

# Caracterização de Óleos de Microalgas para Avaliação do Potencial para a Produção de Biodiesel

Bruna Ferreira Silva<sup>1\*</sup>, Aline Terra Soares<sup>1</sup>, Lucimar Lopes Fialho<sup>2</sup>, Armando Augusto Henriques Vieira<sup>2</sup>, Antônio Gouveia Souza<sup>3</sup>, Nelson Roberto Antoniosi Filho<sup>1\*\*</sup>

- 1) Laboratório de Métodos de Extração e Separação (LAMES) - Instituto de Química – Universidade Federal de Goiás
  - 2) Laboratório de Ficologia - Universidade Federal de São Carlos
  - 3) Laboratório de Combustíveis e Materiais - Universidade Federal da Paraíba
- \* [brufesil@hotmail.com](mailto:brufesil@hotmail.com)  
\*\* [nelson@quimica.ufg.br](mailto:nelson@quimica.ufg.br)

Palavras-chave: microalgas, biodiesel, ácidos graxos, triacilglicerídeos, cromatografia gasosa

## 1. Introdução

Biodiesel é um combustível biodegradável que emite menor quantidade de compostos tóxicos comparado ao diesel. Ele é preparado a partir de recursos renováveis e pode ser feito por diferentes processos<sup>1</sup>. A maioria do biodiesel comercializado no Brasil é derivado de 90% de óleo de soja e 10% de gordura animal ou outras fontes de óleo. No mundo, existem muitas outras matérias-primas sendo utilizadas para a produção de biodiesel, devido ao fato de cada país ter predominância de cultivo de determinada oleaginosa. O custo da produção de biocombustíveis é influenciado pela matéria-prima, que pode representar de 60% a 80% do custo total de produção.

Atualmente, uma variedade de óleos vegetais, gorduras animais<sup>2</sup> e óleos residuais têm sido testados para preparação de biodiesel, mas a produção dos biocombustíveis a partir dessas matérias-primas não suprirá a demanda de combustíveis para o transporte<sup>3</sup>. Nesse sentido, a biomassa de microalgas é uma alternativa oferecida para produção de biodiesel que permite a substituição do diesel de forma ambientalmente sustentável<sup>4</sup>.

Microalgas são organismos microscópicos fotossintetizantes de tamanho similar aos nanoplanktons (2-20µm). Esses organismos usam a energia da luz solar para converter

Orientanda Bruna Ferreira Silva; Orientador Nelson Roberto Antoniosi Filho; Co-autora

Aline Terra Soares

*Revisado pelo orientador*

dióxido de carbono e água em biomassa rica em óleo, sendo que apresentam maior eficiência fotossintetizante em relação às plantas superiores. Esses microorganismos são encontrados em ambientes marinhos ou de água doce, e podem crescer em áreas não cultiváveis, como o deserto, e em água de produção<sup>5,7</sup>.

Sua composição química depende de condições de cultivo como pH, temperatura, luminosidade, nutrientes e outros fatores<sup>6</sup>. Compostos com alto valor comercial podem ser extraídos das microalgas, como os ácidos graxos  $\gamma$ -linolênico, araquidônico, eicosapentaenóico e docosahexaenóico, os pigmentos carotenóides, e as vitaminas C e E, além da biotina. É possível otimizar as condições de crescimento a fim de aumentar a produção de ácidos graxos que constituem o biodiesel<sup>7</sup>.

Os óleos são predominantemente compostos por triacilglicerídeos (TAG), que são ésteres de ácidos graxos ligados ao glicerol. A identificação desses compostos é trabalhosa devido ao número de átomos de carbonos totais presentes nas moléculas. Por isso, o desenvolvimento de métodos analíticos para separação mais eficiente, como a Cromatografia Gasosa à Altas Temperaturas (HT-CGC) em colunas polarizáveis ou apolares, tem permitido a separação e identificação de um grande número de TAG em materiais graxos<sup>8</sup>.

Ácidos graxos (FA) são encontrados na natureza como unidades básicas e essenciais de moléculas de lipídeos. Eles têm uma cadeia de ácido carboxílico com um grupo carboxila em uma extremidade e um grupo metila na outra. Eles são derivatizados à ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME), que são mais voláteis e menos polares do que ácidos graxos livres (FFA) e acilglicerídeos<sup>8</sup>, facilitando a caracterização por cromatografia gasosa de alta resolução (HRGC).

