSOM APLICANDO O MÉTODO BLIGH AND DYER _____	53
5.3. PREPARAÇÃO DE BIODIESEL DE LIPÍDIOS DAS MACROALGAS _____	53
5.4. CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DO BIODIESEL A PARTIR DAS MACROALGAS _____	54
5.4.1. GRACILARIA CAUDATA _____	55
5.4.2. GRACILARIA BIRDIAE _____	57
5.4.3. GRACILARIA DOMINGENSIS _____	59
5.5. UMIDADE DAS MACROALGAS _____	60
5.6. DETERMINAÇÃO DAS CINZAS E MATÉRIA ORGÂNICA DAS TRÊS ALGAS ESTUDADAS _____	61
5.7. ANÁLISES DOS RESÍDUOS DAS MACROALGAS _____	62
5.7.1. TEOR DE NITROGÊNIO (N) E FÓSFORO (P) TOTAL DO RESÍDUO 1 _____	62
5.7.2. TEOR DE POTÁSSIO (K) DO RESÍDUO 1 _____	63
5.7.3. TEOR DE NITROGÊNIO (N), FÓSFORO (P) E POTÁSSIO DO RESÍDUO 2 _____	64
5.7.4. TEOR DE N, P E K DOS RESÍDUOS 1 E 2 _____	64

5.7.5. EFICIÊNCIA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO MACRONUTRIENTES (N, P E K) ENCONTRADOS NAS MACROALGAS _____	65
6. CONCLUSÕES _____	67
7. REFERÊNCIAS _____	69

1. INTRODUÇÃO

1.1. Algas no Brasil

O Brasil apresenta uma extensa área costeira e o mar representa uma importante fonte de alimento, emprego e energia. Sendo assim, as questões relacionadas aos oceanos assumem importância fundamental para o povo brasileiro. Os recursos ambientais marinhos estão diretamente associados com a sustentabilidade exploratória dos estoques pesqueiros, através da pesca artesanal, do turismo e através das atividades das comunidades tradicionais na orla marítima – folclore, tradições, estilo de vida (MEIRELES, 2006).

Entretanto, o equilíbrio desse patrimônio sócio-ambiental está ameaçado pela falta de planejamento na ocupação e nas ações das atividades humanas na zona costeira.

Na Costa Brasileira ocorrem diversos tipos de habitats, formando uma diversidade de ecossistemas. Os bancos de algas marinhas destacam-se por serem áreas de reprodução, alimentação e habitat da fauna. A grande riqueza genética dos ecossistemas marinhos brasileiros representa imenso potencial pesqueiro, biotecnológico, mineral e energético. (OLIVEIRA e MIRANDA, 1998). Estes recursos não devem ser desperdiçados através da degradação ambiental e da exploração excessiva a ponto de comprometer a sustentabilidade a médio e longo prazo. Atualmente várias unidades de conservação foram estabelecidas no litoral e ajudam na preservação da biodiversidade marinha.

Dentre os bancos de algas brasileiros podemos citar, com grande importância ecológica: Arquipélago de Abrolhos na Bahia com suas algas coralinas, além de algas clorofíceas, rodofíceas e feofíceas; as algas marinhas bentônicas do arquipélago de Fernando de Noronha em Pernambuco; O Atol das Rocas no Rio Grande do Norte que abriga uma diversificada fauna marinha com recifes de algas calcárias, invertebrados e peixes no meio do oceano; Ilha da Trindade no Espírito Santo que possui macro e microalgas em toda sua diversidade e o banco de algas e fanerógamas de Icapuí – CE, que se concentram nas Praias da Barrinha, Barreiras e Requenguela (FBC, 2012).

1.2. O banco de algas marinhas e fanerógamas de Icapuí

O Município de Icapuí com 429,3 Km² e 64 km de praia, está situado no litoral leste do Estado do Ceará, na micro-região do baixo Jaguaribe, a 206 km de Fortaleza por via rodoviária. Limita-se ao norte com o Oceano Atlântico, ao sul e a oeste com o município de Aracati e ao leste com o estado do Rio Grande do Norte (IBGE, 2010).

A praia da Barrinha está localizada a aproximadamente 6 km da sede do município e apresenta, assim como outras localidades da cidade, grandes valores naturais e paisagísticos.

A região é caracterizada por um banco de algas e fanerógamas popularmente conhecido como “banco natural”, que atua no ecossistema como uma cobertura natural contra a erosão costeira. Este ecossistema constitui-se de diversas espécies de crustáceos, moluscos, aves, peixes e até o mamífero aquático mais ameaçado de extinção: *Trichechus manatus*, conhecido popularmente por peixe-boi, sendo habitat e fonte de alimento para a fauna local e migratória (AQUASIS, 2003).

Localizado com maior diversidade na Praia da Barrinha, esse ecossistema abriga várias espécies de algas, desde Rodofíceas (algas vermelhas), Clorofíceas (algas verdes) até Feofíceas (algas pardas). Além disso, neste local pode ser encontrada uma planta marinha (fanerógama) conhecida como “capim agulha”, que alimenta o Peixe-boi marinho. Para a comunidade da Barrinha, este ecossistema é importantíssimo, pois funciona como uma barreira de proteção contra a erosão marinha e sustenta toda a atividade pesqueira da região. A produção primária que consiste de matéria orgânica, algas e nutrientes, existente no banco de algas, deriva da desembocadura do complexo estuarino canal da Barra Grande, o qual está vinculado ao lençol freático existente no sopé das falésias mortas (MEIRELES, 2006).

Figura 01: O banco de algas Marinhas de Icapuí – CE



Fonte: FBC, 2012

Além da importância para a biodiversidade ameaçada, existem ambientes costeiros na região de grande importância para a manutenção do recrutamento da pesca costeira especialmente estuários com manguezais, recifes costeiros, bancos de algas e bancos de fanerógamas, que se constituem em grandes berçários da vida marinha (AQUASIS, 2003).

Por representar um dos mais complexos ecossistemas marinhos, o banco de algas possui com as comunidades costeiras, uma relação de subsistência. Além disso, está totalmente relacionado com a dispersão de nutrientes para os demais ecossistemas marinhos do litoral leste (MEIRELES, 2006). Apesar disto, o banco de algas e fanerógamas está bastante ameaçado devido à extração indiscriminada e insustentável. Esta ação predatória, além de ameaçar o ecossistema, intimida todas as relações de subsistência que as populações costeiras possuem com este ambiente (FBC, 2012).

Figura 02: Localização do Banco de algas de Icapuí – CE



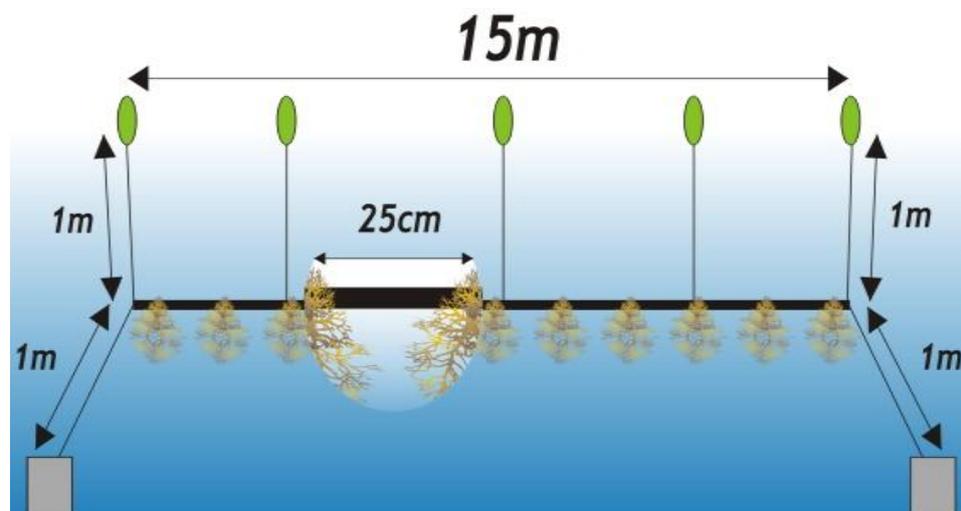
Fonte: www.googleearth.com – Editado por FBC, 2012.

Na região tem ocorrido, segundo relatos dos comunitários locais, atividades insustentáveis, como, pescarias ilegais, principalmente o arrasto de fundo para camarão e a pesca de compressor. Tratando-se ainda das atividades insustentáveis, as mesmas têm ocorrido desde a década de 70, através da exploração insustentável de algas marinhas, provocando a degradação das algas economicamente rentáveis, por meio da coleta de “arrancar” até o seu substrato, evitando que as algas possam se regenerar. A região concentra ainda uma quantidade significativa de embarcações pescando com compressores, que além de constituir-se em pescaria ilegal, de acordo com as normas em vigência do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e de Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), tem causado impactos nos fundos marinhos devido à colocação de milhares de “marambais” (atratores artificiais para lagostas) (COSTA et al, 2012)

Estes processos de degradação em ambientes costeiros aqui descritos vem contribuindo para a diminuição do recrutamento dos principais recursos pesqueiros da região, incluindo: a lagosta, camarão, e as principais espécies-alvo de peixes costeiros capturados pelas pescarias artesanais. Historicamente, as baixas inversões públicas na pesca artesanal, e as fragilidades existentes na implementação do ordenamento da pesca da lagosta e de outros recursos pesqueiros, têm colocado em risco a dinâmica dos espaços de relações entre os pescadores artesanais e a natureza. Soma-se a isto, uma intensidade de capturas de lagosta que tem levado à sobre exploração, e ao crescimento das atividades ilegais de pesca, resultando em crescentes conflitos entre os pescadores artesanais e as embarcações ilegais. (COSTA et al., 2012)

Diante dessas ameaças, a Fundação Brasil Cidadão desenvolveu em conjunto com a comunidade, uma alternativa de cultivo sustentável como forma de dar sustentabilidade à região e manutenção deste ecossistema marinho (FBC, 2012).

Figura 03: Estrutura do Cultivo de Algas Marinhas



Fonte: FBC, 2012.

O desenvolvimento do projeto tem como base, desenvolver a atividade de cultivo de algas na comunidade da Barrinha, no município de Icapuí, do estado do Ceará, como uma alternativa tecnológica diferenciada de aquicultura sustentável, fortalecendo o desenvolvimento socioambiental, visando melhorar a qualidade de vida das populações locais (FBC, 2012).

A coleta e o cultivo sustentável de algas marinhas criaram oportunidade de ocupação e renda para um grupo de 12 famílias que garantem a qualidade de vida e a preservação

ambiental da comunidade, através da venda in natura e do beneficiamento da alga na produção de seus derivados (FBC, 2012).

Figura 04: Atividade de manutenção do Cultivo de Algas em Icapuí – CE



Fonte: FBC, 2012

O surgimento de uma atitude nova de coleta e cultivo sustentável, contribui para preservar os bancos naturais de algas e fanerógamas, onde se alojam larvas da biodiversidade marinha (peixes, lagosta e camarão) e mantém o capim agulha que alimenta o peixe boi marinho, o mamífero marinho mais ameaçado de extinção (FBC, 2012).

1.3. Espécies Algas

As macroalgas estão inseridas em três filios principais: Algas pardas, verdes e vermelhas (VAN DER HOECK, 1995).

As Algas pardas pertencentes ao filo *Phaeophyta*, incluem as algas marinhas bentônicas mais presentes nas águas temperadas, boreais e polares, existindo pelo menos 1500 espécies descritas deste tipo. Além das clorofilas *a* e *c*, os cloroplastos das algas pardas têm vários carotenóides, incluindo a fucoxantina, responsável pela cor característica dos membros desse filo (RAVEN, et al., 2007).

As algas verdes (filio *Chlorophyta*) incluem pelo menos 1700 espécies já descritas. Embora a maioria seja aquática, elas são encontradas em uma variedade de habitat, como troncos de árvores, solo e em associações simbióticas com fungos (liquens), protozoários de água doce, esponjas e celenterados. Elas possuem clorofilas *a* e *b* (como as briófitas e plantas

vasculares) e uma grande variedade de carotenóides. Assim como as plantas terrestres, estas algas são capazes de armazenar amido em seus cloroplastos (RAVEN, et al., 2007).

As algas vermelhas que dominam o filo Rodophyta, dominam as águas tropicais e quentes, mas também podem ser encontradas nas regiões mais frias do mundo. São predominantemente marinhas. A cor verde da clorofila *a* é mascarada pelo pigmento acessório ficoeritrina, que fica localizado no cloroplasto, característico deste filo, que dá a cor vermelha. As algas vermelhas possuem clorofila *a* e *d*, diversos carotenoides e o principal material de reserva é o amido, encontrado no citoplasma (RAVEN, et al., 2007). Este filo representa as algas estudadas nesse trabalho, todas pertencentes ao gênero *Gracilaria*.

As três macroalgas vermelhas estudadas neste trabalho *Gracilaria caudata*, *Gracilaria birdiae* e *Gracilaria dominigensis* apresentam a seguinte classificação biológica: divisão Rodophyceae, classe Florideophyceae e ordem Gracilariales.

Atualmente a principal fonte econômica destas espécies, é a exploração de Ágar, um ficocolóide de alto valor econômico.

Dentro das algas marinhas, certamente as espécies estudadas são as que mais necessitam de estudos bioquímicos, uma vez que os critérios morfológicos têm sido insuficientes para a delimitação dos limites de separação entre as espécies. No entanto, nenhuma proposta tem sido feita para este gênero relacionada com a produção ou agregação de biocombustíveis.

Figura 05: *Gracilaria caudata*



Fonte: FBC, 2012

Figura 06: *Gracilaria birdiae*

Fonte: FBC, 2012

Figura 07: *Gracilaria domingensis*

Fonte: Encyclopedia of life – www.eol.org

1.4. Algas marinhas: potencialidades econômicas

O cultivo de algas para produção de agaranas e carragenanas tem sido advogado como prioritário no Brasil. O país importa estes produtos em quantidades significativas, e o mercado mundial apresenta demanda crescente (PAULA et al., 1998; OLIVEIRA, 1992; CRICHLEY, 1993). Sabemos que alguns esforços já foram realizados para se cultivar espécies de macroalgas nativas do Brasil, mas apesar destes esforços a maricultura comercial somente tornou-se realidade para *Gracilaria* no Chile (PAULA et al., 1998). Oliveira e Miranda (1998) citam que embora a exploração de macroalgas no Brasil tenha se iniciado por volta de 1940, seu impacto econômico, e, sobretudo social, tem sido muito pequeno até agora. Os mesmos autores colocam também que na época em que foi realizado o trabalho, a exploração, exclusivamente de forma extrativista de algas, estava localizada principalmente

na costa do Ceará, mais especificamente no município de Icapuí. Neste período, na mesma localidade, cerca de 85% da matéria prima processada era coletada mensalmente, o equivalente a 60 toneladas.

As algas também são importantes fontes de compostos essenciais para a nutrição humana. Em muitos países a indústria alimentícia consome uma grande quantidade de algas, sendo estas bastante conhecidas, por fornecerem uma grande quantidade de fibras, vitaminas, sais minerais e antioxidantes. Nas últimas décadas, observa-se um esforço no desenvolvimento do cultivo em larga escala, em detrimento da exploração indiscriminada e insustentável dos bancos naturais (CARDOZO, et al., 2007).

As algas são organismos pertencentes a uma imensa variedade de nichos ecológicos. E devido às mais diversas condições de ambientes, a biossíntese de metabólitos secundários, tornou-se uma estratégia de sobrevivência (CARDOSO, et., al, 2007). Inúmeras atividades biológicas de algas foram relatadas na literatura, incluindo atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, imunomodulatórias, antivirais e antimicrobianas, entre outras, mostrando o potencial econômico destes organismos para serem usados como insumos na produção de remédios (SMIT, 2004).

1.5. Caracterização dos métodos de determinação de lipídios

Soxhlet é um método de extração a quente que trabalha com um refluxo descontínuo e intermitente de solvente com a vantagem de evitar a temperatura alta de ebulição do solvente, pois a amostra não fica em contato direto com o solvente quente, evitando assim a decomposição da gordura na amostra. Os dois solventes mais utilizados são o éter de petróleo e o éter etílico (CECCHI, 2003).

Este método é bastante eficiente para amostras secas onde é possível determinar ácidos graxos e fosfolipídios, porém se gasta um grande volume de solvente que pode acarretar na saturação do solvente que fica em contato com a amostra antes de ser sifonado.

Pearson (1977) nos diz que para garantir que toda gordura livre seja removida é recomendável retirar o material do aparato, adicionar sílica e retornar ao extrator para uma nova extração ou é recomendado utilizar uma amostra que já tenha sido utilizada na determinação de umidade, pois com a amostra seca há uma melhor penetração do solvente.

Bligh e Dyer, em 1959, sugeriram um método para extrair gordura a frio que utiliza uma mistura de três solventes: Clorofórmio, Metanol e Água. A amostra é misturada com o metanol e clorofórmio que estão numa proporção, que formam uma só fase com a amostra. Adiciona-se mais clorofórmio e água, promovendo a formação de duas fases distintas, uma de

clorofórmio, contendo lipídios, e outra metanol mais água, contendo substâncias não lipídicas. A fase do clorofórmio com a gordura é isolada e, após a evaporação do clorofórmio, obtém-se a quantidade de gordura por pesagem. Através da mistura dos três solventes em diferentes proporções, são formadas duas fases distintas: uma de clorofórmio onde tem-se os lipídeos e outra de metanol e água contendo os compostos não lipídicos. A fase de clorofórmio é então separada num balão para a gordura ser quantificada (CECCHI, 2003).

Esse método apresenta diversas vantagens:

- Extrai todas as classes de lipídeos;
- Pode ser usado em amostras úmidas ou secas;
- Preservação dos lipídeos, pois não usa calor;
- Simplicidade do material.

Bligh-Dyer também pode ser usado em escala micro, isto é, a análise é feita em tubos de ensaio com a vantagem de proporcionar uma maior precisão na análise e reduzir gastos pelo gasto menor de solvente.

Tanto no método de Soxhlet, quanto no Bligh-Dyer a gordura é quantificada através de métodos gravimétricos, onde se realiza a evaporação do solvente com o lipídio num balão, finaliza a remoção do solvente por aquecimento em estufa e pela diferença do peso do balão vazio e do balão com a gordura obtém-se a quantidade de gordura extraída.