## 2. Objetivos

Considerando a importância de se obter novas fontes de matérias-primas para a produção de biodiesel, os objetivos deste trabalho são:

- Analisar a composição de ácidos graxos e acilglicerídeos (mono-, di- e triacilglicerídeos) de óleos de microalgas;
- Avaliar a viabilidade de utilização de óleo de microalgas para a produção de biodiesel;
- Aplicar a cromatografia gasosa para determinar o perfil de ácidos graxos e acilglicerídeos dos óleos de microalgas;

- Investigar a influência do conteúdo de FA e TAG nas propriedades físico-químicas do óleo de microalga e no uso para a produção de biodiesel;
- Por fim, definir os táxons de maior potencial para servir como nova matéria-prima para a produção de biodiesel.

### 3. Metodologia

#### 3.1 Amostragem e extração

As amostras de óleo de *Chlorella minutíssima*, *Ankistrodesmus gracilis* e *Cyclotella sp.* foram cedidas pelo laboratório de ficologia da UFSCar. Os óleos de *Arthrospira platensis*, *Entomoneis alata* e *Cylindrotheca closterium* foram cedidos pelo laboratório de combustíveis e materiais da UFPB. A biomassa da microalga foi macerada e passada em sistema ultra-som para desagregação, e finalmente extraída em sistema Soxhlet com n-hexano.

#### 3.2 Análise FAME

A transesterificação dos óleos de microalgas foi realizada seguindo uma adaptação para micro-escala do método desenvolvido por Hartman e Lago<sup>8</sup>. Inicialmente, preparou-se a mistura esterificante que será utilizada no processo de transesterificação. Para isso adicionou-se 2,0 g de cloreto de amônio (MERCK<sup>®</sup>) em 60,0 mL de metanol (TEDIA<sup>®</sup>), seguida pela adição de 3,0 mL de ácido sulfúrico concentrado (MERCK<sup>®</sup>). A mistura foi colocada em um balão de fundo redondo, adaptado a um condensador, e mantida sob refluxo com agitação manual por 15 minutos. A mistura obtida foi estocada em um balão volumétrico de 100 mL com tampa de vidro e pode ser utilizada por algumas semanas, devendo ser estocada em geladeira. Posteriormente, em um tubo de autoclave pesou-se 35,0 mg do óleo de microalga, adicionou-se 0,5mL de uma solução de hidróxido de sódio (MERCK<sup>®</sup>) em metanol secado (TEDIA<sup>®</sup>), resultando em uma mistura com concentração 0,5 mol.L<sup>-1</sup> e aqueceu-se o tubo de ensaio por 10 minutos em banho maria a 90°C. Resfriou-se o tubo em banho de gelo e adicionou-se 1,5 mL da mistura esterificante preparada anteriormente. Aqueceu-se, novamente, o tubo de ensaio por 10 minutos em banho-maria a 90°C e resfriou-o em banho de gelo. Adicionou-se 5 mL de n-heptano (TEDIA<sup>®</sup>) e 10 mL de água destilada. Agitou-se o tubo manualmente algumas vezes e esperou-se a separação de fases. Com auxílio de uma pipeta Pasteur, isolou-se a fase orgânica, que foi analisada por HRGC.

*Revisado pelo orientador*

A análise da composição dos FAME foi realizada em um cromatógrafo a gás Agilent 7890, equipado com detector de ionização de chama, coluna capilar HP-88 (88% cianopropil metilpolisiloxano, 100 m x 0,25 mm x 0,2  $\mu\text{m}$ ) e injetor split/splitless. O modo de injeção usado foi split, com razão de split 50:1 para injeção de 2,0  $\mu\text{L}$  de amostra e temperatura do injetor de 280°C. O gás de arraste utilizado foi Hidrogênio 5.0 e o gás de make-up, Nitrogênio (4.5). A temperatura do forno inicialmente foi de 80°C com taxa de aquecimento de 12°C·min<sup>-1</sup> até 240°C. Essa temperatura foi mantida por 10 minutos, e novamente aqueceu-se o forno à 5°C·min<sup>-1</sup> até 250°C. A temperatura do detector FID foi mantida a 280°C. A identificação dos FAME foi feita por comparação com amostras de composição conhecidas, como soja, crambe, girassol, canola e de padrões de ácidos graxos (NuCheck Prep<sup>®</sup>), além de análises por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplada a Espectrômetro de Massas (HRGC-MS).

A análise qualitativa de FAME por HRGC-MS foi obtida utilizando um cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (QP-5050 Shimadzu), utilizando uma coluna capilar LM-100 (Carbowax 20M, 25 m x 0,25 mm x 0,3  $\mu\text{m}$ ). O gás de arraste utilizado foi o Hélio a uma velocidade linear de 35 cm·s<sup>-1</sup>. Inicialmente a temperatura da coluna foi mantida a 70°C, e depois aumentada para 240°C com taxa de 10°C·min<sup>-1</sup>. O injetor foi mantido a temperatura de 250°C com volume de injeção de 2  $\mu\text{L}$ , no modo split, com razão de split 10:1. A temperatura de interface foi mantida a 240°C. A análise por HRGC-MS permitiu determinar o número de duplas ligações e o tamanho da cadeia de cada FAME separado cromatograficamente. Nesse sentido, o pico base m/z 74 corresponde à ésteres de ácidos graxos saturados (SFA), m/z 55 para monoinsaturados (MUFA), m/z 67 para diinsaturados e m/z 79 para ácidos graxos poliinsaturados (PUFA).

### 3.3 Análise de Triacilglicerídeos por HT-CGC em coluna apolar

Para caracterização do perfil triacilglicerídico os óleos de microalgas foram preparados em uma concentração de 2 mg·mL<sup>-1</sup> em n-heptano. O método de análise da composição de TAG foi a HT-CGC com detector FID. A temperatura do injetor foi de 380°C com volume de injeção de 2  $\mu\text{L}$ , no modo split, com razão de split 10:1. O gás de arraste foi Hidrogênio, com velocidade linear de 40 cm·s<sup>-1</sup>, e Nitrogênio como gás de make-up a 20 mL·min<sup>-1</sup>. As análises foram realizadas em uma coluna apolar NST-5HT (5% fenil 95% metil polisiloxano, 8 m x 0,25 mm x 0,1  $\mu\text{m}$ ). A temperatura inicial do forno foi de 360°C, e aumentou para 370°C com taxa de 5°C·min<sup>-1</sup>, e depois aumentou para 390°C com taxa de

20°C·min<sup>-1</sup>. O detector foi mantido a temperatura de 385°C. Os TAG foram identificados através da comparação dos tempos de retenção obtidos para oleaginosas conhecidas, como óleos de soja e dendê.