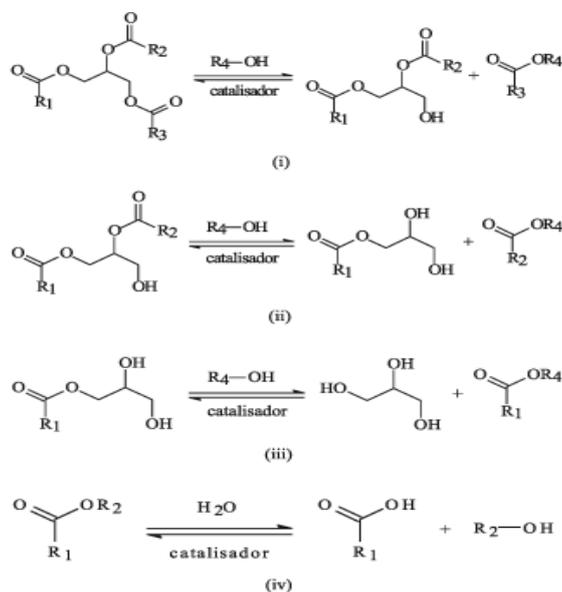
1.6. Reações de obtenção do biodiesel

Existem diferentes tipos de processos empregados na produção de biodiesel, presentemente o mais utilizado em escala industrial é a transesterificação. Basicamente as metodologias utilizam óleos, gorduras animais e graxas como matéria-prima. Os óleos e gorduras são substâncias de origem vegetal, animal ou microbiana, praticamente insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. A distinção entre um óleo e uma gordura se faz na aparência e nas propriedades físicas dessas substâncias. Na temperatura ambiente, as gorduras são sólidas e os óleos são líquidos. Os principais fatores que determinam se um lipídio é uma gordura ou um óleo, é o seu grau de insaturação e o ponto de fusão. Assim, um lipídio contendo alto grau de ácidos graxos saturados será sólido em temperatura ambiente, com moderado grau de insaturação, podendo torna-se sólido no refrigerador, enquanto que um alto grau de insaturação possibilita-lhe permanecer líquido no congelador (SOLOMONS; GRAHAM, 2007). Os óleos e gorduras pertencem a uma classe dos lipídeos denominada triacilgliceróis (TAG's), tais substâncias apresentam-se em grande quantidade nos óleos vegetais e gorduras animais (SOLOMONS; GRAHAM, 2007).

a) Transesterificação

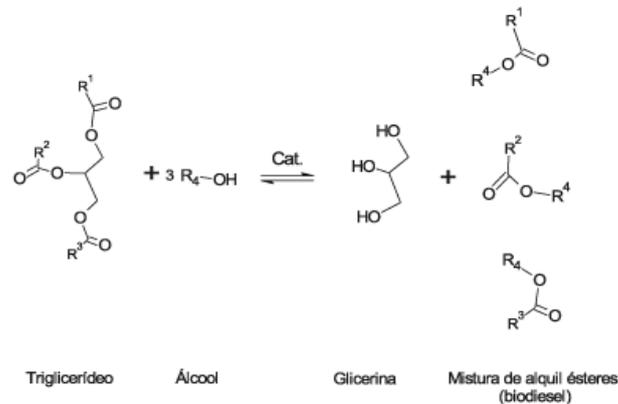
A transesterificação é um termo geral usado para descrever uma importante classe de reações orgânicas, onde um éster é transformado em outro, através da troca do resíduo alcoxila. Quando o éster original reage com um álcool, o processo de transesterificação é denominado alcoólise. Esta reação é reversível e prossegue essencialmente misturando os reagentes. Contudo, a presença de um catalisador (ácido ou base) acelera consideravelmente esta conversão, como também contribui para aumentar o rendimento da mesma (MEHER *et al.*, 2004; SCHUCHARDT *et al.*, 1998). Na transesterificação de óleos vegetais, um triacilglicerídeo reage com um álcool na presença de uma base ou ácido forte, produzindo uma mistura de ésteres de ácidos graxos e glicerol, conforme esquematizado na **Figura 8**. O processo geral é uma sequência de três reações consecutivas, na qual mono e diacilglicerídeos são formados como intermediários.

Figura 08: Reações envolvidas na transesterificação de uma molécula de Triacilglicerídeo.



Fonte: SUAREZ, et al. (2007).

Figura 09: Reação global de transesterificação de uma molécula de Triacilglicerídeo.

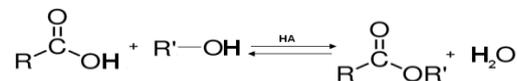


Fonte: LOBÔ, et al. (2009)

b) Esterificação

A esterificação é outra maneira de obtenção do biodiesel. No caso em questão os ácidos carboxílicos (se obtidos de TAGs chamados de AG's) reagem com um monoálcool (preferencialmente de baixo peso molecular), produzindo éster (biodiesel) mais água.

Figura 10: Reação global da esterificação



Geralmente, a reação de esterificação pode ser catalisada por ácidos inorgânicos, como o ácido sulfúrico. A reação de esterificação é reversível e o ácido catalisa tanto a reação direta, (a esterificação) como a reação inversa (a hidrólise do éster). Assim, para deslocar o equilíbrio em favor dos produtos podem-se utilizar dois métodos: remoção de um dos produtos, preferencialmente a água; ou utilizar um excesso de um dos reagentes, como o álcool. Evidentemente que se faz necessário um processo de otimização da esterificação para determinar as condições ideais da reação. O rendimento obtido é muito elevado, podendo chegar a 99%, mas a reação é lenta, sendo necessárias temperaturas elevadas (acima dos 100°C) e mais de 3 horas para alcançar o referido rendimento (FUKUDA *et al.*, 2001; GERPEN, 2005; AL-WIDYAN *et al.*, 2002; apudi KRAUSE, 2008).

c) Hidroesterificação

Segundo a Bio-bras (2008) o processo de hidroesterificação incide em uma novíssima alternativa na produção de biodiesel. O referido processo possibilita o uso de qualquer matéria-prima graxa (gordura animal, óleo vegetal, óleo de fritura usado, borras

ácidas de refino de óleos vegetais, entre outros). Essas matérias-primas são totalmente transformadas em biodiesel independente da acidez e da umidade que possuem. A hidroesterificação é um processo que envolve uma etapa de hidrólise seguida de esterificação. A hidrólise consiste numa reação química entre a gordura (ou óleo) com a água, separando-se glicerina e ácidos graxos (Esquema 1).



Após a hidrólise, os ácidos graxos gerados são então esterificados (fig. 3) com metanol ou etanol, obtendo-se os ésteres com elevada pureza. O próprio álcool “neutraliza” a acidez presente. Não existe contato de glicerina (já removida na hidrólise) com o biodiesel (produzido na esterificação). Atualmente, a fábrica de biodiesel da Agropalma (Belém-PA) já opera com hidroesterificação. Apenas água é gerada como sub-produto (Esquema 2).



1.7. Biofertilizantes, alimentos e componentes químicos

Macroalgas também têm sido utilizadas como esterco, alimentos, rações, para consumo humano e como uma fonte de ficocolóides, tais como: ágar, ácido algínico e carragenano (CHAPMAN,1970). Além de sua aplicação como estrume, os extratos líquidos obtidos a partir de algas, recentemente ganharam importância como pulverizações foliares para diversas culturas (THIVY, 1961; METHA ET AL, 1967; BOKIL et al.,1974), porque o extrato contém fatores de crescimento como hormônios (AIA e AIB), citocininas, oligoelementos (Fe, Cu, Zn, Co, Mo, Mn, Ni), vitaminas e os aminoácidos (CHALLEN E HEMINGWAY, 1965). Assim, estes extratos quando aplicados a sementes ou quando adicionada ao solo, estimulam o crescimento das plantas (BLUNDEN, 1971). Booth (1969) observou que o valor de algas como fertilizantes não foi apenas devido ao nitrogênio, fósforo e teor de potássio, mas também por causa da presença de rastreio elementos e metabólitos. Extrato aquoso de *Gracilaria sp* quando aplicado como uma pulverização foliar em *Zizyphus mauritiana* mostraram um maior rendimento e qualidade dos frutos (RAMA RAO, 1991). Fertilizantes de algas foram encontrados para substituir o adubo químico, devido ao nível elevado de orgânicos que ajudam a matéria na retenção da umidade e de minerais em um nível superior do solo disponível para as raízes (WALLEN KEMP,1955). Extratos de algas

marinhas já estão disponíveis comercialmente sob os nomes, tais como Maxicrop (Mar nascido), Algifert (marinure), Goemar GA14, Kelpak 66, Seaspray, Seasol, SM3, Cytex e Seacrop 16. Recentemente, pesquisadores provaram que os fertilizantes de algas são melhores do que outros fertilizantes e são muito econômicos (GANDHIYAPPAN E PERUMAL, 2001). O presente estudo foi realizado também para investigar o teor de NPK nas macroalgas, a fim de potencializar seu uso como biofertilizante.

Na praia da Barrinha, município de Icapuí – CE, o beneficiamento de algas ainda é em pequena escala, mas suficiente para gerar resíduos que não possuem um destino correto. O bagaço das algas marinhas, resultante da extração do ágar (carboidrato utilizado para a produção de cosméticos e alimentos pelo grupo de mulheres), não possuía nenhuma finalidade, sendo assim descartado, constantemente.

Recentemente, o grupo tem descartado espontaneamente na horta comunitária. Percebendo um maior crescimento das hortaliças, todos os resíduos das macroalgas atualmente são descartados na horta com adubo. Esse fato motivou esta pesquisa em determinar as características físico-químicas e biológicas de resíduos orgânicos de algas descartados na localidade. O conhecimento das características de cada resíduo foi fundamental para a tomada de decisão quanto à viabilidade e ao método mais apropriado de reaproveitamento da matéria orgânica. Portanto, determinar a concentração dos macronutrientes P, K e N foi um dos objetivos deste trabalho, a fim de dar um destino certo para estes resíduos e gerar conhecimento para a comunidade.

1.8. Biofertilizantes

O biofertilizante é um adubo orgânico líquido produzido em meio aeróbico ou anaeróbico a partir de uma mistura de materiais orgânicos, esterco, frutas, leite, minerais (macro e micronutrientes) e água.

A produção de biofertilizantes é decorrente do processo de fermentação, ou seja, da atividade dos micro-organismos na decomposição da matéria orgânica e complexação de nutrientes, o que pode ser obtido com a simples mistura de água e esterco fresco. (TIMM *et al*, 2004; SANTOS, 1992). Na literatura existem poucos estudos sobre o assunto. Mesmo assim, percebem-se resultados positivos do biofertilizante para uso na melhoria das características químicas, físicas e biológicas do solo; controle de pragas e doenças. Ademais, o processo apresenta baixo custo de produção e facilidade de confecção na propriedade (DIAS *et. al*, 2002; PESAGRO, 1998; ALFONSO & LEIVA, 2002; DAROLT, 2002).

Apesar da grande potencialidade de utilização desses produtos como adubos foliares, são poucos os trabalhos de pesquisa relacionados à sua utilização. A reciclagem dos resíduos orgânicos, visando o seu reaproveitamento como fonte alternativa para a produção de biofertilizantes, é uma medida estratégica sob o ponto de vista ambiental e conveniente quando economicamente viável (FERNANDES e TESTEZLAF, 2002). No caso da produção de biofertilizantes a partir do bagaço de macroalgas, também é uma alternativa de reaproveitamento, pois as espécies do gênero *Gracilaria*, são grandes produtoras de ágar (carboidrato extraído em água quente), que é utilizado na produção de cosméticos e alimentos.

A produção de biofertilizantes tem contribuído para a otimização do aproveitamento de resíduos orgânicos, gerados em propriedades de base familiar. No entanto, torna-se necessário que este processo seja utilizado com eficiência, de maneira que a qualidade do insumo obtido possa proporcionar ao sistema aportes adequados de nutrientes e de agentes biológicos para o desenvolvimento equilibrado das plantas (TIMM *et al.*, 2004).

No que diz respeito a parte analítica de sua composição, o biofertilizante apresenta macro e micronutrientes assimiláveis pelo vegetal, tais como: nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, sódio, ferro, cloro, sílica, molibdênio, boro, cobre, zinco e manganês. O seu pH pode variar de 7,0 a 8,0 e poderá também ser inferior quando a fermentação for incompleta (SANTOS, 1992).

1.9. Caracterização dos Resíduos das Macroalgas

A indústria de obtenção de Nitrogênio, Fósforo e Potássio de resíduos de algas marinhas vem operando com interrupções desde meados do século XVIII (VOLESKY *et al.*, 1970) e, no século XIX, as algas marinhas eram a principal fonte de iodo (LEVRING *et al.*, 1969). Algas marinhas também são usadas como fertilizantes, pois vários elementos são encontrados em quantidades suficientes para tornar efetivo seu aproveitamento (VOLESKY *et al.*, 1970).

Na última década trabalhos científicos foram publicados divulgando os diversos compostos bioativos presentes em extratos de algas (Stadnik, 2003). No Brasil em 2004 foi regulamentado (Decreto nº 4.954) o uso de extrato de algas como fonte de biofertilizantes

1.9.1. Resíduos 1

Os resíduos de algas em estudo foram obtidos após a extração de óleo. São elas: *Gracilaria caudata*, *Gracilaria birdiae*, *Gracilaria domingensis*. Todo este resíduo encontrava-se armazenado em sacos plásticos vedados no Laboratório de Química Orgânica

da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte - UERN. Acumulados em pilhas, os resíduos de algas apresentavam-se totalmente desidratados e livres de contaminantes.

1.9.2. Resíduos 2

As amostras deste resíduo foram obtidas do Projeto “Mulheres de Corpo e Alga”, que utiliza constantemente algas do gênero *Gracilaria* para a fabricação de cosméticos e alimentos. O grupo de mulheres “algieiras” extrai das macroalgas apenas o ágar, carboidrato solúvel em água quente. Todo o restante do material era rotineiramente descartado em uma horta comunitária. Estes resíduos em estudo foram levados até a UERN, empilhado em plástico-filme e congelados em freezer para posterior análise.

Figura 11 e 12: Horta Comunitária



Fonte: FBC, 2012

2. OBJETIVO GERAL

Estudar a viabilidade das macroalgas *Gracilaria caudata*, *Gracilaria birdiae* e *Gracilaria domingensis* encontradas na Praia da Barrinha, município de Icapuí – CE, a fim de avaliar seu potencial para a produção de biodiesel e biofertilizantes, analisando o melhor método de extração de lipídios, bem como a qualidade do óleo e a quantidade dos macronutrientes (N, P e K) foi o objetivo geral da pesquisa.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a extração, caracterização e quantificação do teor de Ácidos Graxos presentes nas algas *Gracilaria caudata*, *Gracilaria birdiae* e *Gracilaria domingensis*;

- Avaliar a utilização do óleo como matéria prima com potencialidade para produção de biodiesel;
- Estudo sistemático para determinar o melhor método de extração dos ácidos graxos das macroalgas;
- Determinar o teor de nitrogênio, fósforo, potássio dos resíduos usados na extração de óleo para verificar sua possível utilização como adubo;
- Determinar o teor de nitrogênio, fósforo e potássio dos resíduos descartados pelo Projeto de beneficiamento “Mulheres de Corpo e Alga” para verificar sua possível utilização como adubo.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. As Macroalgas Vermelhas

O termo algas, *latu sensu*, compreende um agrupamento artificial de organismos que têm muito pouca coisa em comum a não ser o fato de serem predominantemente aquáticos, fotossintetizantes, contém clorofila a e são desprovidos de um tecido constituído de células estéreis envolvendo os órgãos de reprodução e de um sistema diferenciado para condução de água, circulação de fluidos, sais minerais e outros nutrientes. Por esta razão são grupos polifiléticos e não constituem uma categoria taxonômica definida, mas sim um amontoado de categorias díspares, tão diversas que chegam a ser classificadas em dois ou três reinos diferentes, tradicionalmente conhecidos como Monera, Protista e Plantae (BATTACHARYA, 1998; SOGIN, 1989). Atualmente a classificação mais bem aceita, posiciona todas as algas no reino Protista (LEE, 1989; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Em muitos ecossistemas aquáticos, as algas atuam como produtores primários na cadeia alimentar, sintetizando material orgânico a partir de dióxido de carbono e água e também o oxigênio necessário para o metabolismo dos organismos consumidores (LEE, 1997). As algas calcárias são elementos importantes na formação e manutenção dos recifes de coral, ecossistemas com biodiversidade comparável à das florestas tropicais (BROWN; OGDEN, 1993; REAKA-KUDLA, 1997; STENECK; TESTA, 1997). É possível ainda que as algas calcárias tenham um importante papel no ciclo global do carbono, tendo abundância e diversidade provável influência sobre o clima do planeta (OLIVEIRA, 1996).

Quanto à morfologia podem ser unicelulares, coloniais, filamentosas, sifonáceas até complexos talos parenquimatosos das grandes algas (OGAWA; KOIKE, 1987).

Embora pertencendo a vários grupos taxonômicos, as algas podem ser grosseiramente separadas pelo tamanho em dois grandes grupos: as algas microscópicas (microalgas) e as algas macroscópicas (macroalgas), com dimensões que variam de alguns milímetros a algumas dezenas de metros (PANORAMA DE AQUICULTURA, maio/junho, 1997). Tal variedade de organismos encontra-se distribuídas por diferentes habitats: oceanos, corpos de águas doces, solos rochas e mesmo, superfície de vegetais.

As algas macroscópicas, do ponto de vista botânico, são classificadas de acordo com a estrutura física, função e ciclo reprodutivo em: **Chlorophyta**, algas verdes, **Phaeophyta**, algas pardas e **Rhodophyta**, algas vermelhas (RAVEN, 1997).

Segundo Round (1983), evolutivamente, as algas marinhas por apresentarem um histórico fóssil muito extenso são consideradas como um grupo a partir do qual todos os outros vegetais fotossintetizantes mais complexos, Criptógamos e, mais recentemente, Fanerógamas, se originaram. Apesar da sua variedade nos aspectos morfológicos, citológicos e reprodutivos, seus mecanismos básicos e vias metabólicas parecem ser similares aos demais vegetais.

Reconhecidamente, as algas marinhas representam um dos maiores biorecursos, existindo aproximadamente 150.000 espécies, dentre as quais mais de 30.000 se encontram taxonomicamente classificadas (HARVEY, 1988).

As algas vermelhas formam um grupo de organismos extremamente diversificado. Com cerca de 6.000 espécies, as Rhodophytas são diferenciadas dos outros grupos de algas pela combinação de algumas características (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). Elas se caracterizam por possuir como pigmentos a clorofila *a*, a clorofila *d*, carotenóides e ficobilinas (ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina) que mascaram a tonalidade verde das clorofilas, deixando a alga com seu tom avermelhado característico. A presença da ficoeritrina permite-lhes absorver a luz azul, podendo assim, sobreviver à profundidades muito superiores às das outras algas. Já foram encontradas algas desta divisão a mais de 260 metros de profundidade, desde que água seja límpida o suficiente para a passagem de luz (CRAIGE, 1990). Os principais produtos de reserva das algas vermelhas são os grânulos de amido das florídeas. Armazenados no citoplasma, o amido das florídeas é uma molécula que se assemelha à porção amilopectina do amido (VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1989; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001), pois é constituído por α -D-glucose, com ligações glicosídicas do tipo $\alpha(1\rightarrow4)$ e pontes de ramificações no carbono 6 (PAINTER, 1983).

A parede celular das Rhodophytas, assim como das Phaeophyta e Chlorophyta, tem como componente principal a celulose (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). A celulose da parede celular das Rhodophytas encontra-se embebida por um material amorfo e mucilaginoso, responsável pela flexibilidade, resistência e textura das algas. Os principais componentes mucilaginosos das algas vermelhas são o ágar, a carragenana e o alginato (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

3.2. Biodiesel

O cultivo de algas apresenta-se satisfatório, principalmente, para obtenção de ficocolóides, alimentos e fertilizantes. Estudos recentes mostram a presença de ácidos graxos em algas direcionando a produção destas espécies para uma nova aplicação até então muito pouco explorada mundialmente: como fonte de energia renovável. (OLIVEIRA e MIRANDA, 1998). A motivação de se investir em biodiesel está relacionada, principalmente, ao conceito de desenvolvimento sustentável. Para isso, os aspectos sociais, econômicos e ambientais deverão estar equilibrados, permitindo sua viabilidade. Dentro destas exigências, triglicerídeos (óleos vegetais e animais) são consideradas alternativas viáveis para o desenvolvimento de biodiesel, principalmente por se tratarem de fontes renováveis, de grande variedade e fácil biodegradabilidade. Neste sentido, as algas apresentariam a vantagem de produzirem uma grande quantidade de matéria-prima em pouco tempo, sendo, segundo alguns autores, a matéria-prima que teria o melhor desempenho em termos de produtividade de óleo por hectare. Dados da literatura citam que a produtividade de alga por hectare chega a ser 250 vezes maior que de oleaginosas terrestres (OLIVEIRA e MIRANDA, 1998).

Tratando-se da extração de ácidos graxos em microalgas, alguns trabalhos já foram realizados, como o de Santana et al. (2009). Porém, trabalhos com extração de ácidos graxos em macroalgas marinhas e caracterização destas substâncias, ainda são escassos (MACEIRAS et al., 2006). Assim como também são escassos estudos bioquímicos sobre as mesmas, sendo que estes estudos são muito importantes, uma vez que os critérios morfológicos têm sido insuficientes para a delimitação dos limites de separação entre as espécies.

As algas marinhas, por apresentarem na sua composição, vários compostos orgânicos, atuam como organismos sintetizadores de compostos secundários, sendo cada vez mais utilizadas nas indústrias de alimentos, cosméticos e ultimamente sendo proposto seu potencial uso na preparação do biodiesel (SANTANA et al., 2009).

Deve-se ainda ressaltar que os óleos são apenas uma pequena parte das algas que variam de aproximadamente 1 a 20 % de acordo com o tipo de alga, sendo importante estudar,

caso se viabilize o seu uso como insumo para biodiesel o aproveitamento do resíduo da extração (MACEIRAS, 2006).