#### 4. Resultados e Discussão

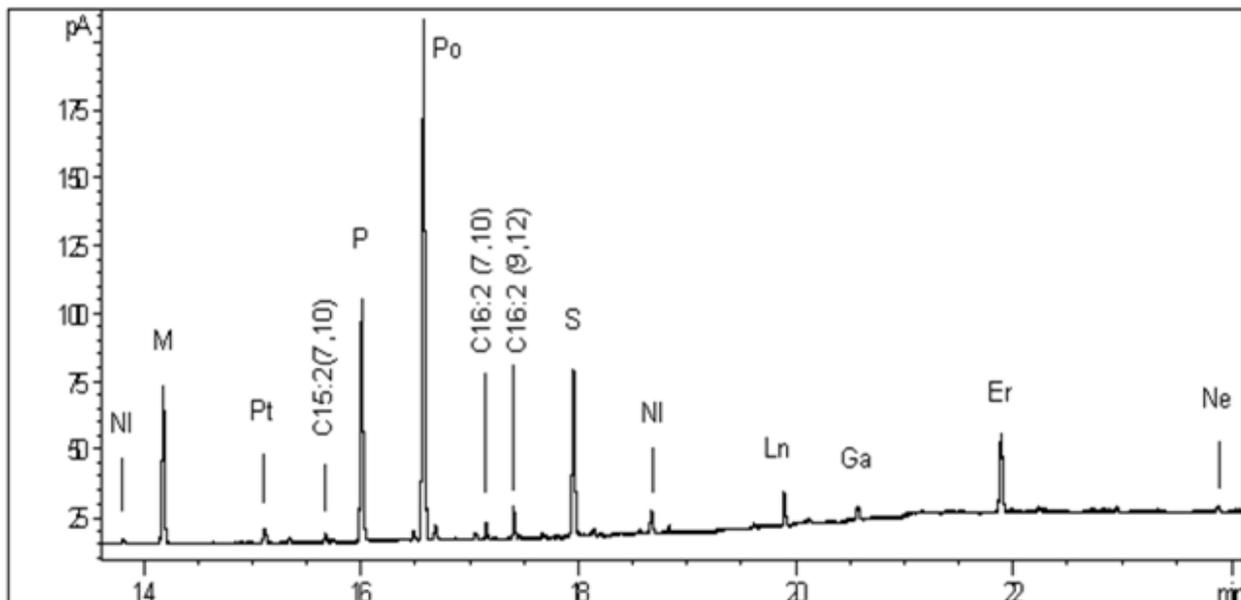
##### 4.1 Análise de FAMES

A Tabela 1 lista a composição de ácidos graxos de seis espécies diferentes de microalgas e a Figura 1 mostra o cromatograma obtido para a *Cyclotella sp.* por HRGC-FID. As condições cromatográficas permitiram a separação de FAME contendo de 4 a 24 átomos de carbono em 25 minutos, que é um tempo de análise adequado em trabalhos de rotina.

**Tabela 1.** Composição de FAME dos óleos de microalgas.

Ácidos Graxos	Composição de ácidos graxos dos óleos de microalgas (%)					
	<i>Chlorella minutissima</i>	<i>Ankistrodesmus gracilis</i>	<i>Cyclotella sp</i>	<i>Spirulina platensis</i>	<i>Entomoneis alata</i>	<i>Cylindrotheca closterium</i>
M (C14:0)	1,9	1,2	11,6	-	19,8	13,9
Mo (C14:1)	-	-	-	-	1,2	0,7
Pt (C15:0)	-	-	1,1	-	1,0	1,3
C15:1 c9	-	4,6	-	-	-	-
C15:2 c7, c10	1,4	7,3	0,5	-	-	-
P (C16:0)	62,4	40,5	18,1	57,0	19,9	17,6
C16:1 c7	-	-	-	-	-	1,7
Po (C16:1 c9)	2,0	6,9	40,2	2,4	23,4	18,9
C16:2 c7, c10	-	-	1,3	-	5,4	2,8
C16:2 c9,c12	-	-	2,4	-	1,9	4,9
C16:3 c4,c7,c10	-	-	-	-	5,2	3,8
C17:3 c5,c8,c11	-	-	-	-	1,4	6,1
S (C18:0)	6,4	2,1	12,4	3,3	1,1	1,2
O (C18:1 c7)	15,9	10,7	-	11,3	1,3	2,1
V (C18:1 c11)	1,2	1,4	-	1,2	4,0	4,1
L (C18:2c9,c12)	3,9	3,2	-	13,2	0,8	1,0
γ-Ln (C18:3c6,c9,c12)	-	-	-	6,0	1,3	1,1
Ln (C18:3c9,c12,c15)	-	3,5	2,5	-	0,5	3,0
A (C20:0)	-	-	-	-	-	1,5
Ga (C20:1 c9)	1,8	-	1,0	-	-	-
Aa (C20:4 c5,c8,c11,c14)	-	-	-	-	0,5	4,2
Be (22:0)	-	-	-	1,2	9,2	8,3
Er (C22:1 c13)	-	-	6,3	-	-	-
Lg (C24:0)	-	-	-	-	2,1	-
Ne (C24:1 c15)	-	11,7	0,5	-	-	-
ΣSFA	70,7	43,8	43,2	61,5	53,1	43,8
ΣMUFA	20,9	35,3	48,0	14,9	29,9	27,5
ΣPUFA	5,3	14,0	6,7	19,2	17,0	26,9
Não Identificados	3,1	6,9	2,1	4,4	-	1,8

Legenda: SFA: ácidos graxos saturados; MUFA: ácidos graxos monoinsaturados; PUFA: ácidos graxos poliinsaturados (com duas ou mais ligações duplas)



**Figura 1.** Cromatograma de FAME do óleo da microalga *Cyclorella sp.* por HRGC-FID.

A identificação dos ácidos graxos permite que se estime as características finais do biodiesel, como massa molecular média, viscosidade, estabilidade oxidativa, índice de cetano, entre outras. A qualidade do biodiesel pode sofrer variações conforme as estruturas moleculares dos seus ésteres constituintes<sup>10</sup>.