As novas fontes de energia objetivam minimizar a dependência da população em relação ao petróleo, visando fontes energéticas renováveis que favorecessem a conservação do meio ambiente (ABD et al., 2010).

O biodiesel se enquadra bem nessas características, pois é um combustível biodegradável e possui combustão mais limpa. Além disso, é renovável, possui alta lubricidade, é socialmente correto e eficiente como aditivo. O combustível supracitado pode ser produzido a partir de óleos vegetais, como por exemplo, soja, girassol, canola, pinhão manso, mamona, algas e etc (ABD et al., 2010).

Para que o uso do biodiesel seja vantajoso, necessita-se que o mesmo possua boa qualidade, o que torna imprescindível a padronização de suas características físico-químicas.

No entanto, é importante salientar que apesar das diversas possibilidades de matérias-primas que podem ser empregadas na obtenção do biodiesel, praticamente 95% do biocombustível no Brasil é procedente da soja e do sebo de boi (ANP, 2009). Outro aspecto relevante é que apesar da enorme disponibilidade de matéria prima, apenas 15% do biodiesel no país são provenientes de origem animal (ANP, 2009).

As razões para o interesse pelos biocombustíveis são muitas e variam de um país para outro e também ao longo do tempo, sendo as principais: diminuir a dependência externa de petróleo, por razões de segurança de suprimento ou impacto na balança de pagamentos; minimizar os efeitos das emissões veiculares na poluição local, principalmente nas grandes cidades; controlar a concentração de gases de efeito estufa na atmosfera.

3.3. Algas marinhas e a agricultura

O mar, com certeza, é grande fornecedor de organismos úteis ao homem, porém pouco estudados, entre eles, destacando-se as algas marinhas. As macroalgas são organismos muito diversificados e de ocorrência freqüente em ambientes marinhos (HORTA JUNIOR et al., 2001).

No Brasil, estudos com algas marinhas estão gerando conhecimento científico útil em diversas áreas, tais como: na farmacologia, identificando compostos com atividade antiviral e anticancerígena (FRUGULHETTI et al. 2005;ROMANOS, 2005); na área ambiental, para o monitoramento e previsão de impactos ambientais (PUPO, 2005); na área sócio-econômica, implantando a produção de algas para gerar renda adicional em atividades maricultoras (REIS, 2005); na agricultura, utilizando extratos de macroalgas para a proteção

de plantas contra patógenos (STADNIK, 2005). Embora alguns trabalhos científicos relatem diversos compostos bioativos em extratos de algas, entre os quais, aqueles capazes de inibir o crescimento de bactérias e fungos, estimular o crescimento e/ou fortalecer as suas defesas contra o ataque de patógenos, somente na última década produtos à base desses organismos despertaram um maior interesse da comunidade científica e da iniciativa privada (KELECOM, 1997). Na área agrícola, algumas espécies de algas já vêm sendo usadas nas formas secas ou de extratos, sendo atualmente comercializadas como bioestimulantes/fertilizantes em determinados países, onde apresentam a capacidade de aumentar a resistência das plantas a doenças e até mesmo a outros estresses, como geadas (ZODAPE, 2001 apud STADNIK, 2003). No entanto, o verdadeiro potencial de utilização de macroalgas na geração de produtos naturais na agricultura continua pouco explorado (STADNIK, 2003).

Diversos compostos antimicrobianos estão presentes em diferentes algas marinhas. Vlachos et al. (1997) fizeram a bioprospecção antibiótica de 56 espécies de algas coletadas nas costas leste e oeste da África do Sul, verificando que, entre os extratos etanólicos testados, aqueles da alga marrom *Zonaria subarticulata* mostraram o mais amplo e intenso espectro de atividade antimicrobiana. Abourriche et al. (1999) e Bennamara et al. (1999) identificaram na alga marrom *Cystoseira tamariscifoliai* diferentes compostos bioativos, entre eles, o diterpenóide metoxifurcarenona, sendo que este mostrou forte atividade contra os fungos fitopatogênicos vasculares *Fusarium oxysporum* e *Verticillium albo-atrum* e a bactéria *Agrobacterium tumefaciens*. Rahman et al. (1997), isolaram fucosterol, a partir da alga marrom (*Jolyana laminarioides*), que inibiu o crescimento de fungos. O extrato metanólico, a fração acetato-etílico e quatro esteróis isolados da alga verde *Chara wallichii*, apresentaram, apesar de diferentes graus, atividade no combate a diferentes espécies de bactérias e fungos (KHALIQU-UZ-ZAMAN et al., 2001).

Além da atividade direta contra fitopatógenos, algumas espécies de algas produzem moléculas bioativas capazes de induzir a resistência em plantas (TALAMINI & STADNIK, 2004). Assim, a partir da alga marrom *Laminaria digitata*, isolou-se o composto laminarina, um oligômero linear de β -1,3 glucano, o qual estimula as reações de defesa da planta contra uma ampla gama de patógenos (KLARZYNSKI et al., 2000 apud TALAMINI & STADNIK, 2004). Existe um produto comercial chamado Iodus 40® que é registrado na França para uso na cultura do trigo, induzindo resistência contra a fusariose, septoriose e oídio. Iodus 40® é formulado numa concentração de 37 g/ L de laminarina. Este produto não é fitotóxico e os custos energéticos para a planta, devido à indução da resistência, são pequenos ou inexistentes

(GOËMAR, 2006). Polissacarídeos complexos são frequentemente observados em parede celular de algas, os quais podem apresentar diferentes formas de atividade biológica (PESSATTI & MARASCHIM, 1998), como estimular as respostas de defesa da planta.

3.4. Biofertilizantes à base de extrato de algas

No âmbito legal os biofertilizantes, ou estimulantes, são qualificados como produtos que contém componentes ativos ou agentes biológicos capazes de atuar, direta ou indiretamente, sobre o todo ou parte das plantas cultivadas, melhorando o desempenho do sistema de produção, e que seja isento de substâncias proibidas pela regulamentação de orgânicos, de acordo com a Instrução Normativa 64 de 18/12/2008 (MAPA, 2008).

O biofertilizante é um adubo orgânico líquido originado da fermentação de materiais orgânicos, minerais e água, em meio aeróbico ou anaeróbico (DIAS et. al, 2002). Seu processo de produção resulta em duas frações: a porção sólida que dá origem ao adubo de solo, e a porção líquida, a ser utilizada como adubo foliar (BETTIOL et al., 1998). São ricos em enzimas, antibióticos, vitaminas, fenóis, ésteres e ácidos orgânicos (MEDEIROS; LOPES, 2006). Os biofertilizantes líquidos possuem em sua composição quase todos os elementos nutricionais necessários ao desenvolvimento vegetal, entretanto, suas concentrações podem variar de acordo com a matéria-prima a ser fermentada. O período de fermentação também pode afetar a concentração de nutrientes (SANTOS, 1992). De acordo com Pinheiro e Barreto (1996), os metabólitos resultantes do processo fermentativo, como enzimas, coenzimas, cofatores (metaloporfirinas, citocromos, vitaminas, etc.) ativam e catalisam as reações biológicas das plantas.

Macroalgas são utilizadas como fertilizantes na agricultura há vários séculos, com destaque para as regiões litorâneas do hemisfério Norte. Entretanto, no século XX, somente nos anos 50 passaram a ser comercializadas com objetivos de melhorar a taxa de germinação de sementes, crescimento do sistema radicular, produção de flores, frutificação e indução de resistência a pragas e doenças, e estimular as respostas às condições de estresse, principalmente o hídrico (NORRIE, 2008).

Em alguns países, algumas espécies de algas são comercializadas com foco bioestimulante e fertilizante, na forma seca ou de extrato líquido. Sua ação permite o aumento da resistência das plantas a doenças, estresse hídrico e geadas (STADNIK, 2003). É possível citar as espécies *Fucus* spp., *Laminaria* spp., *Sargassum* spp. e *Turbinaria* spp., utilizadas como bioestimulantes na agricultura (HONG et al., 2007). A Comunidade Européia faz uso

frequente de produtos comerciais à base de extrato de algas para aplicações foliares ou no solo, em sistemas orgânicos ou convencionais de produção (MASNY et al., 2004).

As macroalgas possuem em sua composição nutrientes, aminoácidos, vitaminas, citocininas, auxinas e ácido abscísico (ABA) que atuam como promotores do desenvolvimento vegetal (STIRK et al., 2003). Algas marinhas possuem atividade direta na proteção vegetal contra fitopatógenos, e também promovem a produção de moléculas bioativas capazes de induzir a resistência nos vegetais (TALAMINI; STADNIK, 2004).

O uso de produtos comerciais à base de extrato de algas é frequente na Comunidade Européia, sendo indicado inclusive para o sistema orgânico (MÓGOR et al., 2008). No Brasil, o uso de extrato de algas é permitido como biofertilizante ou condicionador de solo, sendo também utilizado na alimentação de animais (MAPA, 2008). Seu uso como agente complexante em formulações fertilizantes é regulamentado pela Instrução Normativa 64 de 18/12/2008 (MAPA, 2008). Na agricultura, seu uso é indicado como biofertilizante, bioestimulante e/ou fitoprotetor, na forma seca ou de extrato líquido (STADNIK, 2005).

Segundo Castro e Vieira (2001), o esclarecimento quanto aos efeitos de formulações biofertilizantes como estimulantes em vegetais sobre os cultivos e seus benefícios, têm se mostrado uma alternativa para o alcance de melhor produtividade, e qualidade superior. De acordo com fabricantes destes produtos, os benefícios esperados permitem a uniformização e aumento da germinação de sementes e emergência de plântulas, melhor desenvolvimento do sistema radicular; maior aproveitamento de nutrientes; obtenção de flores e frutos de tamanho uniforme e com cores mais intensas, entre outros (ANASAC, 2006; BIOCAMPO, 2009). A influência de produtos com ação bioestimulante sobre estas características reflete de forma indireta para o aumento da produtividade dos cultivos, pois influenciam processos fisiológicos e metabólicos desde o processo de germinação de sementes, até o período pós-colheita dos produtos agrícolas.

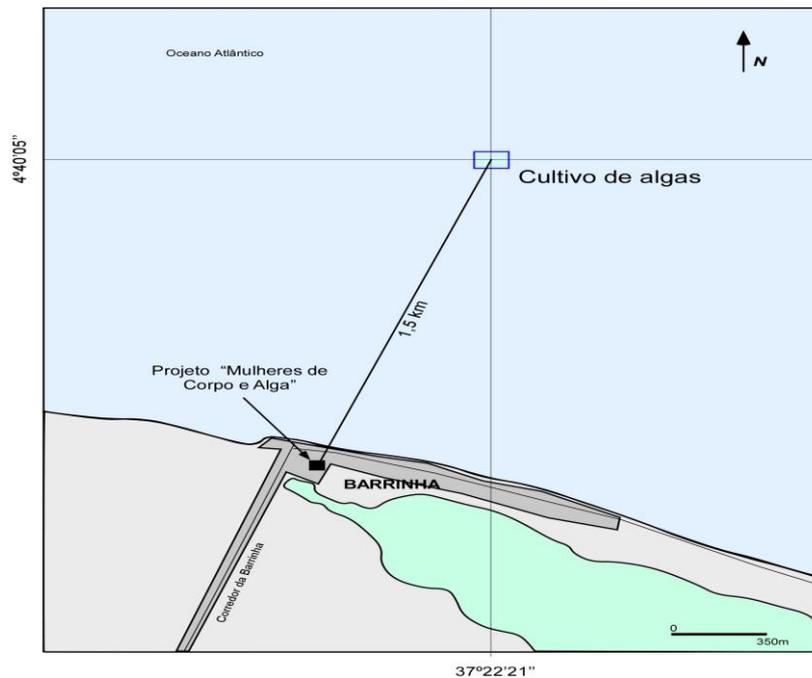
4. METODOLOGIA

4.1. Coleta das macroalgas

A espécie *Gracilaria caudata*, espécie bentônica (fixa no substrato), rodofícia, foi coletada diretamente de um cultivo em mar aberto na Praia da Barrinha, 4°40'05'' de latitude Sul 37°22'21'' de longitude Oeste no município de Icapuí – CE (Ver FIGURA 04). As outras

duas espécies (*Gracilaria birdiae* e *Gracilaria dominigensis*) foram coletadas diretamente do banco natural. Todas as espécies, após serem coletadas foram lavadas para retirada de sedimentos, armazenadas em caixas térmicas e transportadas até a Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, local onde foi realizado os processos de extração do óleo, análise físico-química deste e do bagasso resultante.

Figura 13: Localização geográfica do Cultivo de Algas



Fonte: FBC, 2012

4.2. Lavagem das algas

As algas foram coletadas na comunidade da Barrinha, no município de Icapuí – CE, lavadas com água corrente para retirada do excesso de sedimentos e em seguida, já no laboratório, com água destilada. O material foi mantido em congelador, sendo retirado aos poucos para a etapa de secagem.

4.3 Secagem das algas

Utilizaram-se os seguintes procedimentos:

1. Deixar as algas expostas em uma bandeja de alumínio por dois dias a luz do sol. Esse procedimento lento foi utilizado com a finalidade de usar essas algas no método de extração de óleo à frio, já que o mesmo não necessita que as algas estejam completamente secas.
2. Secar as algas em estufa em uma temperatura, variando entre 60-65°C por 48 horas.

4.4 Extração de óleo das macroalgas

4.4.1 Extração à quente: (via Soxhlet)

As macroalgas após secas em estufa foram trituradas em um liquidificador caseiro, pesadas e colocadas em saches feito de papel de filtro previamente pesado. Em seguida o material foi submetido extração num sistema soxhlet durante o tempo necessário para extrair ao máximo o material lipídico, utilizando-se hexano para extração. Depois da extração, o solvente foi evaporado em um evaporador rotativo, Quimis Q344B2, a pressão reduzida para obtenção dos lipídios.

Figura 14: Sistema soxhlet utilizado para extração à quente do material lipídico



Fonte: Gomes, 2011

4.4.2 Extração à frio (uso de solventes):

Nesse processo de extração utilizamos as macroalgas que foram submetidas ao processo de secagem de 07 dias, uma vez que nesse método não há necessidade da amostra estar completamente seca.

Após a trituração do material, este foi colocado em contato com uma mistura de cloroformio/metanol. Neste processo o material lipídico passou para a fase orgânica podendo ser separado do bagaço por filtração e dos solventes por evaporação destes. (BLIGH e FOLCH, 1959).

A extração foi realizada seguindo basicamente a metodologia de Bligh e Dyer (1959) modificada, conforme descrito na literatura (CHRISTIE 1982). Cerca de 100 g da amostra

úmida (com cerca 66,2% de umidade) foi homogeneizada por 4 horas, em um béquer de 500 mL, com 100 mL de clorofórmio e 200 mL de metanol. Filtrou-se a mistura a vácuo e o resíduo filtrado foi homogeneizado com 100 mL de clorofórmio, realizando-se nova filtração a vácuo. Os filtrados foram combinados e transferidos para um funil de separação, agitando-se vigorosamente após adição de 100 mL de solução aquosa de KCl 0,88% (m/v). O funil de separação contendo a amostra diluída permaneceu sob refrigeração durante 2 horas para facilitar a separação das fases (ARO *et al.*, 2000; apud FELTES, 2006). Posteriormente a fase inferior foi recolhida e filtrada, adicionando-se sulfato de sódio anidro para remoção da água residual. Os reagentes de grau analítico utilizados no processo foram previamente desgaseificados em um ultra-som. O material obtido foi congelado para posteriores análises.

4.5 Estudo sistemático para determinar o melhor método de extração dos ácidos graxos das macroalgas

Apesar dos métodos de Bliger e Folch serem muito utilizados nas extrações de lipídios em geral, testamos novas misturas de solventes, tempos e condições de extração com a finalidade de elevar o teor de lipídios extraído das macroalgas.

4.5.1. Diclorometano: Metanol: Água, 50:25:10 por 4h (ABD EL-MONEIM; M.R. AFIFY; E.A. SHALABY; S.M.M. SHANAB – 2010).

Pesou-se 10g de macroalga em pó e colocou-se em balão de fundo redondo de 100mL com 6 ml da mistura de diclorometano: metanol, 2:1, respectivamente. Agitou-se por 4 horas a temperatura ambiente e em seguida, filtrou-se a vácuo. Lavou-se os resíduos com 30 ml da mistura de diclorometano: metanol, 1:1. Juntou-se as fases e em seguida, lavou-se com água destilada. Colocou-se sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente em rotorevaporador.

4.5.2 Cloroformio: metanol: água, 50:25:10 por 4h (GEMMA VICENTE, L.F. BAUTISTA; R. RODRIGUES; F.J. GUTIERREZ; I. SADABA; R.MR.-VASQUEZ; S. TORRES-MARTINEZ; V. GORRE – 2009).

Pesou-se 10g de macroalga em pó em 30 ml de metanol, 10 ml de água e 60 ml de clorofórmio, durante 4 horas. Mantem-se sob agitação a temperatura ambiente.

Filtrou-se e evaporou-se o solvente a vácuo.

4.5.3. Clorofórmio: metanol, 1:1 por 24h (J Biol Chem.1957)

Pesou-se 10g de macroalga em pó em 30 ml de metanol e 30 ml de clorofórmio, durante 4 horas. Mantem-se sob agitação a temperatura ambiente.

Filtrou-se e evaporou-se o solvente a vácuo.

4.5.4. Éter de petróleo por 24h (Orhan, B. Sener & T. Atici, 2003)

Pesou-se 10g de macroalga em pó 60 ml de de éter de petróleo, durante 24 horas. Mantem-se sob agitação a temperatura ambiente.

Filtrou-se e evaporou-se o solvente a vácuo. Antes das 24 horas foram adicionados mais alguma quantidade, pois esse reagente evapora com facilidade.

4.5.5. Hexano: éter etílico, 1:1 por 24h (ABD EL-MONEIM; M.R. AFIFY; E.A. SHALABY; S.M.M. SHANAB – 2010)

Pesou-se 10 g de macroalga em pó e colocou em um balão de fundo redondo de 250ml, em seguida adicionou-se uma mistura de hexano: éter etílico, na proporção de 1:1.

A mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas. Após esse tempo, filtrou-se e evaporou-se o solvente.

4.5.6. Clorofórmio: metanol, 2:1 por 4h (GOMES, 2011)

Cerca de 10 g da amostra úmida (com cerca 66,2% de umidade) foram homogeneizadas por 4 horas, em um béquer de 500 mL, com 100 mL de clorofórmio e 100 mL de metanol. Após completa homogeneização, observou-se uma única fase. Filtrou-se a mistura a vácuo e o resíduo filtrado foi homogeneizado com 100 mL de clorofórmio, realizando-se nova filtração a vácuo. Os filtrados foram combinados e transferidos para um funil de separação, agitando-se vigorosamente após adição de 100 mL de solução aquosa de KCl 0,88% (m/v). O funil de separação contendo a amostra diluída permaneceu sob refrigeração durante 2 horas para facilitar a separação das fases (Aro *et al.*, 2000; apud FELTES, 2006). Posteriormente, a fase inferior foi recolhida e filtrada, em seguida adicionou-se sulfato de sódio anidro para remoção da água residual. Os reagentes de grau analítico utilizados no processo, foram previamente desgaseificados em um ultra-som.

4.5.7. Extração de Lipídios de macroalgas por ultrassom usando hexano

O aparelho utilizado foi uma Lavadora Ultrassônica Plus 3LD. Voltagem: 127 a 220 VAC/ 50-60 HZ.

Foram utilizados 1g de cada macroalga (*Gracilaria birdiae*, *Gracilaria dominigensis* e *Gracilaria caudata*) em pó. Para cada uma, adicionou-se 50 ml de hexano.

4.5.8. Extração de Lipídios de macroalgas por ultrassom aplicando o método Bligh and Dyer

No método Bligh & Dyer modificado, foram preparadas amostras de 10 mg da biomassa algal seca e em cada uma delas adicionados 4 mL de solvente metanol, 4 mL de clorofórmio e 3,6 mL de água destilada. Das amostras extraídas, uma foi realizada através de um banho ultrassônico, por 01 hora. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta, foi retirada a fração mais densa do sistema trifásico (clorofórmio + óleo) e transferida para um balão previamente pesado, cujo solvente foi removido em rotaevaporador a 60 °C.

4.6. Teor de óleo extraído

Foi feito pelo método gravimétrico, comparando-se a massa submetida à extração com a massa de óleo obtida no final do processo. Nos cálculos foi usada a equação 2.

$$\% \text{ óleo} = p_i - p_f / p_i * 100$$

Onde: p_i = massa de alga submetida a extração e p_f = massa de óleo obtida.

4.7. Preparação de biodiesel de lipídios das macroalgas

A proposta inicial do projeto era seguir uma abordagem sintética com ênfase na reação de transesterificação, in situ ou via uma reação de hidro-esterificação dos lipídios extraídos das algas.

4.7.1. Reação de transesterificação in situ das macroalgas *Gracilaria caudata*, *Gracilaria birdiae* e *Gracilaria domingensis* em pó, usando hexano como solvente e iodo sublimado como catalisador, método adaptado de (SUN, 2010; VELASQUES-ORTA, 2012 ; KAIMAL, 2002).

Pesou-se 10g de macroalgas em um balão de fundo redondo de 250 ml, adicionou-se 50ml de hexano, 30ml de etanol ou metanol e 50mg de iodo. A mistura foi refluxada por 24 horas, após esse tempo, resfriou-se, filtrou-se e em seguida diluiu-se com éter etílico e lavou-

se a fase orgânica com uma solução de tiosulfato de sódio, com água destilada e secou-se sob sulfato de sódio anidro.

4.7.2. Transesterificação dos lipídios das algas *Gracilaria caudata*, *Gracilaria birdiae* e *Gracilaria domingensi*).

Pesou-se a massa adequada de lipídios em um balão de fundo redondo de 100 mL. Em seguida, adicionou-se 30 ml de metanol absoluto e 30 mg de iodo sublimado. Em seguida, refluxou-se a mistura por 24 horas.

Após esse tempo, resfriou-se a mistura a temperatura ambiente. Em seguida, diluiu-se com 30 ml de éter etílico e transferiu-se a mistura para um funil de separação e lavou-se a fase orgânica com 3 x 30 mL de uma solução de tiosulfato de sódio, água destilada.

Em seguida, colocou-se o sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente à vácuo, para obter os ésteres metílicos.

4.7.3. Reação de hidro-esterificação dos lipídios das algas

O processo consistiu em realizar uma reação de hidrólise básica, usando um procedimento usual, com hidróxido de sódio. Na segunda etapa, temos a reação de esterificação usando iodo sublimado como catalisador.

4.7.4. Hidrólise dos lipídios das algas *Gracilaria caudata*, *Gracilaria birdiae* e *Gracilaria domingensis*.

Pesou-se as massas adequadas do óleo das algas em um balão de 50 mL de fundo redondo. Em seguida, adicionou-se 10 mL de uma solução etanólica de KOH 1M.

Em seguida, a mistura foi mantida sob refluxo em banho de óleo e sob agitação por 1 hora. Após esse tempo, resfriou-se à temperatura ambiente. Adicionou-se 30 mL de água destilada e transferiu-se para um funil de separação e extraiu-se com éter de petróleo (3x30 mL).

Acidificou-se a fase aquosa com HCl 1M e extraiu-se com éter etílico. Secou-se a fase etérea com sulfato de sódio anidro.

Em seguida, evaporou-se o solvente para obter os ácidos graxos.

4.7.5. Esterificação dos ácidos graxos das algas *Gracilaria caudata*, *Gracilaria birdiae* e *Gracilaria domingensis*.

Pesou-se a massa de do óleo de alga adequada em um balão de fundo redondo de 50 mL. Em seguida, adicionou-se 30 ml de metanol absoluto e 30 mg de iodo sublimado e refluxou-se a mistura por 12 horas.

Após esse tempo, resfriou-se a mistura a temperatura ambiente. Em seguida, diluiu-se com 30 ml de éter etílico e transferiu-se a mistura para um funil de separação e lavou-se a fase orgânica com 3 x 30 mL de uma solução de tiosulfato de sódio.

Em seguida, colocou-se o sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente à vácuo, para obtenção do ésteres metílicos.

4.8. Avaliação da Umidade das algas

A umidade foi determinada pesando as três amostras de algas úmidas. Em seguida, foram submetidas a uma temperatura de 105 °C, durante 24 horas em uma estufa. O valor da umidade foi expresso em percentagem, tomando como base a perda de massa (água) em relação ao valor inicial. O valor adotado como umidade das macroalgas, foi feito por método gravimétrico, comparando-se a massa submetida à secagem, numa temperatura pré-determinada com a massa obtida após o processo de secagem. Nos cálculos foi usada a equação 1.

$$\% \text{ água} = \frac{(P - p) * 100}{P}$$

Onde: P = peso da amostra úmida e p = peso da amostra seca

4.9. Matéria Orgânica

A determinação do teor de matéria orgânica foi feita pelo método gravimétrico, segundo Wetsel e Likens (1991). As amostras foram resfriadas em dessecador por 1 hora, de modo que a interferência da umidade do ar fosse minimizada. Foram utilizados cadinhos de porcelana previamente lavados, secos, identificados e tarados para a pesagem de 0,1 grama de sedimento seco, em balança analítica. A ignição em mufla foi à temperatura de 550°C por um período de 4 horas. O resfriamento foi feito no dessecador por 2 horas. Em seguida os cadinhos foram pesados novamente. O teor de matéria orgânica foi determinado através da diferença entre o peso seco de sedimento e o peso após a ignição, considerando o peso seco (% PS), conforme a equação abaixo:

$$\% \text{ de Matéria Orgânica} = (\text{Peso após Ignição}_{(g)} \times 100) / \text{Peso Seco}_{(g)}$$

4.10. Determinação do teor de Cinzas

Cinzas é o conjunto de materiais inorgânicos presentes nas células, que pode ser medido após a destruição completa da matéria orgânica. Componentes estruturais (por exemplo, silício de frústulas) e componentes de moléculas orgânicas complexas (como metais co-fatores de enzimas) são exemplos de elementos que constituem as cinzas, que são abundantes em organismos marinhos.

A cinza de uma amostra de alimento é o resíduo inorgânico que permanece após a queima de matéria orgânica de uma amostra. A cinza é formada, principalmente, de grandes quantidades de K, Na, Ca e Mg; pequenas quantidades de Al, Fe, Cu, Mn e Zn e traços de Ar, I, e outros elementos.

A determinação quantitativa das cinzas totais foi realizada também de acordo com o método descrito na Farmacopéia Brasileira (1988). Para isso, foram pesados 3 g do pó de algas pulverizadas e em seguida, transferidos para cadinhos de porcelana previamente tarados. Após a distribuição uniforme das amostras nos cadinhos, as mesmas foram incineradas na temperatura de 600 °C. Após esta etapa foram calculadas as percentagens de cinzas em relação ao pó que foi submetido ao processo de secagem.

As amostras que foram mantidas em forno mufla, a 550°C por 24 horas foram posteriormente, pesadas outra vez, onde foi dada a diferença entre a primeira e a última pesagem que forneceu a massa das cinzas existente na amostra, de modo que a diferença entre a primeira e a segunda pesagem indicou a massa seca total (orgânico + cinzas) das amostras.

A determinação das cinzas e da matéria orgânica foi obtida em triplicata através da diferença entre o peso seco de sedimento e o peso após a ignição, considerando o peso seco (% PS), conforme a equação abaixo:

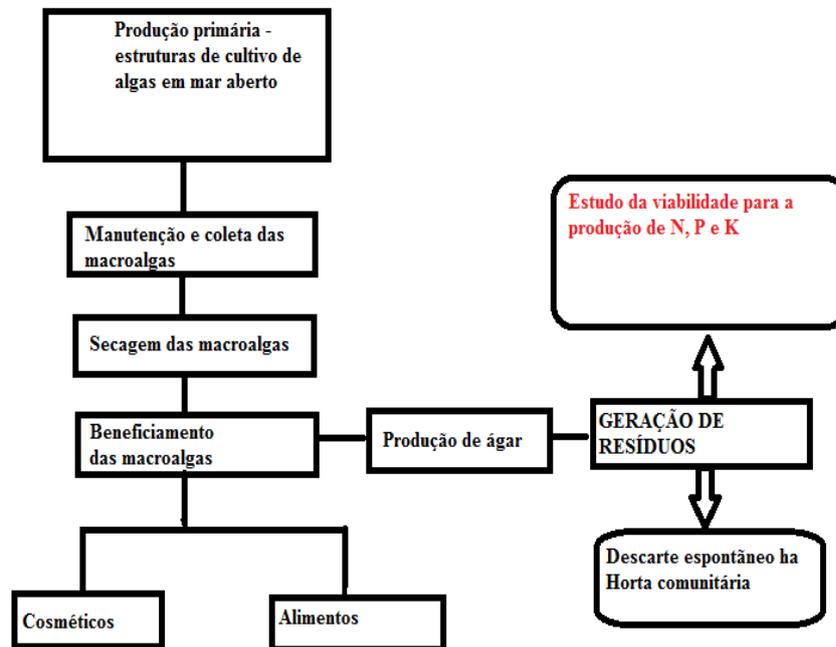
$$\% \text{ de Matéria Orgânica} = (\text{Peso após Ignição}_{(g)} \times 100) / \text{Peso Seco}_{(g)}$$

4.11. Análises dos resíduos de algas

Foram utilizados no estudo dois tipos de resíduos de algas:

1. Resíduos reutilizados após a extração do óleo;
2. Resíduos reutilizados após a extração do ágar pelo Projeto “Mulheres de Corpo e Alga”;

Figura 15: Fluxograma da obtenção do Resíduo 2



FONTE: COSTA et al, 2012

Com as amostras dos Resíduos 1, foi feita a determinação da matéria orgânica, nitrogênio, fósforo total, potássio e cinzas; já com as amostras dos Resíduos 2 foi determinado apenas o teor de nitrogênio, fósforo e potássio.

Nas análises do Nitrogênio total, Fósforo total e Potássio foram utilizadas 2g das amostras de cada espécie (2g de *G. birdiae*, 2g de *G. caudata* e 2g de *G. birdiae*). No resíduo 2 foi utilizado 2g de *G. caudata* (única espécie utilizada no beneficiamento)

Para a determinação de Nitrogênio, Fósforo e Potássio foi utilizada a mesma metodologia para os dois diferentes resíduos (EMBRAPA, 2009).

4.11.1. Determinação de Fósforo e Nitrogênio total

As amostras foram descongeladas por 10 minutos em forno micro-ondas. Após 1 hora na estufa, foram levadas para a mufla a 500°C por 2 horas. Nas análises de Nitrogênio e Fósforo total, foi feita a extração com solução de HCl a 1 M a partir do processo sem digestão. Adicionou-se 25 ml de HCl em cada amostra. Em seguida as amostras foram aquecidas a 80°C por 15 minutos em banho-maria e 15 minutos no agitador circular. Realizou-se a filtração a vácuo após esfriamento. A cada 10 ml da amostra foi feita a diluição com 100 ml de água destilada (EMBRAPA, 2009).

Nas amostras de Fósforo (P) foi adicionado 1 ml de persulfato de Potássio a 400 ppm. O processo seguinte foi levar as amostras a uma autoclave por 2h a fim de transformar todo o fósforo em ortofosfato. Neste foi feita a adição das soluções de Ácido ascórbico (1,25 mL), Ácido Sulfúrico (3,125 mL), Molibdato de amônio (1,25 mL), Tartarato de potássio e Antimônio (0,625 ml). Em seguida foi feita a leitura da amostra líquida em espectrofotômetro de UV-vis previamente calibrado e com uma curva padrão de quantificação previamente traçada. Nas amostras de nitrogênio total, após a extração as mesmas foram autoclavadas por 2 horas, em uma pressão e temperatura de 1,2 kgf/cm² e 121 °C, respectivamente. Após isso, as amostras foram resfriadas e lidas a concentração no espectrofotômetro de UV-vis previamente calibrado e com uma curva padrão de quantificação previamente traçada (EMBRAPA, 2009).

4.11.2. Determinação de Potássio

A preparação das amostras foi realizada por meio de secagem em estufa com circulação forçada de ar quente a 65-70°C, sem a lavagem do material. As amostras foram aquecidas por 15 minutos em banho-maria e mais 15 minutos no agitador circular, a 250 rpm. Em seguida a água evaporada foi corrigida até o peso inicial (EMBRAPA, 2009).

Para a extração foram utilizados 10ml da amostra e adicionados 25ml de HCl a 1M. Após aquecida e agitada, a amostra foi decantada por uma noite (EMBRAPA, 2009).

As análises foram realizadas em duplicata, no fotômetro de chama, da marca QUIMIS.

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

A caracterização do teor e dos tipos de ácidos graxos das macroalgas estudadas foi de grande relevância para o estudo do aproveitamento destes óleos, podendo indicar se os mesmos podem ser uma alternativa viável para uso na produção de biodiesel, principalmente por se tratarem de fontes renováveis, de grande variedade e fácil biodegradabilidade.

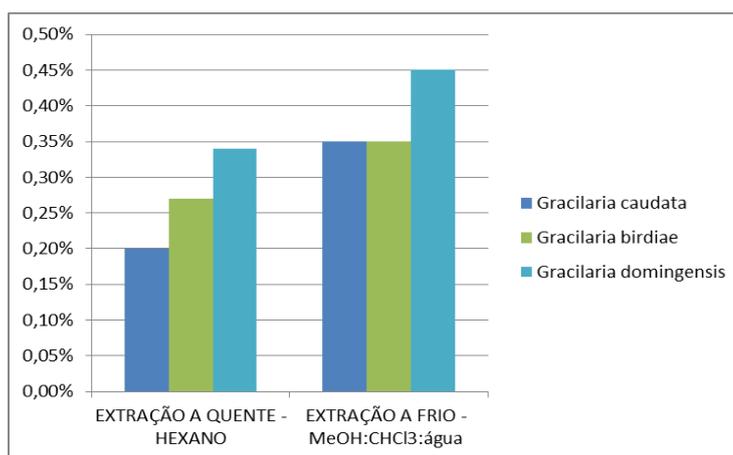
O trabalho foi realizado em parceria com o Projeto “Mulheres de Corpo e Algas” apoiado pela Fundação Brasil Cidadão, no cultivo e beneficiamento de algas em Icapui – CE, devido à experiência que o grupo tem nesta área. Este trabalho em conjunto propiciou o repasse de métodos que melhoraram a qualidade do material produzido neste projeto como forma mais eficaz de limpeza e secagem das algas, bem como comprovou a eficiência do reaproveitamento do bagaço que já vinha sendo usado intuitivamente como adubo, mesmo sem a dosagem dos ingredientes que tem a capacidade de melhorar a qualidade do solo. Assim o desenvolvimento do trabalho deixou um retorno para a comunidade da Praia da

Barrinha, através do conhecimento em reutilizar uma enorme quantidade de resíduo de algas (que se perdem após a extração do ágar, para ser utilizado em cosméticos e alimentos) como adubo ou mesmo como ração para animais ou seres humanos.

5.1. Extrações pelos métodos à frio e à quente:

Os lipídios totais foram extraídos a frio pelo método de Bligh-Dyer, uma mistura de MeOH:CHCl₃:H₂O (20:10:7mL), e a quente pela via Soxhlet utilizando 100g de amostra a 50ml de hexano. A quantificação dos lipídios totais foi realizada em triplicata, pelo método gravimétrico. O conteúdo de lipídios totais obtido nas amostras foi de 0,35% para *Gracilaria caudata*, 0,35% para *Gracilaria birdiae* e 0,45% para *Gracilaria dominigensis*, pelo método à frio, enquanto que o das amostras extraídas a quente foi de 0,20% para *Gracilaria caudata*, 0,27% para *Gracilaria birdiae* e 0,34% para *Gracilaria dominigensis*.

Gráfico 01: Teor de lipídios extraídos das três macroalgas pelos métodos à quente e à frio



O gráfico 01 mostra os valores obtidos para os rendimentos em lipídios totais nas amostras e métodos testados. É importante salientar que o solvente usado (*n*-hexano) é apolar e não tem a mesma eficiência para extrair os lipídios ligados (polares) como outros solventes de maior polaridade. Assim, como esperado para todas as algas o método a frio foi mais eficiente e resultou em maiores % de extração. A alga mais produtiva pelos dois métodos foi a *Gracilaria dominigensis*, seguida da *Gracilaria birdiae* e da *Gracilaria caudata* no método a quente, sendo que no método a frio não há diferença entre estas duas últimas. De forma geral o método a frio permite obter aproximadamente 25 % a mais de óleo que o método a quente. Apesar de o método de Bligh e Dyer ter apresentado melhor rendimento, a metodologia de Soxhlet rendeu resultados que ficaram próximos dos encontrados na literatura (0,20% para

Gracilaria caudata, 0,27% para *Gracilaria birdiae* e 0,34% para *Gracilaria dominigensis*). (GEMMA, 2009).

O bom rendimento em lipídios totais, em todas as amostras analisadas (figura 01), proporcionado pelo método de Bligh e Dyer pode ser explicado pela ampla faixa de polaridade apresentada pela mistura de solventes utilizada. Clorofórmio e metanol são mais polares que *n*-hexano e, dessa forma, há uma extração eficiente de lipídios polares e apolares.

A influência da polaridade incentivou um estudo da extração com diferentes solventes no método a frio visando verificar se os mesmos poderiam proporcionar um teor maior de óleo extraído das algas. Estes experimentos e seus resultados são discutidos a seguir.

5.2. Efeito do solvente no rendimento da extração a frio

Apesar dos métodos de Bligh-Dyer e Soxhlet serem muito utilizados nas extrações de lipídios em geral, testamos novas misturas de solventes, tempos e condições de extração com a finalidade de elevar o teor de lipídios extraído das macroalgas.

5.2.1. Diclorometano: Metanol: Água, 50:25:10 (ABD EL-MONEIM; M.R. AFIFY; E.A. SHALABY; S.M.M. SHANAB – 2010).

Nessa extração foi obtido um teor considerável de lípidos a partir do método Diclorometano: metanol:água, 50:25:10 por 4h, onde na espécie *G. domingensis* chegou a quase 3%.

Obteu-se 1,83% de óleo de *G. caudata*; 2,64% de óleo de *G. birdiae* e 2,92% de óleo de *G. dominigensis*.

As misturas de solventes aquosos também foram eficientes com a vantagem de requerer um menor volume de solvente, porém com o inconveniente de demandar maior energia para remoção da água do solvente (Gandhi *et al.*).

Sabe-se que os solventes, do tipo hexano, extraem tanto no método a quente ou frio ou via ultrassom, apenas os compostos apolares, enquanto os solventes clorados, usados no método de Bligh e suas adaptações, extraem os compostos apolares e os compostos polares, por isso esse método apresenta os melhores resultados.

Nos trabalhos de comparação de métodos para extração de lipídios de Puja *et al.*, (2011) o método Diclorometano foi o que obteve melhores resultados, de 1 a 3% do teor de óleo obtido das espécies de *Gracilaria*.

5.2.2. Clorofórmio: metanol: água, 50:25:10 (GEMMA VICENTE, L.F. BAUTISTA; R. RODRIGUES; F.J. GUTIERREZ; I. SADABA; R.MR.-VASQUEZ; S. TORRES-MARTINEZ; V. GORRE – 2009).

Uma característica interessante que este método apresentou durante o experimento foi produzir um rendimento superior aos demais métodos (especialmente na espécie *G. dominigensis*). Este poder de extração foi atribuído, entre outros fatores, ao processo de homogeneização vigorosa aplicado nesta metodologia. Neste método obteve-se 1,03% de óleo de *G. caudata*; 2,16% de óleo de *G. birdiae* e 3,81% de óleo de *G. dominigensis*. O poder de extração também tem íntima relação com o fato de que nesse método uma quantidade insuficiente de metanol e água esteve presente para a remoção dos não-lipídios, os quais são geralmente solubilizados pelos lipídios polares na fase orgânica.

As amostras extraídas com clorofórmio, metanol e água nesta proporção apresentaram um alto rendimento em óleo, já que o metanol possui um poder de solvatação superior ao dos outros solventes usados, extraíndo os lipídios e os não-lipídios da matriz em estudo.