O perfil cromatográfico também evidencia a diversidade de tamanho de cadeias e graus de insaturações, entre microalgas da mesma classe. Além da variedade da composição de ácidos graxos, a maioria dos óleos de microalgas analisados é composta por 43-70% de ácidos graxos saturados e 15-48% de ácidos graxos monoinsaturados.

A predominância de ácidos graxos saturados no óleo produzirá um biodiesel com alta estabilidade oxidativa e alto número de cetano (qualidade de ignição), porém com alto ponto de entupimento de filtro à frio (temperaturas de perda de filtrabilidade). Por outro lado, ácidos graxos insaturados produzem biodieseis com boa propriedade de fluidez à frio, mas com maior susceptibilidade à oxidação, o que é crítico durante a estocagem<sup>11</sup>.

O perfil de FAME da *Chlorella minutissima* mostrou uma composição de ácidos graxos similar a óleos vegetais, como soja e amendoim, devido à presença considerável de ácido palmítico (C16:0) e oléico (C18:0 *cis*9). A abundância desses ácidos também foi observada quando a biomassa dessa microalga foi extraída com tolueno<sup>12</sup>.

Os FAME encontrados em *A. gracilis* são similares à *C. minutissima*, porém diferem pelo fato de haver maior percentual de ácidos graxos de cadeias curtas e insaturadas em sua composição (13,1% de cadeias curtas para *A. gracilis* e 3,3% para *C. minutissima*; 49,3% e

26,2% de cadeia insaturada para *A. gracilis* e *C. minutíssima*, respectivamente). *A. gracilis* também mostrou alto conteúdo (11,7%) de ácido nervônico (C24:1 *cis*15), que é incomum.

*Cyclotella sp* também mostrou ácidos graxos de cadeia longa e insaturada, como ácidos erúcido (C22:1 *cis*13) e nervônico (C24:1 *cis*15), porém essa microalga tem grande quantidade (40,2%) de ácido palmitoléico (C16:1 *cis*9) e ácido erúcido (6,3%) quando comparada com outras microalgas. Um perfil similar foi observado para microalgas de mesmo gênero: *Cyclotella meneghiniana*<sup>13</sup> e *Cyclotella cryptica*<sup>14</sup>. A espécie *Cyclotella* pode acumular cerca de 42% de lipídeos em sua biomassa seca<sup>15</sup> sobre condições de estresse de nitrogênio, sob temperatura ambiente e salinidade moderada<sup>16</sup>.

*C. minutíssima* e *A. gracilis* tem presença significativa de C16:0 e C18:1, que são característicos de classe de microalgas *Chlorophyceae*, e os ácidos graxos C14:0, C16:0 e C16:1 são predominantes em *Cyclotella sp.*, *E. alata* e *Cylindrotheca closterium* são representativas da classe de microalgas *Bacillariophyceae*<sup>11,17</sup>.

Em *Arthospira platensis*, o ácido palmítico foi dominante. Esta amostra também contém ácidos oléico, linoléico e  $\gamma$ -linênico. Quando comparado com as microalgas estudadas, *A. platensis* mostrou alto conteúdo de ácido  $\gamma$ -linolenico e ausência de ácido linolênico, como mostrado na literatura<sup>18</sup>. Estudos mostraram que a composição de ácidos graxos de *A. platensis* é influenciada pelas condições de cultivo como luz, temperatura e nutrientes<sup>19</sup>. É importante observar que o ácido  $\gamma$ -linolenico (GLA – C18:3) é um precursor da produção de prostaglandina E1, um importante composto ativo biológico requerido para redução da inflamação e pressão arterial. Além disso, GLA é usado para o tratamento de artrite reumatóide, eczema e síndrome pré-menstrual<sup>20</sup>.