De acordo com Bligh e Dyer (1959) e Christie (1989), o sistema monofásico, obtido utilizando clorofórmio-metanol-água na proporção de 50:25:10, possui as propriedades ideais para uma extração eficiente. Esse sistema supera as interações entre os lipídios e o tecido da matriz estudada e também os dissolve prontamente.

Nos trabalhos de Gressler et al. (2010), os teores de lipídios total encontrados nas espécies *G. domingensis* e *G. birdiae*, foram, 1,3%, para ambas as espécies, utilizando o mesmo método de extração, Clorofórmio/metanol 2:1.

5.2.3. Clorofórmio: metanol, 1:1 (J BIOL CHEM.1957)

As três macroalgas estudadas exibiram valores quase semelhantes: 0,17% de óleo de *G. caudata*; 0,50% de óleo de *G. birdiae* e 0,60% de óleo de *G. dominigensis*. Já em Puja et al., (2011) os valores de lipídios extraídos com este método, chegam até a 1,3% quando usadas proporções maiores de clorofórmio/metanol, 2:1.

5.2.4. Éter de petróleo (ORHAN, B. SENER e T. ATICI, 2003)

Nesta extração com solvente éter de petróleo não houve bons resultados de rendimento no teor de lipídios totais. Obteve-se 0,71% de óleo de *G. caudata*; 0,24% de óleo de *G. birdiae* e 0,22% de óleo de *G. dominigensis*.

No trabalho de MANIRAKIZA et al 2001, verificou-se que o método de extração de lipídios usando solvente como éter de petróleo, separadamente em cada extração, foi conveniente para extração da fração lipídica apenas de amostras sólidas que continham alto teor de lipídios, tais como chocolate em pó, margarina, leite em pó e ração para frango.

5.2.5. Hexano: éter etílico, 1:1 (ABD EL-MONEIM; M.R. AFIFY; E.A. SHALABY; S.M.M. SHANAB – 2010)

Os resultados deste método, 0,17% de óleo de *G. caudata*; 0,47% de óleo de *G. birdiae* e 0,46% de óleo de *G. dominigensis* comprovam que o hexano, um solvente apolar, extrai com menor eficiência os lipídios polares, visto que a solubilidade dos lipídios polares é menor em solventes hidrocarbonetos, como o hexano, que em clorofórmio.

Portanto, a baixa eficiência da mistura hexano - éter etílico para a extração de lipídios polares pode ser explicada pelo fato de que a parte polar dessa mistura é menos polar que o metanol, o qual constitui a porção polar das metodologias propostas por Folch *et al.* e Bligh e Dyer.

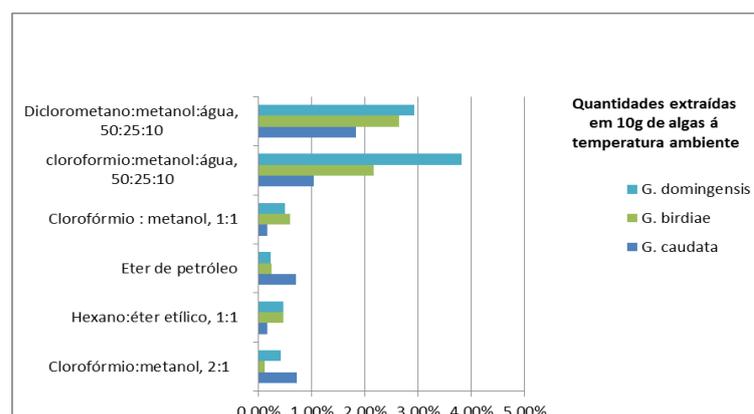
5.2.6. Clorofórmio: metanol, 2:1 (GOMES, 2011)

Obteu-se 0,72% de óleo de *G. caudata*; 0,12% de óleo de *G. birdiae* e 0,41% de óleo de *G. dominigensis*.

Os métodos de Bligh e Dyer, usando clorofórmio-metanol nesta proporção modificada, foram mais adequados para extração de amostras líquidas, tais como vegetais solubilizados, leite, ovos e plasma humano.

O presente estudo mantém diferenças pouco significativas aos resultados de Gressler et al., (2010), que obteve variações de 1 a 1,3% de lipídio total utilizando o mesmo método.

Gráfico 02: Teor de óleo extraído usando diferentes misturas de solventes.



O teor de lipídios de *G. domingensis* pelo método cloroformio: metanol: água, 50:25:10 foi cerca de 4%, 2 vezes maior do que em *G. birdiae* e 4 vezes maior que o teor de lipídios de *G. caudata* no mesmo método. Enquanto isso, no método Hexano: éter etílico 1:1 por 24h mostraram um teor de lipídios semelhante nas três espécies algais. Um teor também elevado de lipídios foi extraído a partir do método Diclorometano: metanol: H₂O, 50:25:10 por 4h, onde na espécie *G. domingensis* chegou a quase 3%. Enquanto isso, o método Éter de petróleo por 24h teve a menor eficiência nas espécies *G. domingensis* e *G. birdiae*. Além disso, Gressler (2010) também demonstrou a extração de um teor mais elevado de lipídios de *G. domingensis* e *G. birdiae*, pelo método cloroformio: metanol:H₂O, 50:25:10 por 4h.

Em Gemma et al, 2009, os lipídios de microalgas foram extraídos usando três misturas de solventes: cloroformio: metanol (C: M), cloroformio: metanol: H₂O (C: M: W) e n-hexano. Neste estudo essa mistura binária C: M conduz aos valores mais elevados de lipídios extraídos 19,9%. Ainda neste trabalho, o método de extração com n-hexano foi realizada a fim de evitar o uso de solventes clorados, por causa do efeito adverso destes solventes no meio ambiente. Contudo os resultados foram inferiores 14,27%.

Neste trabalho, ambas as misturas com cloroformio e metanol atingiram teores mais altos de lipídios extraídos (aproximadamente 4,0%). Tradicionalmente, a mistura binária de cloroformio e metanol (2:1 v / v) (J. FOLCH, 1957) e o uso de sistemas de solvente ternário C: M: W (E.G. BLIGH, 1959) têm sido considerados métodos simples e rápidos para a extração e purificação de lipídios a partir de materiais biológicos (M. ZHU, et al, 2002). O segundo método (C: M: água) envolve uma diminuição substancial do volume de solvente usado no procedimento de extração em comparação com o C: M sistema. O método de extração com n-hexano (X. MIAO, 2006 e J. RUIZ-JIMENEZ et al, 2004) foi realizada a fim de evitar o uso de solventes clorados, por causa do efeito adverso destes solventes no meio ambiente. Muitos solventes têm sido estudados para substituir o cloroformio na extração de lipídios (F. SMEDES, 1999), n-hexano vem sendo uma alternativa interessante que fornece extração de lipídios eficiente (X. MIAO, 2006). No entanto, a sua utilização como um solvente de extração levou à menor quantidade de lipídios extraídos (0,17 a 0,47%).

5.2.7. Extração de lipídios de macroalgas por ultrassom usando hexano

Perecebe-se que a aplicação do ultrassom no método tradicional utilizando Hexano aumentou o rendimento do teor de lipídios, principalmente na espécie *Gracilaria caudata*,

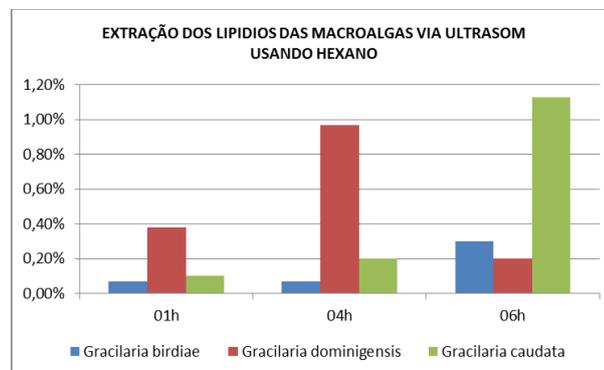
onde no gráfico 01 o rendimento nesta espécie foi de 0,20%, chegando a atingir uma extração de 1,13% utilizando o mesmo solvente no ultrassom.

Figura 16 e 17: Extração de Lipídios usando o Ultrassom



O ultrassom melhora a mistura e aumenta a reatividade química dos reagentes. Isso reduz o tempo necessário para a conversão química em até 90%.

Gráfico 03: Extração de lipídios via ultrassom

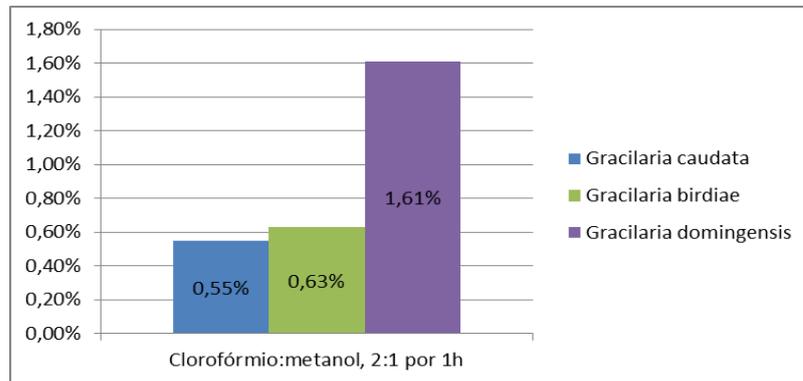


Segundo Cecchi (2003), o ultrassom quebra a parede celular mecanicamente, pela cavitação de forças de cisalhamento, que facilita a transferência de lipídios da célula para o solvente.

Ultra-som é uma ferramenta poderosa para acelerar muitas operações físicas (VILKHU et al., 2008). Neste trabalho foi utilizado para aumentar a extração de óleo de cerca de três vezes do convencional. Além disso, apresentou outras vantagens tais como o tempo de extração reduzido, reduzido consumo de solventes e maior penetração do solvente em materiais celulares. Este método de pré-tratamento também pode fornecer mais benefícios econômicos e ambientais com aspectos de saúde e segurança (VILKHU et al., 2008).

5.2.8. Extração de Lipídios de macroalgas por Ultrassom aplicando o método Bligh and Dyer

Gráfico 04: Extração de lipídios via ultrassom



Neste método a frio, o ultrassom também melhorou os rendimentos comparando as três espécies no gráfico 01. Em PUJA et al 2011, o método de Bligh e Dyer modificado atingiu o mais elevado rendimento, 2% do teor de lipídios. Além disso, a aplicação do ultrassom nestes métodos convencionais estabelecidos aumentou os rendimentos em todas as três matrizes.

Segundo os resultados, o melhor método a frio é o método de Bligh e Dyer e suas variações. Isso é explicado pelo fato deste método envolver solventes polares, por exemplo: clorofórmio e metanol, enquanto o método tradicional usa hexano.

Nos trabalhos de Tamilarasan (2012), a morfologia da superfície porosa das macroalgas exposta à extração com solvente foi levada em consideração. Esse fato ocasionou a ruptura da parede celular causada pela energia ultra-sônica de cavitação. Este aumento da extração de óleo em superfície porosa levou a uma maior penetração do solvente da superfície para o interior da biomassa algal. Esta consequência é refletida no fato de que o rendimento da extração do óleo aumentou e obteve como 10,88% a partir de biomassa de algas com pré-tratamento de ultra-sons. (TAMILARASAN, 2012).

5.3. Preparação de biodiesel dos lipídios das macroalgas

As algas são uma opção econômica para a produção de biodiesel, devido à sua disponibilidade e baixo custo. Nossos resultados comprovam que o biodiesel pode ser produzido a partir de macroalgas. Desta forma as algas podem ser usadas como fonte renovável de energia. Muitos pesquisadores relataram que microalgas seriam melhor para a

produção de biodiesel. Assim, nossos resultados destacam uma produção de biodiesel a partir de macroalgas contendo menor teor de lipídios. Mais pesquisas devem ser feitas com macroalgas e microalgas para comparar a proporção de produção de biodiesel, análise química e de significância estatística.

Os rendimentos obtidos nas reações de esterificação e transesterificação das macroalgas estão dentro da faixa prevista nos trabalhos de Matias (2010) e Pinto (2012).

O óleo extraído foi maior no processo de esterificação da *G. domingensis*, de acordo com a tabela 01. A produção de biodiesel foi encontrada máxima nesta espécie e mínima na Hidrolise dos lipídios de *Gracilaria birdiae*.

Portanto, nossos resultados mostram que o biodiesel pode ser produzido a partir de macroalgas, embora contenha inferior conteúdo lipídico comparado as microalgas. Finalmente, recomendamos que o biodiesel possa ser produzido a partir de macroalgas, por ser uma fonte de energia renovável, além de ter um rápido crescimento quando cultivada.

Tabela 01: Preparação de biodiesel dos lipídios das macroalgas

Hidrolise dos lipídios de <i>Gracilaria caudata</i>	0,9800g (87,34%) dos ácidos graxos.
Hidrolise dos lipídios de <i>Gracilaria birdiae</i>	0,3600g (75%) dos ácidos graxos.
Hidrolise dos lipídios da <i>Gracilaria dominigensis</i>	0,5150g (79%) dos ácidos graxos.
Esterificação dos ácidos graxos de <i>Gracilaria caudata</i>	0,4600g (92%) de um óleo marrom escuro.
Esterificação dos ácidos graxos de <i>Gracilaria birdiae</i>	0,3950g (87,78%) de um óleo escuro.
Esterificação dos ácidos graxos de <i>Gracilaria dominigensis</i>	0,3700g (92,5%) de um óleo marrom escuro.
Transesterificação dos lipídios de <i>Gracilaria caudata</i>	0,8560g (85,6%) de um óleo marrom escuro.
Transesterificação dos lipídios de <i>Gracilaria birdiae</i>	1,200g (92,3%) de um óleo escuro.
Transesterificação dos lipídios de <i>Gracilaria dominigensis</i>	1,0180g (88,52%) de um óleo marrom escuro.

5.4. Caracterização espectroscópica do Biodiesel a partir das macroalgas

A taxa de conversão dos lipídios em biodiesel foi determinada de acordo com (MEHER,2006) seguindo a seguinte fórmula:

$C = 100 \times (2 \times A_{CH3} / 3 \times A_{CH2})$ onde temos que: A **CH3** é a área do grupo metoxila e A **CH2** é a área do grupo metilênico vizinho a função éster do biodiesel.

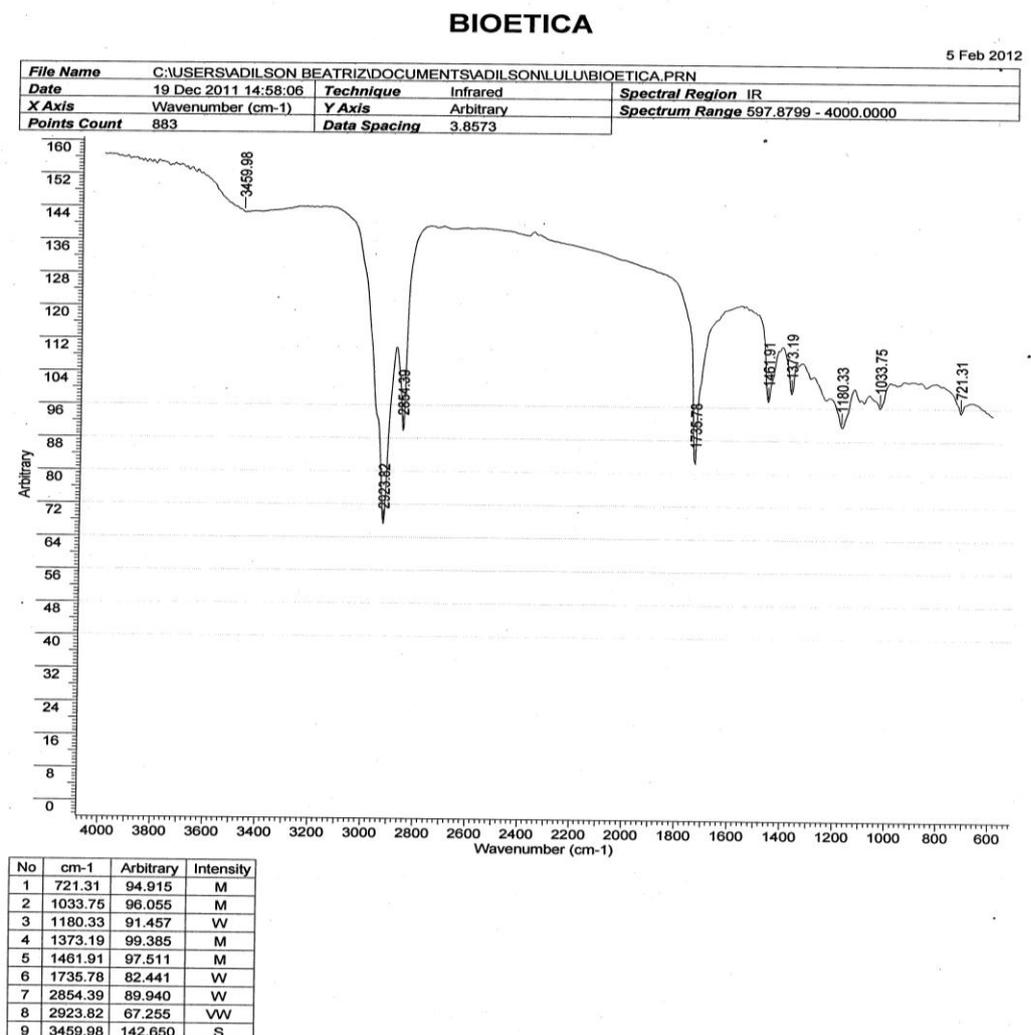
Tabela 02: Taxa de Conversão das Macroalgas

Macroalgas	Taxa de conversão (%)
<i>Gracilaria caudata</i>	93,65
<i>Gracilaria birdiae</i>	99,71
<i>Gracilaria domingensis</i>	94,50

Os ésteres metílicos dos lipídios das macroalgas apresentaram bandas de absorção no infravermelho e sinais de absorção da ressonância magnética nuclear de prótons em uma faixa de valores muito próxima para três macroalgas. Em geral, tivemos:

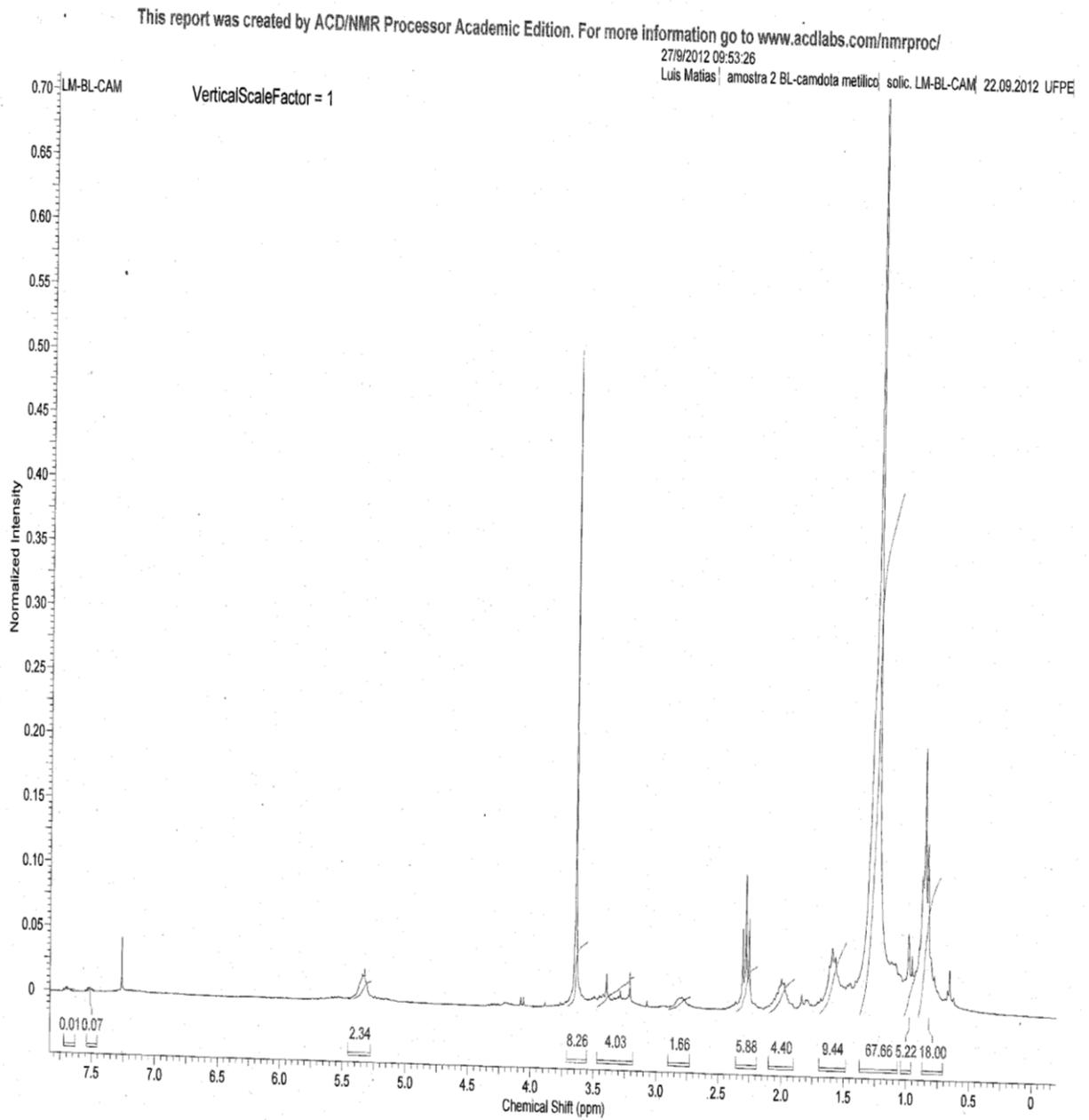
5.4.1. *Gracilaria caudata*

O espectro de infravermelho do biodiesel apresentou uma banda de absorção em 1735 cm^{-1} característica de $\text{C}=\text{O}$ de ésteres e outra banda de absorção típica de deformação axial da ligação $\text{C}-\text{O}$ em $1180,33\text{ cm}^{-1}$.

Figura 18: Espectro infravermelho da *G. caudata*

O espectro de Ressonância magnética nuclear de prótons apresentou um singlete em 3,7 ppm típico do grupo – OCH₃.

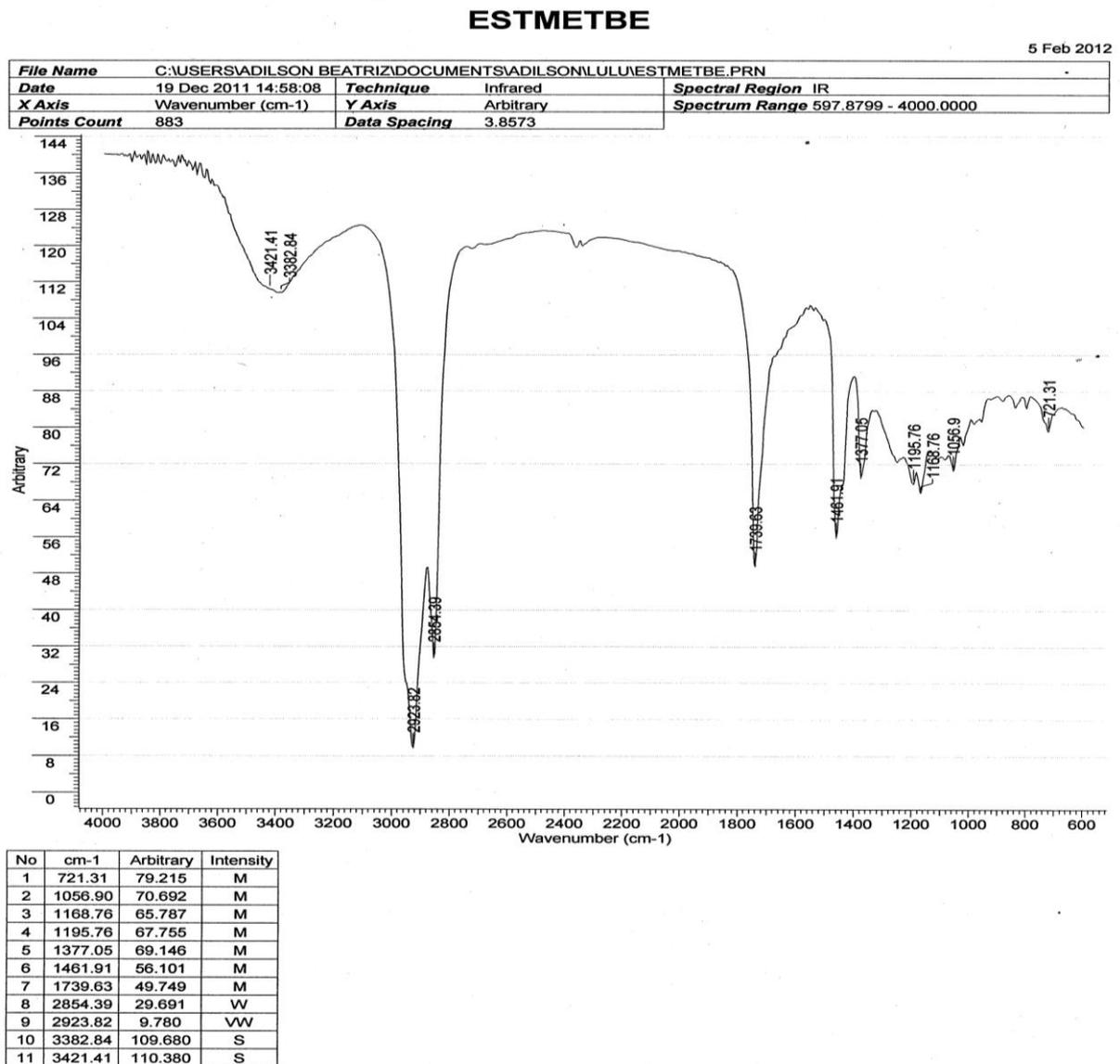
Figura 19: Espectro RMN da *G. caudata*



5.4.2. *Gracilaria birdiae*

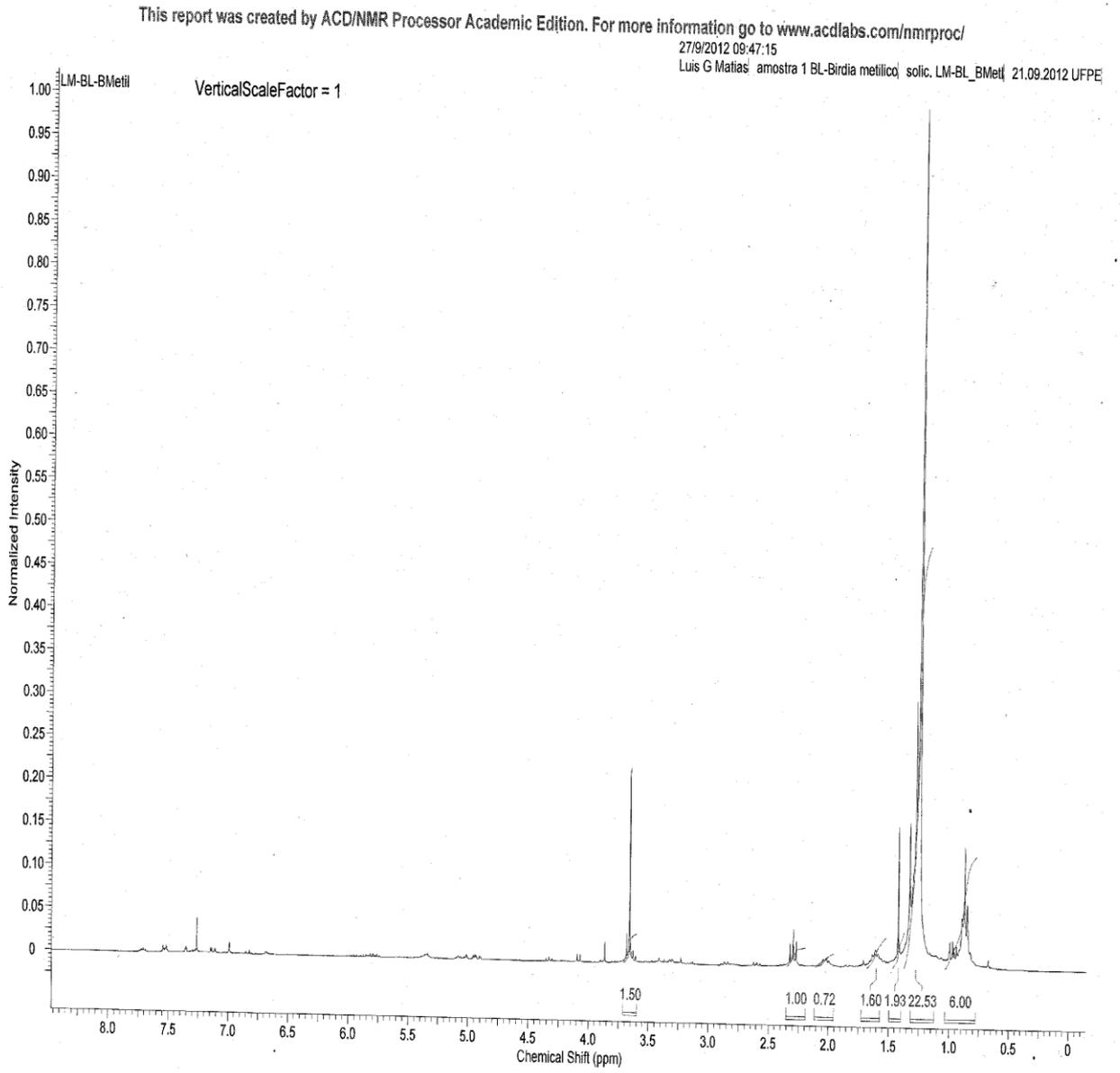
O espectro de infravermelho apresentou uma banda de absorção característica de C = O de ésteres a $1739,63\text{ cm}^{-1}$ e outra banda em $1056,9\text{ cm}^{-1}$ típica de deformação axial de C – O.

Figura 20: Espectro infravermelho da *G. birdiae*



O espectro de ressonância magnética nuclear de prótons apresentou um singlete em 3,70 ppm característico dos grupos metoxilas, - OCH₃.

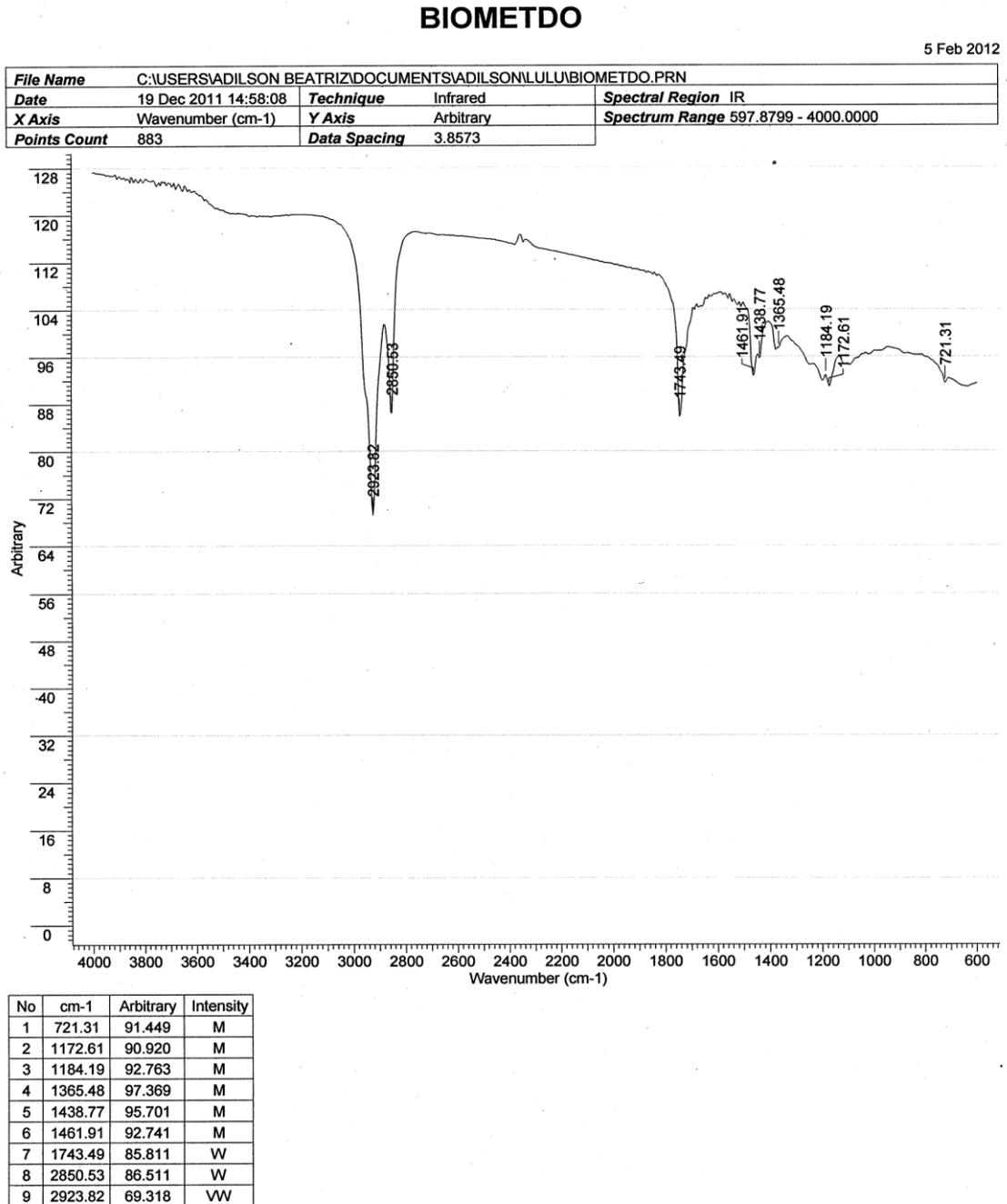
Figura 21: Espectro RMN da *G.birdiae*



5.4.3. *Gracilaria domingensis*

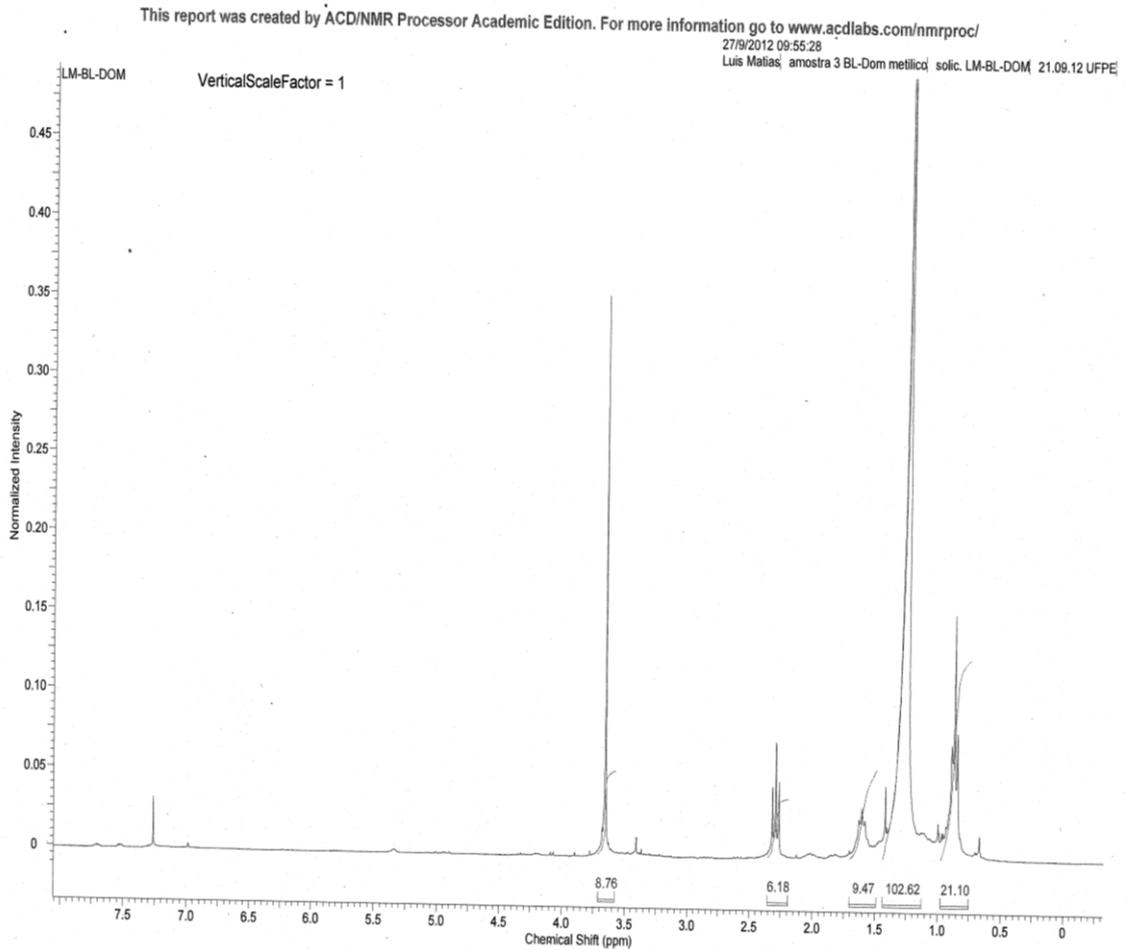
O espectro de infravermelho apresentou uma banda de absorção típica de ésteres em $1743,49\text{ cm}^{-1}$ e outra em $1172,61\text{ cm}^{-1}$ característica da ligação C – O.

Figura 22: Espectro infravermelho da *G. domingensis*



O espectro de ressonância magnética nuclear de prótons apresentou um singlete em 3,65 ppm característico do grupo metoxila.

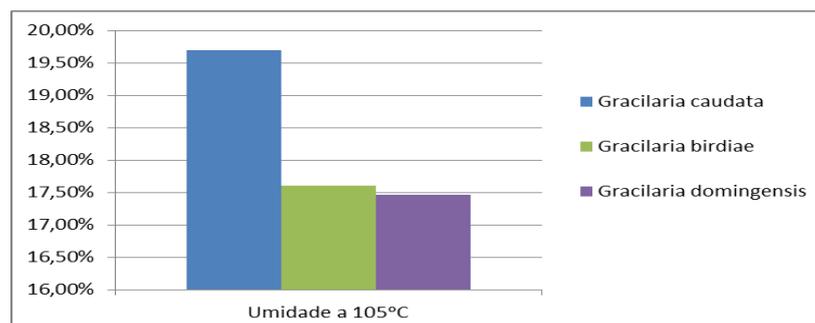
Figura 23: Espectro RMN da *G. domingensis*



5.5. Umidade das Macroalgas

Todas as macroalgas estudadas apresentaram-se com teores físico-químicos (umidade) dentro da faixa da composição das algas, conforme sumarizada por Beltrão (2000): 6-12% de umidade, 16 a 26% de proteínas e 14 a 25% de óleo.

Gráfico 05: Umidade das macroalgas



5.6. Determinação das Cinzas e Matéria Orgânica das três algas estudadas

A partir da determinação das cinzas foi possível obter informações úteis para avaliar o montante efetivo de matéria orgânica e de peso seco das macroalgas estudadas, além de permitir a comparação da capacidade relativa de acumular substâncias inorgânicas por diferentes espécies.

Os dados obtidos são mostrados nos gráficos 06 e 07.