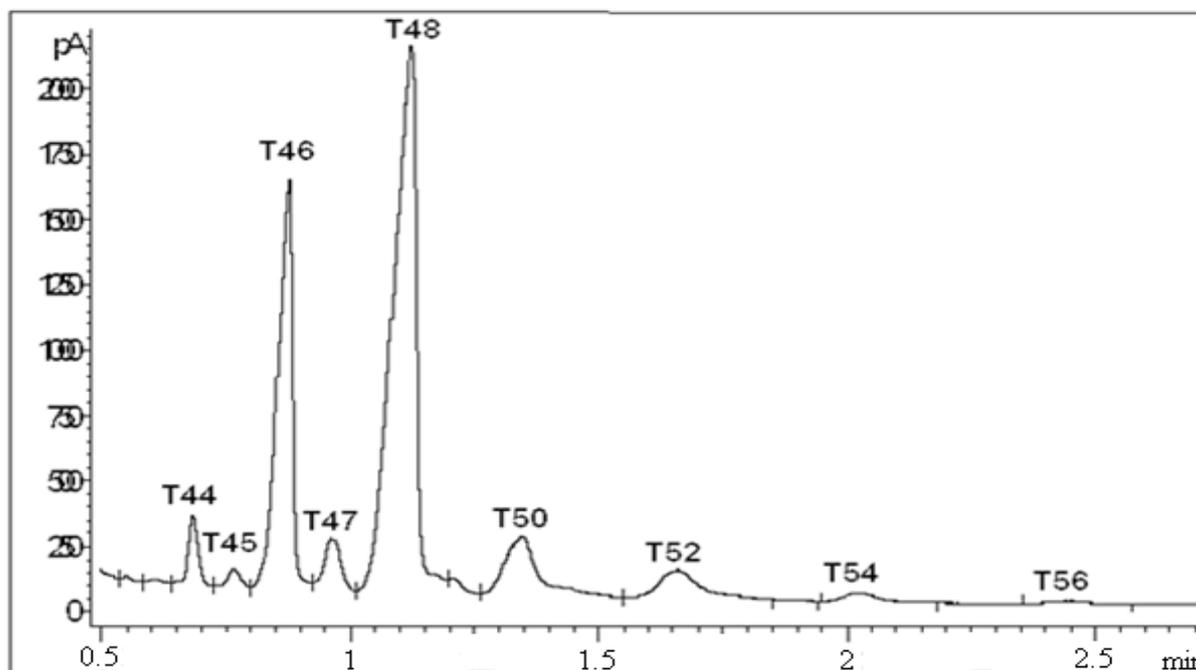
Quando comparado com óleos vegetais comuns e outros óleos de microalgas, as microalgas *Entomoneis alata* e *Cylindrotheca closterium* são as mais ricas fontes de ácido mirístico (C14:0), palmitoléico (C16:1 *cis*9) e behênico (C20:4). *Chlorella minutíssima* apresentou grande quantidade de ácidos graxos saturados, o que significa que pode produzir biodiesel com ótima estabilidade oxidativa, porém, provavelmente com altas temperaturas de entupimento de filtro à frio (CFPP). O mesmo comportamento pode ser observado para a produção de biodiesel através da *Ankistrodesmus gracilis*, que, além das propriedades observadas anteriormente, vai apresentar alta viscosidade devido à grande quantidade de ácidos graxos de cadeia longa como ácido nervônico (C24:1).

## 4.2 Análise de triacilglicerídeos

A Tabela 2 mostra a composição triacilglicerídica obtida por HT-CGC, e a Figura 2 mostra um exemplo de cromatograma de TAG presente no óleo da microalga *Cyclotella*.