Gráfico 06: Determinação do teor de cinzas das macroalgas em %

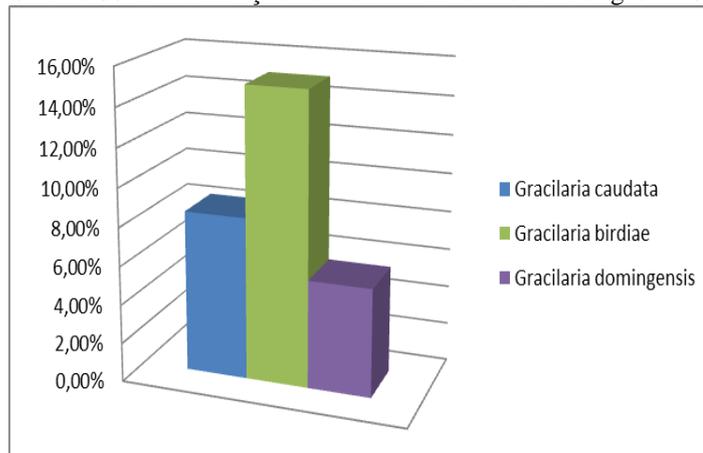


Gráfico 07: Determinação da matéria orgânica das macroalgas em %.

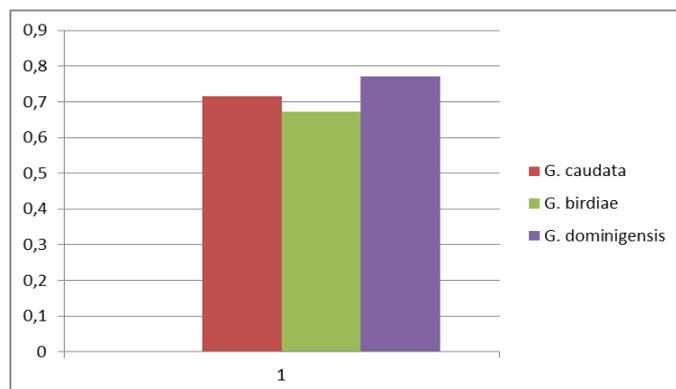
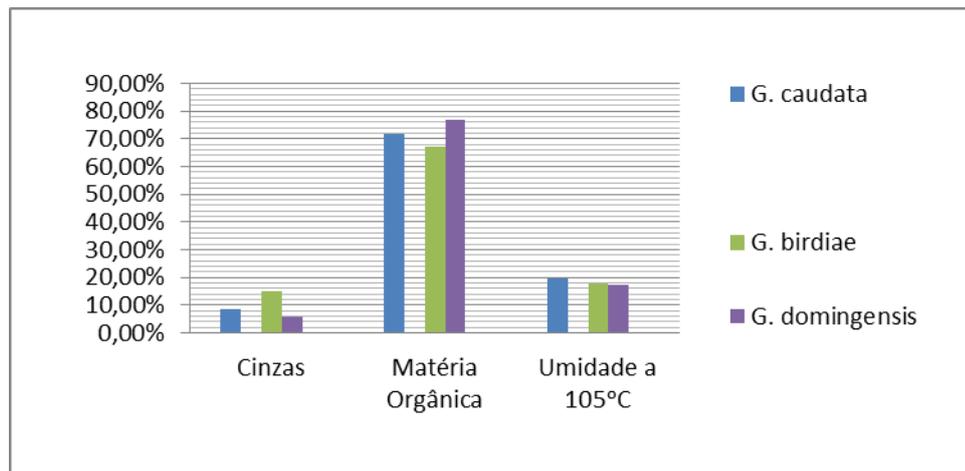


Gráfico 08: Teor de cinzas, umidade e matéria orgânica das macroalgas em %

5.7. Análises dos resíduos das Macroalgas

A adição de biomassa de algas para o solo representa uma oportunidade para reduzir ou substituir fertilizantes industriais nitrogenados (DIAS, 2002). Os produtores informam que o gasto com fertilizantes químicos chega a ser quase um terço do custo da cultura (MAPA, 2008).

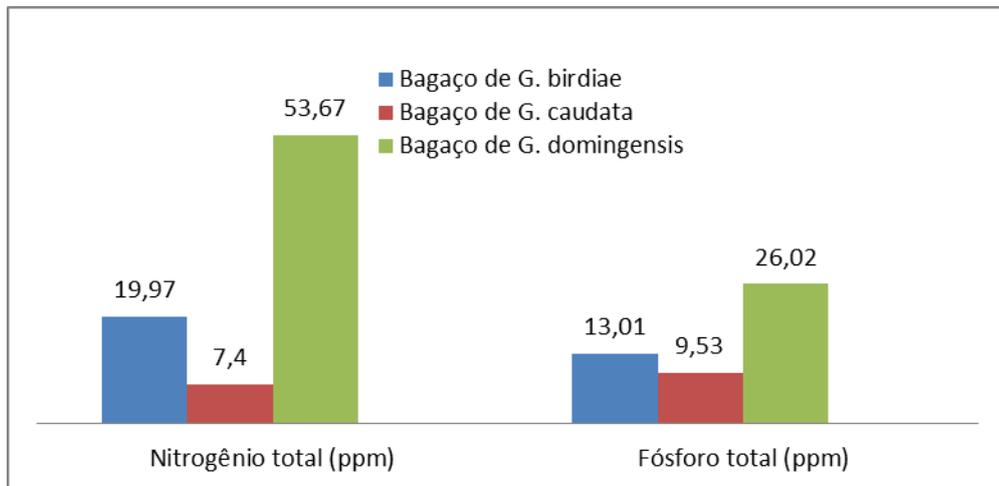
É de fundamental importância que seja explorado o potencial de nutrientes existentes em fontes biológicas, como a biomassa algal. Pesquisas recentes como, Santos (2010), mostram que a utilização de macro e microalgas como biofertilizante indicam que o nitrogênio torna-se disponível para as plantas como biomassa de algas ou microbiologicamente fixado.

5.7.1 Teor de Nitrogênio (N) e Fósforo (P) total do Resíduo 1

Os teores de N e P das macroalgas estudadas são mostrados no gráfico 09. A cor do extrato líquido (E.L) das três algas era amarela. A *G. domingensis* tem níveis mais elevados de Nitrogênio que *G. birdiae* e esta tem níveis mais elevados que a *G. caudata*. A quantidade de Fósforo total foi mais elevada no bagaço de *G. caudata* do que em *G. birdiae*.

Estes resultados de Nitrogênio e Fósforo total tem sido constatados por Mógor et al., (2008) em concentrações que variam de 20 a 60ppm.

Gráfico 09: Análise de N e P das Macroalgas

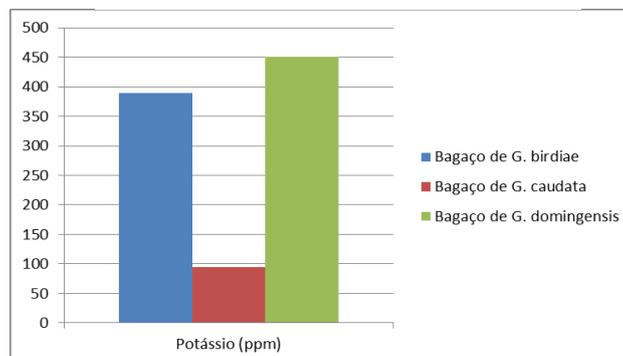


5.7.2 Teor de Potássio (K) do Resíduo 1

Os teores de K das macroalgas estudadas são mostrados no gráfico 10. A cor do extrato líquido (E.L) das três algas era amarelo escuro. Entre os três extratos de algas, o E.L de *G. domingensis* tem níveis mais elevados de Potássio, de que o E.L de *G. Birdiae* e esta tem níveis muito maiores a *G. caudata*.

Mógor et al., (2008) verifica em seus trabalhos de produção de biofertilizantes líquidos a partir de macroalgas, a presença considerável do nutriente Potássio, que coincide com os valores desse trabalho, 400 a 500 ppm. Medeiros et al., (2006) cita também que quando esses compostos são aplicados atualmente nutricionalmente sobre o metabolismo vegetal e na ciclagem de nutrientes no solo.

Gráfico 10: Análise de Potássio.



5.7.3 Teor de Nitrogênio (N), Fósforo (P) e Potássio do Resíduo 2

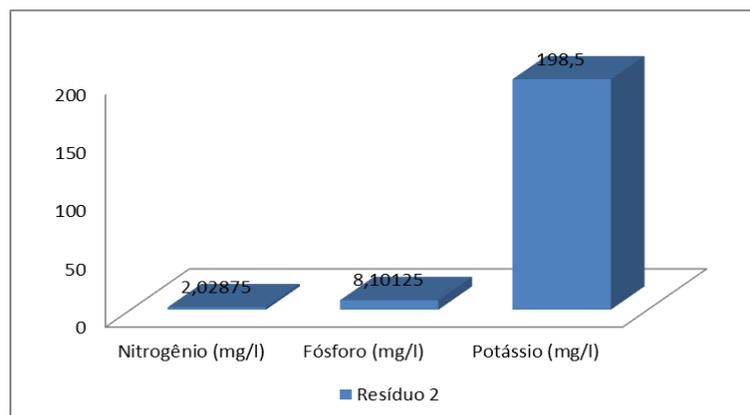
Pelas análises do teor de N, P e K do Resíduo 2, verificou-se que o teor de Potássio chega a ser 20 vezes maior que o de Fósforo e 90 vezes maior que o de Nitrogênio. O gráfico 11 expõe esta relação entre os teores de fósforo, nitrogênio e potássio.

Os macronutrientes, visualizados no gráfico 11, como fósforo (P), potássio (K) e nitrogênio (N), apresentaram valores elevados, principalmente de potássio, os quais são utilizados na agricultura para suprir a necessidade da planta, e aplicados na forma de adubos foliares (STADNIK, 2003).

Cluzet et al. (2004) relatam que, além do alto teor de Potássio encontrado em macroalgas, algumas espécies possuem elevados teores de Sódio e Lítio. Além disso, algumas algas produzem moléculas bioativas capazes de induzir a resistência em plantas (CLUZET et al, 2004). Os mesmos autores, avaliando o efeito do extrato de *Gracilaria* spp. aplicado preventivamente em *Medicago truncatula*, concluíram que o extrato melhorou o desenvolvimento das plantas, quando comparado às plantas que não receberam o extrato.

Os valores de N, P e K, encontrados no Resíduo 2, foram, respectivamente, 2,02875 ppm, 8,10125 ppm e 198,5 ppm, como mostra o gráfico 11. Estes valores são compatíveis com o estudo de Dias (2002), que testaram biofertilizantes líquidos produzidos a partir de macroalgas e obtiveram teores semelhantes, 4,2; 10,4; 85,2 ppm de N, P e K, respectivamente.

Gráfico 11: Análise de Nitrogênio, Fósforo e Potássio



5.7.4 Teor de N, P e K dos Resíduos 1 e 2

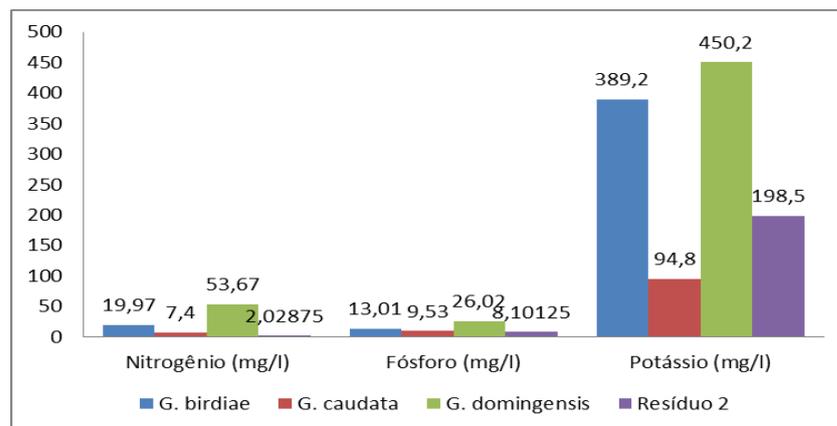
Através do gráfico 12, percebe-se que em todos os resíduos analisados, o teor de Potássio encontrado é bem maior, principalmente na espécie *G. domingensis*.

Em todas as amostras analisadas do Resíduo 2, foram encontrados teores menores de macronutrientes, N, P e K. Este fato já era esperando, em virtude deste resíduo já ter passado

por uma etapa de processamento para retirada de compostos orgânicos, como o ágar, por exemplo.

Stadnik (2004) relata em suas análises, que a quantidade de Potássio encontrada em biofertilizantes sempre mantem teores mais elevados. Isso é esperado, principalmente quando se obtém macronutrientes de algas marinhas, pois estes organismos retiram do mar os nutrientes de que precisam (SANTOS, 1992).

Gráfico 12: Análise de Nitrogênio, Fósforo e Potássio dos Resíduos



5.7.5 Eficiência em diferentes concentrações do macronutrientes (N, P e K) encontrados nas macroalgas

Segundo o RELATÓRIO DE PESQUISA: “BIOFERTILIZANTES: Caracterização Química, Qualidade Sanitária e Eficiência em Diferentes Concentrações na Cultura da Alface” do Dr. Moacir Roberto Darolt – IAPAR são necessárias para a produção de uma (1) tonelada de alface 2,8 kg de Nitrogênio, 0,60 kg de Fósforo e 6,00 kg de Potássio.

Tabela 03: Quantidades de macronutrientes (Kg) necessários para produção de uma (1) tonelada de alface.

	Nitrogênio	Fósforo	Potássio
Cultura de alface	2,8	0,60	6,0

Fonte: Adaptado de Nutrição e adubação de hortaliças; anais/editado por M.E.Ferreira, P.D. Castellane, M.C.P. Cruz. – Piracicaba: POTAFOS, 1993.

As quantidades de N, P e K encontradas nas macroalgas durante as pesquisas apontam uma resposta positiva para a produção de Biofertilizantes líquidos produzidos a partir dos resíduos das macroalgas gerados após a extração dos componentes orgânicos. A tabela 04 mostra esses resultados.

Tabela 04: As quantidades de macronutrientes encontradas em 1 g da amostra de macroalgas foram:

	Nitrogênio total (mg/l)	Fósforo total (mg/l)	Potássio (mg/l)
Resíduo de <i>G. birdiae</i> (Resíduo 1)	19,97	13,01	389,2
Resíduo de <i>G. caudata</i> (Resíduo 1)	7,4	9,53	94,8
Resíduo de <i>G. domingensis</i> (Resíduo 1)	53,67	26,02	450,2
Resíduo 2	2,02875	8,10125	198,5

Para a produção de um quilo (1 kg) de alface segundo a tabela, são necessárias quantidades determinadas de “Resíduos” de macroalgas como mostra a tabela 05.

Tabela 05: Quantidades necessárias de “Resíduos” de algas para obtenção dos macronutrientes.

	Para obter 2,8 kg de Nitrogênio	Para obter 0,6 kg de Fósforo	Para obter 6,0 kg de Potássio
Resíduo de <i>G. birdiae</i> (kg)	140	46,15	15,41
Resíduo de <i>G. caudata</i> (kg)	378,3	42,34	63,2
Resíduo de <i>G. dominigensis</i> (kg)	51,9	22,9	13,32
Resíduo 2 (Kg)	1380	74,06	30,2

Observou-se que será necessário usar uma grande quantidade de matéria-prima, a fim de obter os macronutrientes destinados a produção de biofertilizantes, principalmente N e P. Isto pode parecer um inconveniente, mas o objetivo da pesquisa foi usar apenas os resíduos das algas após a extração do óleo e os resíduos das algas recolhidas pela comunidade (resíduos que não teriam nenhuma utilidade) após a extração de ágar necessário para a fabricação de cosméticos e alimentos.

6. CONCLUSÕES

A metodologia escolhida para a extração de lipídios pode afetar a quantidade extraída. Neste estudo, os solventes utilizados nas extrações e o tempo influenciaram significativamente a eficiência da extração.

O solvente para extração de óleo de um tecido vivo, no caso macroalgas deve ser escolhido conforme as características intrínsecas (químicas e físicas) da matriz.

O método de Cloroformio: metanol: água, 50:25:10 por 4h (GEMMA VICENTE, L.F. BAUTISTA; R. RODRIGUES; F.J. GUTIERREZ; I. SADABA; R.MR.-VASQUEZ; S. TORRES-MARTINEZ; V. GORRE – 2009), por ser de execução mais simplificada, pode ser recomendado tanto para as três amostras de macroalgas, pois apresentou um rendimento superior aos demais métodos. Este poder de extração foi atribuído, entre outros fatores, ao processo de homogeneização vigorosa aplicado nesta metodologia. O poder de extração também tem íntima relação com o fato de que nesse método uma quantidade insuficiente de metanol e água esteve presente para a remoção dos não-lipídios, os quais são geralmente solubilizados pelos lipídios polares na fase orgânica.

O presente trabalho mostra que os lipídios de macroalgas podem ser uma matéria-prima adequada para a produção de biodiesel. O clorofórmio: sistema de extração de metanol que apresentaram maior rendimento lipídico entre os processos de extração estudada. Seria o mais indicado para a extração. Portanto a extração de lipídios de macroalgas para a produção de biodiesel é tecnicamente viável, o que representa um ponto de partida para mais estudos destinado a avaliar o desenvolvimento deste processo em uma escala industrial.

Os resultados adversos obtidos nas reações de transesterificações das macroalgas nos levaram a propor uma modificação no planejamento do trabalho, tornou-se necessário então seguir a as etapas de extração dos lipídios e preparação dos ésteres metílicos e etílicos.

Os bons resultados de Nitrogênio total, Fósforo total e Potássio podem vir a desenvolver uma técnica de produção e metodologia de utilização de um biofertilizante líquido para uso pático no manejo ecológico de pragas agrícolas.

Os resultados obtidos a partir do extrato líquido dos resíduos de macroalgas comprovam sua riqueza de macronutrientes, facilmente acessíveis e de baixo custo operacional, que podem vir a ser utilizado como fonte de crescimento vegetal. Além disso, os resultados desse trabalho geram alternativas ecológicas de reaproveitamento dos resíduos de macroalgas gerados pela extração de carboidratos e lipídios, como sua transformação em insumos agrícolas. Contudo serão necessários mais estudos para investigar o desenvolvimento

de metodologias de elevado alcance social, no sentido de consolidar o emprego desses biofertilizantes como forma de promover a sustentabilidade dos ambientes agrícolas.

7. REFERÊNCIAS

- ABD, El-Moneim; M.R. Afify; E.A. Shalaby; S.M.M. Shanab- **Enhancement of biodiesel production from diferents species of algae grasa y aceites**, 61,(4), 416-422 (2010).
- ABOURRICHE, A.; CHARROUF, M.; BERRADA, M.; BENNAMARA, A.; CHAIB, N.; FRANCISCO, C. Antimicrobial activities and cytotoxicity of the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*. **Fitoterapia**, 70(6): 611-614. 1999.
- ALFONSO, E. T.; LEYVA, M.A. P. **Biofertilizantes: Alternativa Sostenible para la Producción de Tomate en Cuba**. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), La Habana. Cuba. 8 p. 2002.
- ANASAC – Agência nacional. In: Martins, D.A. **Uso de extratos á base de algas para controlar a antracnose e a ferrugem do feijoeiro**. 41 fls. Monografia de conclusão. Agronomia Centro de ciências Agrárias. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006
- ANGEL Sánchez, ROCIO Maceiras, ANGELES Cancela and MÓNICA Rodríguez. **Influence of n-Hexane on in Situ Transesterification of Marine Macroalgae**. *Energies* 2012, 5, 243-257;
- AQUASIS (Associação de Pesquisa e Preservação de Ecossistemas Aquáticos). **A Zona Costeira do Ceará: Diagnóstico para Gestão Integrada**. Fortaleza: AQUASIS, 2003. 293p.
- ARAUJO, A.A.S.; MERCURI, L.P.; SEIXAS, R.S.S.; STORPIRTIS, S.; MATOS, J.R. , **Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica**, Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 42, n. 2, abr./jun., 2006.
- BAUMGARTEN, M. G. Z., J. M. ROCHA & L. F. H NIENSCHESKI. **Manual de Análises em Oceanografia Química**. FURG: Rio Grande. 1996.
- BETTIOL, W.; **Controle de doenças de plantas com biofertilizantes**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, 1998, 22 p.
- BHATTACHARYA, D.; MEDLIN, L., **Algal phylogeny and the origin of land plants**. *Plant. Physiol.*, 116: 9 – 15, 1998.
- BIOCAMPO DESENVOLVIMENTO AGRÍCOLA. *Alga Grow*, São Paulo, 2009.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J.; **Can. J. Biochem. Physiol.** 1959, 37, 911.
- BLUNDEN, G., Jenkins, T., Liu, Y.W., **Enhanced chlorophyll levels in plants treated with seaweed extract**. *J. Appl. Phycol.* 8, 535–543. 1996.

BOLD, H. C. & WYNNE, M. J. **Introduction to the algae. Structure and reproduction.** Prentice-Hall, Inc. 706 p. 1978.

BOOTH, E., **The manufacture and properties of liquid seaweed extracts.** Proc. Int. Seaweed Symp. 6, 655–662. 1969.

BRASIL. **Decreto nº4. 954**, de 14 de janeiro de 2004. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 15 de janeiro de 2004. Seção 1, p. 2. Disponível em: < [HTTP://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarlegislacao](http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarlegislacao).

CAMARA-NETO, C. **Cultivo de Agarófitas.** Uma perspectiva econômica para o Nordeste. Natal, PRAEU (UFRN). 23 p. 1981

CARDOZO, KHM, GUARATINI T, BARROS MP, FALCÃO VR, TONOS AP, LOPES M, et al. **Metabolites from algae with economical impact.** Comp Biochem Physiol C. Toxicol Pharmacol. 146. 2007.

CASTRO, P.R.C.; VIEIRA, E.L. **Aplicação de reguladores vegetais na agricultura tropical.** Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2001, 132 p.

CECCHI, Heloísa Máscia. **Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos**, 2ª Edição, Campinas, SP, Editora da UNICAMP, 2003.

CHALLEN, S.B., Hemingway, J.C., **Growth of higher plants in response to feeding with seaweed extracts.** Proc. 5th Ind. Seaweed Symp. 1965.

CHAPMAN, G.J., **Seaweeds and Their Uses.** Methuen and Co. Ltd., London p. 66. 1970.

CHRISTIE, W. W.; **Gas chromatography and lipids**, The Oily Press: Ayr, 1989, cap. 2, p. 11-42.

CLUZET, S.; TORREGROSA, C.; JACQUET, C.; LAFITE, C.; FOURNIER, J.; MERCIER, L.; SALAMAGNE, S.; BRIAND, X.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T.; DUMAS, B. Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* 34 against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulva* spp. **Plant, Cell and Environment**, v. 27, p. 917-928, 2004.

COSTA, R. F; SALES, M. C. T; MATIAS, L. G. O; SOUZA, L. D. **SERVIÇOS AMBIENTAIS DO BANCO DE ALGAS MARINHAS DO MUNICÍPIO DE ICAPUÍ (CE): PROPOSTA DE ORDENAMENTO DA UTILIZAÇÃO DOS RECURSOS NATURAIS**, anais do I Seminário Nacional de GESTÃO SUSTENTÁVEL DE ECOSSISTEMAS AQUÁTICOS: Complexidade, Interatividade e Ecodesenvolvimento – COPPE/UFRJ, 2012.

DAROLT, M.R. **Guia do produtor orgânico: como produzir em harmonia com a natureza.** Londrina: IAPAR. 41 p. 2002.

DIAS, P.F.; SOUTO, S.M.; LEAL, M.A A.; SCHIMIDT, L.T. **Uso de biofertilizante líquido na produção de alfafa**. Documentos 151, Jaguariuna: EMBRAPA. Outubro, 2002.

DUNCAN, L. **Clinical analysis by atomic absorption spectroscopy**. Springvale: Varian Spectron Pty; p.55. 1976.

E.A. Ehimen, Z.F. Sun, C.G. Carrington. **Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids**. Fuel 89 (2010) 677–684

E.G. Bligh, W.J. Dyer, **A rapid method of total lipid extraction and purification**, Can. J. Biochem. Physiol. 37 (911–917). 1959.

EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Organizador: Fábio Cesár da Silva. Brasília: Embrapa Comunicação para a transferência de tecnologia, 1999.

FUNDAÇÃO BRASIL CIDADÃO PARA EDUCAÇÃO, CULTURA, TECNOLOGIA E MEIO AMBIENTE – FBC (Fortaleza, Ce). **Ceará**. Banco de dados. Icapuí - Ce, 2012.

FERNANDES, A. L. T.; TESTEZLAF, R. Fertirrigação na cultura do melão em ambiente protegido, utilizando-se fertilizantes organominerais e químicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 6, n.1, p. 45-50, 2002.

FOLCH, J., Lees, M., Stanley, G.H.S. **A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues**. J. Biol. Chem. 226, 497–509. 1957.

F. Smedes, **Determination of total lipid using non-chlorinated solvents**, Analyst 124 1711–1718. 1999.

FRUGULHETTI, I.C.P.P.; AMORIM, L.M.F.; TEIXEIRA, V.L.; PEREIRA, R.C. Estudos da atividade antiviral e anticâncer de substâncias isoladas de algas marinhas. **Oficina de trabalho potencial biotecnológico das macroalgas marinhas**. Angra dos Reis – RJ. 2005.

FUEL 94 (2012) 544–550 **Alkaline in situ transesterification of Chlorella vulgaris S.B.** Velasquez-Orta, J.G.M.

FUEL 89 (2010) 677–684 **Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids** E.A. Ehimen, Z.F. Sun *, C.G. Carrington.

GEMMA Vicente, L.F. Bautista; R. Rodrigues; F.J. Gutierrez; I. SADABA; R.MR.-VASQUEZ; S. TORRES-MARTINEZ; V. GORRE – **Biodiesel production from biomass of na oleaginous fungus** – Biochemical Engineering Journal, 48, 22-27 (2009).

GANDHIYAPPAN, K., Perumal, P. **Growth promoting eVect of seaweed liquid fertilizer (*Enteromorpha intestinalis*) on the sesame cropplant**. Seaweed Res. Utiln. 23 (1&2), (2001) 23–25.

GANDHI, A. P.; Joshi, K. C.; Krishna, J.; Paribar, D. C.; Srivastav, P. R.; Kawalkar, J.; Jain, S. K.; Tripathi, R. N.; **Int. J. Food Sci. Technol.** 2003, 38, 369.

GOËMAR, 2006. **Laboratório do mar**. Disponível em www.goëmar.com. Acesso em 29/03/2006. 21:03.

GOMES, ANDERSON FERNANDES. **Extração do óleo de vísceras de sardinha, síntese e caracterização do seu biodiesel**. UERN, 2011.

GRESSLER Vanessa a et al. **Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species**. *Food Chemistry* 120. 585-590. 2010. IBGE. **Censo Demográfico 2010**, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2011.

HARVEY, W. **Cracking open marine algae**. *Biological Treasure Chest. Bio/Technology*, v. 6, n. 5, p. 487-492, 1988.

HONG, D. D. **Seaweeds from Vietnam used for functional food, medicine and biofertilizer**. *Journal of Applied Phycology*, v. 19, n. 6, p 817-826, 2007.

HORTA JUNIOR, P. A.; AMANCIO, E.; COIMBRA, C. S.; OLIVEIRA, E. C. **Considerações sobre a distribuição e origem da flora de macroalgas marinhas brasileiras**. *Hoehnea*, 2001. 28(3).

J. Folch, M. Lees, G.H.S. Stanley, **A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues**, *J. Biol. Chem.* 226 (1957) 497–509.

KELECOM, A. Marine natural products in Brazil. **Ciência e Cultura**. 49(5/6): p. 321-330. 1997

KHALIQ-UZ-ZAMAN, S. M.; SIMIN, K.; SHAMEEL, M. Antimicrobial activity and phytotoxicity of sterols from *Chara wallichii* A. Br. (Charophyta). **Pakistan-Journal-of-Scientific-and-Industrial-Research**, 2001. 44(5): p. 301-304.

KRAUSE, L.C. **Desenvolvimento do Processo de Produção Biodiesel de Origem Animal**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2008.

LEE, S.C.; PROSKY, L.; DEVRIES, J.W. **Determination of total, soluble and insoluble dietary fiber in foods**. Enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer: collaborative study. **J. Assoc. Off. Chem. Int.**, v. 75, p. 395-416, 1992.

LEE, A. Harvey *Tetrahedron Letters* 43 (2002) 879–882 **A mild and efficient method for esterification and transesterification catalyzed by iodine** K. Ramalinga, P. Vijayalakshmi and T. N. B. Kaimal.

LEE, R. E. **Phycology**. 2th Ed. Cambridge University Press, New York, NY 10011-4211, USA, 1997.

LEVRING, T.; HOPPE, H.A. & SCHIMD, O.J. **Marine algae: A survey of research and utilization**. Hamburg, Cram De Gruyter, 1969. 421p.

MACEIRAS, R.; CANCELA, A.; RODRIGUEZ, M.; SANCHEZ, A.; URREJOLA, S., **An Innovative Biodiesel Production**. Chemical Engineering Department. University of Vigo, 2006.

MAPA, Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 64. 18 de dezembro de 2008.

MASNY, A.; BASAK, A.; ZURAWICZ, E. **Effects of foliar application of kealpak SL and Goemar BM 86 preparations on yield and fruit in two strawberry cultivars**. Journal of fruit and Ornamental Plant Research, v. 12, p. 23-27, 2004.

MATIAS, L. G. O.; DI SOUZA, Luiz ; MORAIS, A.M. ; SOUZA JUNIOR, F. S. ; EVANGELISTA, J.P.C. **Avaliação das Propriedades Físico-Químicas do Óleo e do Biodiesel de Pinhão Manso Catalisado por Iodo Sublimado**, Química no Brasil, v.4, 2010.

MANIRAKIZA, P.; Covaci, A.; Schepens, P.; **Journal of Food Composition and Analysis**. 2001, 14, 93.

MEDEIROS, M.B. LOPES, J.S. **Biofertilizante líquido e sustentabilidade agrícola. Bahia agrícola**, v.7, n.3, p.24-26, nov, 2006.

MEIRELES, A.J.A. (1991): **Mapeamento geológico/geomorfológico da planície costeira de Icapuí, extremo leste do Estado do Ceará**. Diss. Mestrado, Centro de Tecnologia, Departamento de Geologia da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. Recife, 1991, 178p. il.

MEIRELES, A.J.A. (2006): **Banco dos cajuais: aspectos geoambientais: fundamentos para o uso sustentável dos recursos naturais**. Fundação Brasil Cidadão – Fortaleza CE, 2006.

MERTENS, D.R. **Análise da fibra e sua utilização na avaliação de alimentos e formulação de rações**. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE RUMINANTES. *Anais...* Lavras: SBZ-ESAL, 188, 1992.

MÓGOR, A.F.; ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D.; **Aplicação foliar de extrato de algas, ácido L-glutâmico e cálcio em feijoeiro**. Scientia Agrária. Curitiba. V.9, n.4, p.431-437, 2008

M. Zhu, P.P. Zhou, L.J. Yu, **Extraction of lipids from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids**, Bioresour. Technol. 84 (2002) 93–95.

NORRIE, J. **Advances in the use of *Ascophyllum nodosum* seaweed extracts for crop production**. Laboratory and Field Research. Canadá. 2008.

OGAWA, M., KOIKE, J., **Manual de Pesca** – Associação dos Engenheiros de Pesca do Estado do Ceará, Fortaleza, CE, p. 113, 1987.

OLIVEIRA, E.C. **Is there a relation among the global warming the missing carbon and the calcareous algae?** An. Acad. bras. Ci. 68(supl 1): 17-21, 1996.

OLIVEIRA, E.C. & MIRANDA, G.E.C. **Aspectos sociais e econômicos da exploração de algas marinhas no Brasil.** In Anais do IV Congresso Latinoamericano de Ficologia, Volume II Reunião Ibero-americana, VII Reunião Brasileira de Ficologia. Sociedade Ficológica da América Latina e Caribe Sociedade Brasileira de Ficologia, São Paulo, v.z p.359-369. 1998.

OLIVEIRA, D.S. ; FONSECA, X.D.S. ; FARIAS, P.N. ; BEZERRA, V.S. ; PINTO, C.H.C. ; SANTOS, A. G. D. ; DI SOUZA, Luiz ; MATIAS, L. G. O. **Obtenção Do Biodiesel Através da Transesterificação do Óleo de *Moringa oleifera*.** Holos (Natal. Online), v. 5, p. 1-13, 2012.

ORHAN, B. Sener, and T. Atici. **Fatty Acid Distribution In The Lipoid Extracts Of Various Algae** *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 39, No. 2, 2003.

PANORAMA DA AQUICULTURA. **Macroalgas marinhas de valor comercial: técnicas de cultivo.** V. 7, n. 42, p. 42 – 45, 1997.

PARANHOS, R. **Alguns métodos para análise de água.** Rio de Janeiro: Editora da UFRJ, 1996.

PAULA, E.J., TOLEDO, R. & OHNO, M. **Strain selection in *Kappaphycus alvarezii* var. *alvarezii* (Solieriaceae, Rhodophyta) using tetraspore progeny.** Journal of Applied Phycology 11:111-121. 1999.

PEARSON, David; **The Chemical Analysis of Foods**, 1977.

PESAGRO-RIO. **Produção e pesquisa do “agrobio” e de caldas alternativas para controle de pragas e doenças.** Niteroi: PESAGRO, 2p. (PESAGRO-Rio, Documentos, 44). 1998.

PINHEIRO, S.; BARRETO, S.B. MB4: **Agricultura sustentável, trofobiose e biofertilizantes.** Porto Alegre: Fundação Juquira Candiru. 1996. 276 p.

PUJA Kumari, C.R.K. Reddy, BHAVANATH Jha. **Comparative evaluation and selection of a method for lipid and fatty acid extraction from macroalgae.** Analytical Biochemistry 415 (2011) 134–144

PUPO, D. **Monitoramento e previsão de impactos ambientais decorrentes da maricultura.** Oficina de trabalho potencial biotecnológico das macroalgas marinhas. Angra dos Reis – RJ. p. 3. 2005.

RAMALINGA, K; VIJAYALAKSHMI, P.; **A Mild and Efficient Method for Esterification and Transesterification Catalyzed by Iodine,** Tetrahedron Letters. Vol. 43, 879-882, 2002.

- RAHMAN, A. U.; CHOUDHARY, M. I.; MAJEED, A.; SHABBIR, M.; GHANI, U.; SHAMEEL, M. A succinylanthranilic acid ester and other bioactive constituents of *Jolyna laminarioides*. **Phytochemistry**. 46(7): p. 1215-1218. 1997.
- RAMA RAO, K. **Efect of seaweed extract on *Zizyphus mauratiana* Lamk.** **J. Indian Bot. Soc.** 71, 19–21. 1991.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F. ELCHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6ed, edt. Guanabara, cap. 14, 2007.
- RAVEN, P. H., EVERT, R. F., EICHHORN, S. E., **Biology of Plants**. 5^a ed., Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 735pp., 1996.
- RAVEN, P. H., EVERT, R. F., EICHHORN, S. E., **Biologia Vegetal**, 6^a ed., Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 906pp., 2001.
- REAKA-KUDLA, M. L. **The global biodiversity of coral reefs: a comparison with rain forest.** In Reaka-Kudla, M. L.; Wilson, D. E. & Wilson, E. O. (eds.), *Biodiversity II*. Joseph Henry Press. Washington, D.C., USA. 83 - 108 p, 1997.
- REIS, R.P. Estudos sobre maricultura, produção de carragenana e crescimento de algas de interesse comercial no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Oficina de trabalho potencial biotecnológico das macroalgas marinhas.** Angra dos Reis – RJ. p. 24, 2005.
- Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 42, n. 2, abr./jun., 2006.
- ROUND, F.E., **Biologia das Algas**, 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, S.A., 262 p., 1983.
- ROUND F. E. **Biologia das Algas**. Rio de Janeiro; Ed. Guanabara. 2/63 p. 1987.
- RUIZ-JIMENEZ, J.; CASTRO, M.D.L., **Forward-and-back dynamic ultrasoundassisted extraction of fat from bakery products**, *Anal. Chim. Acta*, 502 ,75–82, 2004.
- SANTOS, A. C. V. dos. **Biofertilizante líquido, o defensivo da natureza.** Niterói: EMATER – Rio. 16 p. (Agropecuária fluminense, 8). 1992.
- SANTANA A.B. ARRUDA, L.F e BISMARA M.A **Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal** - Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, CP 9, 13418-900 Piracicaba - SP, 2009, Brasil.
- SANTOS, A.G.D. **Avaliação da estabilidade Térmica e Oxidativa dos Biodieseis de Algodão, Girassol, Dênde e Sebo Bovino.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2010.
- S.B. Velasquez-Orta, J.G.M. Lee, A. Harvey. **Alkaline in situ transesterification of *Chlorella vulgaris*.** *Fuel* 94 (2012) 544–550.

- SMEDES, F. , **Determination of total lipid using non-chlorinated solvents**, Analyst 124 1711–1718. 1999.
- SMITH, G. M. **Botânica Criptogâmica**. Vol. I. Algas e Fungos. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, 1995.
- SMIT, AJ. **Medicinal e Pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review**. **J Appl phycol**. 2004: 245 a 262.
- STADNIK, M.J. **Uso potencial de algas no controle de doenças de plantas**. In: VIII Reunião de controle biológico de fitopatógenos, Cepec, Ilhéus, p.70-74. 2003.
- STADNIK, M.J.; MARASCHIN. M. **Indução de resistência de plantas a fitopatógenos**. In: STADNIK, M.J.; TALAMINI. V. Manejo ecológico de doenças de plantas, Florianópolis, SC: CCA/ UFSC. p 221-244. 2004.
- STENECK, R.S.; V. TESTA, **Are calcareous algae important to reefs today or in the past?** Proc. 8th Int. Coral Reef. Sym., 1: 685-688, 1997.
- STIRK, W. A., NOVAK, M.S., VAN STADEN, J. **Cytokinins in microalgae**. **Plant Growth Regulation**, n. 41, 2003, p. 13-24.
- SUAREZ Paulo A. Z. *et al.* **Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica**. Instituto de Química, Universidade de Brasília, CP 4478, 70904-970 Brasília – DF, Brasil. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 3, 667-676, 2007.
- TALAMINI, V.; VICENETE, E.C. & STADNIK, M.J. **Eficiência de extratos vegetais no controle de *Colletotrichum lindemuthianum***. *Summa Phytopathologica*, 30(1): p. 79. 2004.
- TAMILARASAN Suganya, SAHADEVAN Renganathan. **Optimization and kinetic studies on algal oil extraction from marine macroalgae *Ulva lactuca***. *Bioresource Technology* 107 (2012) 319–326.
- THIVY, F. **Seaweed manure for perfect soil and soiling Welds**. *Salt Res. Indust.* 1, 1–4. 1961.
- TIMM, P. J.; GOMES, J. C. C.; MORSELLI, T. B. Insumos para agroecologia: Pesquisa em vermicompostagem e produção de biofertilizantes líquidos. **Revista Ciência & Ambiente**, julho/dezembro. Universidade federal de santa Maria 29º publicação. 2004.
- VALDERRAMA, J. C. **The simultaneous analysis of total nitrogen and phosphorus in natural waters**. *Marine Chemistry*, 10: 109-122, 1981.
- VAN DEM HOECK C, MAN DG E JANHS HML **Algae: An Introduction to phicology** Cambridge University Press. 1995. 623 p.

VESLASQUEZ-ORTA, S.B.; LEE, J.G.M.; HARVEY, A., **Alkaline in situ transesterification of *Chlorella vulgaris***. *Fuel*, 94, 544–550, 2012.

VILKHU, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D. **Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry** — a review. *IFSET* 9, 161– 169. 2008.

VLACHOS, V.; CRITCHLEY, A. T.; HOLY, A. Antimicrobial activity of extracts from selected southern African marine macroalgae. **South African Journal of Science**, 93(7) p. 328-332. 1997.

VOLESKY, B.; ZAJIC, J.E. & KNETTIG, E. **Algal products**. In: ZAJIC, J.E., ed. *Properties and products of algae*. New York, Plenum, 1970. p.49-82.

WALLEN KEMP, J.O. **Treasure from the sea**. *Organic Gard. F.* 2 (3), 52–53. 1955.

WETZEL, R.G. & LIKENS, G.E. **Limnological analysis**. New York: Springer-Verlag, 1991.

X. Miao, Q. Wu, **Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil**, *Bioresour. Technol.* 97 (2006) 841–846.