**Tabela 2.** Composição de triacilglicerídeos de óleos de microalgas.

TAG	Composição de triacilglicerídeos dos óleos de microalgas (%)					
	<i>Chlorella minutissima</i>	<i>Ankistrodesmus gracilis</i>	<i>Cyclotella sp.</i>	<i>Spirulina platensis</i>	<i>Entomoneis alata</i>	<i>Cylindrotheca closterium</i>
T42	-	-	-	-	1,0	-
T43	-	-	-	-	7,1	-
T44	0,8	-	2,6	-	1,1	22,0
T45	-	-	1,4	-	4,3	56,7
T46	2,5	-	26,2	-	35,4	4,8
T47	-	-	2,9	-	2,5	4,5
T48	5,5	7,8	56,0	-	43,7	10,9
T50	24,5	7,3	6,7	2,9	5,0	-
T52	41,0	27,5	2,4	18,8	-	-
T54	20,5	45,4	1,4	54,4	-	-
T56	3,7	3,8	0,3	11,7	-	-
T58	1,0	2,5	-	10,5	-	-
T60	0,3	2,1	-	1,6	-	-
T62	-	3,4	-	-	-	-



**Figura 2.** Cromatograma de TAG do óleo da microalga *Cyclotella sp.* por HT-CGC em coluna apolar.

A análise cromatográfica do óleo de microalga em coluna apolar curta mostrou uma rápida separação (menor que 3 minutos) dos picos de TAG de acordo com o número de

átomos de carbono dos ácidos graxos do TAG. Por exemplo, T50 é um TAG com 50 átomos de carbono (excluindo a cadeia de carbono do glicerol) na somatória dos átomos de carbono das três cadeias carbônicas dos ácidos graxos ligados ao glicerol.

A análise por HT-CGC mostrou que alguns dos óleos de microalgas analisados são mais ricos em TAG do que outros. Isso pode ser visto através da intensidade do sinal dos picos do TAG, que são maiores para os óleos das microalgas *C. minutíssima* e *Cyclotella sp.* É possível estabelecer nessas amostras que os ácidos graxos são distribuídos em mais classes de TAG (9 classes), se comparado com amostras de óleo das microalgas *A. gracilis* (8 classes), *A. platensis* (6 classes), *C. closterium* (5 classes) e *E. alata* (8 classes).

O óleo extraído da microalga *C. minutíssima* é predominantemente composto por TAG de cadeias médias como T50, T52 e T54, cujo conteúdo é de 86% do total de TAG. A microalga *A. gracilis* e *A. platensis* são caracterizadas pela presença de T52 e T54, que representam 73% do total de TAG. É importante mencionar que as oleaginosas mais comuns<sup>8</sup> usadas para a produção de biodiesel<sup>1</sup> contém TAG com T50 a T54.

*C. closterium*, *Cyclotella sp.* e *E. alata* mostraram ser, dentre as seis microalgas analisadas, as microalgas com menores cadeias de TAG. Os TAG predominantes em *C. closterium* foram T44 e T45, e para *Cyclotella* e *E. alata*, T46 e T48. Porém esses TAG não são os de menor cadeia quando comparados com os presentes em óleos vegetais como óleo de palma, murumuru e tucumã<sup>8</sup> que apresentam predominantemente os TAG T36 e T42.

## 5. Conclusão

Entre todas as microalgas analisadas, *Arthrospira platensis*, *Entomoneis alata* e *Cylindrotheca closterium* mostraram ser úteis para outras finalidades, em vez da produção de biodiesel a partir de seu óleo. Isso é devido à presença dos ácidos graxos  $\gamma$ -linolênico e araquidônico, na microalga *A. platensis*, que afetam a estabilidade oxidativa do biodiesel, porém são importantes e de alto valor comercial como suplementos alimentícios.

*Chlorella minutíssima* e *Ankistrodesmus gracilis*, provavelmente, vão produzir biodiesel com ótima estabilidade oxidativa, porém com maiores temperaturas de CFPP.

*Cyclotella sp.* mostrou ser a microalga mais importante, dentre os seis táxons analisados, para a produção de biodiesel com qualidade de especificações aceitáveis, devido ao balanço entre ácidos graxos saturados e monoinsaturados, além da presença predominante de ácidos graxos de cadeia média como ácido palmitoléico (C16:1 cis9) e palmítico (C16:0) que vão proporcionar viscosidade e massa específica adequadas.

Embora a análise cromatográfica dos TAG seja mais rápida do que a análise de FAME, a composição de TAG não fornece informações que permitem prever a qualidade do biodiesel produzido a partir do óleo de microalga. Entretanto, a análise de TAG por HT-CGC pode ser útil para avaliar se um óleo de microalga é composto predominantemente por triacilglicerídeos ou outro tipo de lipídeos, devido à intensidade do sinal dos picos de TAG.

## 6. Agradecimentos

Ao MCT, FINEP, FUNAPE E CNPq pelo apoio financeiro. Ao CNPq e à CAPES pelas bolsas de estudo concedidas a Bruna Silva Ferreira e à mestranda Aline Terra Soares. Aos colegas do laboratório, pelo apoio e companheirismo. À orientação do professor Nelson Roberto Antoniosi Filho.

## 7. Referências Bibliográficas

1. Singh S., P., Singh D. Biodiesel production through the use of different source and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **2010**; 14 (1): 200-216.
2. Li Y., Horsman M., Wu N., Lan C. Q., Dubois-Calero N. Biocatalysis and Bioreactor design. *Biotechnology Progress*. **2008**; 24 (4): 815-820.
3. Costa Neto P. R., Rossi L. F. S., Zagonel G. F., Ramos L. P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química nova*. **2000**; 23 (4): 531-537.
4. Valkman J. K., Barretti S. M., Blackburn S. I., Mansour M. P., Sike, E L., Gelin F. Microalgal biomarkers: A review of recent research developments. *Org. Geochem, Great Britain*. **1998**; 29: (5-7) 1163-1179.
5. Brown M. R., Jeffrey S. W., Volkman J.K., Dustan G. A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*. **1997**; 151 (1-4): 315-331.
6. Fidalgo J. P., Cid A., Torres E., Sukenik A., Herrero C. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*. **1998**; 166 (1-2): 105–116.
7. Converti A., Casazza A. A., Ortiz E. Y., Perego P., Borghi M. D. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris*. *Chem. Eng. Proces.: Process intensification*. **2009**; 48: 1146-1151.

8. Antoniosi Filho N. R. Lanças, F.M. Identification of FAMES using ECL values and a three-dimensional Kováts retention index system. *Journal of High Resolution Chromatography*. **2005**; 18 (3): 167-170.
9. Prado, C. P.; Franco, P. I. B. M.; Pereira, J.; Alves, M. I. R.; Gonçalves Júnior, A. C.; Leles, M. I. G.; Masca, M. G. C. C.; Antoniosi Filho, N. R. A. Produção de biodiesel etílico a partir do óleo de *Crambe abyssina*. *Anais 3ºRBTB*, 2009.
10. Lobo, I. P.; Ferreira, S. L. C.; Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Química Nova* **2009**, v.32, nº6, p.1596-1608.
11. Hu. Q., Sommerfeld M., Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert M., Darzins A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*. **2008**; 54: 621-639.
12. Allard B., Templier J. Comparison of neutral lipid profile of various trilaminar outer cell wall (TLS)-containing microalgae with emphasis on algaenan occurrence. *Phytochemistry*. **2000**; 54: 369-380.
13. Goad L. S., Simmons M. S., Lazinsky D., Hall J. Effect of light cycle on diatom fatty acid composition and quantitative morphology. *J. Phycol.* **1988**; 24:1-7.
14. Pahl, S. L., Lewis D. M., Chen F., King, K. Growth dynamics and the proximate biochemical composition and fatty acid profile of the heterotrophically grown diatom *Cyclotella cryptica*. *Journal Applied Phycology*. **2010**; 22: 165-171.
15. Sheehan J., Dunahay T., Benemann J., Roessler P. A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program—Biodiesel from Algae, NREL Report, **1998**.
16. Tadros M. G. Screening and characterizing oleaginous microalgal species from the Southeastern United States. A final subcontract report of U.S. Department of Energy. **1985**.
17. Zhukova N. V., Aizdaicher N. A. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry*. **1995**; 39: 351-356.
18. Otles S., Pire R. Fatty acid composition of *Chlorella* and *Spirulina* microalgae species. *Journal of AOAC international*. **2001**; 84 (6):1708-1714.
19. Colla L. M., Bertolin T. E., Costa J. A. V. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. *Z. Naturforsch C*. **2004**; 59 (1-2): 55-59.
20. Ronda S. R., Lele S. S. Culture conditions stimulating high  $\gamma$ -linolenic acid accumulation by *Spirulina platensis*. *Brazilian Journal of Microbiology*. **2008**; 39: 693-697.