

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUIZA SCHROEDER

**OBTENÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE BIOMASSA ÚMIDA DE MICROALGAS
ATRAVÉS DE SAPONIFICAÇÃO**

CURITIBA
2013

LUIZA SCHROEDER

OBTENÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE BIOMASSA ÚMIDA DE MICROALGAS
ATRAVÉS DE SAPONIFICAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: André Bellin Mariano, DSc
Co-orientador: José Viriato Coelho Vargas, PhD

CURITIBA
2013

-
- S381o Schroeder, Luiza
Obtenção de ácidos graxos de biomassa úmida de microalgas através de saponificação / Luiza Schroeder. – Curitiba, 2013.
88f. : il., tab., graf.
- Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais - PIPE.
Orientador: André Bellin Mariano
Co-orientador: José Viriato Coelho Vargas
Bibliografia: p. 80-88
1. Biodiesel. 2. Microalga. 3. Ácidos graxos. I. Mariano, André Bellin. II. Vargas, José Viriato Coelho. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.
- CDD: 662.88
-

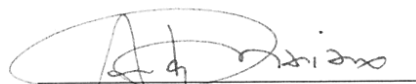


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais- PIPE
Setor de Tecnologia


RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos vinte e dois dias do mês de agosto de 2013, na Sala de Reuniões do NPDEAS - no Centro Politécnico - UFPR, foi instalada pelo Prof.^a Dr.^a Ana Sofia Clímaco Monteiro de Oliveira, Vice-Coordenadora do PIPE – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, a Banca Examinadora para a ducentésima quadragésima nona defesa de dissertação de mestrado na área de concentração: Engenharia e Ciência dos Materiais. Estiveram presentes no ato, além do coordenador do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes. A Banca Examinadora, atendendo a determinação do colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências dos Materiais, foi constituída pelos professores doutores: Prof. Dr André Bellin Mariano (UFPR), Carlos Itsuo Yamamoto (UFPR), Fabiano Rosa da Silva (Unicentro). Às 13:30 horas, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **LUIZA SCHROEDER** a fazer a apresentação da dissertação de mestrado intitulada “**OBTENÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE BIOMASSA ÚMIDA DE MICROALGAS ATRAVÉS DE SAPONIFICAÇÃO.**” Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes. Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca decidiu pela APROVAÇÃO do candidato. (de acordo com a determinação dos artigos 68 e 69 da resolução 65/09 de 09.11.2009).

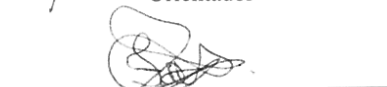
Curitiba, 22 de agosto de 2013.



Prof. Dr. André Bellin Mariano
Orientador



Prof. Dr. Carlos Itsuo Yamamoto
Examinador



Prof. Dr. Fabiano Rosa da Silva
Examinador

Dedico este trabalho aos técnicos e pesquisadores do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento em Energia Autossustentável.

AGRADECIMENTOS

Em meio a tantas pessoas que me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho, gostaria de agradecer em especial:

Ao Marcos Navarro, pelo incentivo a este projeto;

Ao Prof. PhD José Viriato Coelho Vargas pela orientação, incentivo e confiança depositada desde o início neste projeto;

Ao meu orientador, DSc. André Bellin Mariano pela credibilidade em mim depositada;

A todos meus colegas do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento e Energia Autossustentável - NPDEAS, principalmente à doutoranda. Marisa Scherer e à mestranda Amanda Cristina de Oliveira pelos momentos de descontração e amizade;

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia, Diego Correia, Beatriz Santos, Msc. Jacqueline Lemos, Nelson Selesu, Msc. Diniara Soares, Robson, Aline e sua orientadora, Prof. Dra. Nádia Krieger pelo auxílio e concessão dos equipamentos fundamentais à realização do projeto;

À técnica de laboratório, Cassiana Batista, por sua capacidade crítica e produtiva no trabalho conjunto em laboratório,

Ao doutorando Wellington Balmant pela ajuda e constante apoio;

Ao Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos e às mestrandas Francis Josiane e Maria Zuman pelo auxílio em etapas fundamentais deste trabalho,

Aos estagiários de Iniciação Científica Annelisa Schemberg, Gabriel Luiz Lopes Fraga e Lucas Grein, pela confiança em mim depositada,

Ao Laboratório de Análises de Combustíveis Automotivos - LACAUT, seu coordenador, Prof. Dr. Carlos Itsuo Yamamoto, e técnico Silvio pela simpatia e contribuição fundamental no projeto piloto;

Ao Departamento de Engenharia Química, pela utilização do Laboratório de Engenharia Química, e seu técnico Adolfo pelos serviços prestados;

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais,

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa concedida,

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ
- pelo apoio aos projetos de pesquisa.

Ao meu parceiro e amigo, Silvio Cariboni e a minha família, pelo amor,
amizade, compreensão e apoio dados durante o desenvolvimento deste projeto,

A todos que, de alguma forma, contribuíram ao desenvolvimento deste
trabalho.

Muito Obrigada!!!

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.”
George Bernad Shaw

RESUMO

As microalgas são um grupo diversificado de microorganismos quanto a sua composição química, desse modo apresentam inúmeras aplicações biotecnológicas por serem excelentes fontes de proteínas, carboidratos, carotenos e ácidos graxos. Mais recentemente, tem-se avaliado o potencial de extração de lipídeos de microalgas para produção de biodiesel. A produção de biodiesel de microalgas consiste em várias etapas, dentre elas, a extração de óleo apresenta-se como desafio para o desenvolvimento deste biocombustível. Diante disso, este trabalho teve por objetivo geral obter ácidos graxos da biomassa úmida de microalgas através da saponificação, alternativa aos processos que requerem biomassa seca e sucessivas extrações com solventes orgânicos. Para isso, foram cultivados 2 lotes de biomassa de microalgas do gênero *Scenedesmus* em sala de cultivo, e 2 cultivados em fotobiorreator tubular externo com capacidade para 10 m³ de cultivo. A separação da biomassa foi realizada por floculação pela adição de solução aquosa NaOH 3mol.L⁻¹. A extração por saponificação a partir da biomassa úmida ocorreu na presença de uma solução alcoólica de etanol e KOH segundo um planejamento fatorial com três variáveis: volume de etanol, umidade da amostra e concentração do álcali, e dois níveis. Foram extraídos lipídeos totais dos lotes pelos métodos clássicos: a frio, segundo descrito por Bligh e Dyer (1959) e a quente, segundo Soxhlet (1879). Os extratos obtidos por todas as metodologias foram submetidos à esterificação pelo método de Harman e Lago (1973) modificado, e os ésteres submetidos à análise por cromatografia de fase gasosa para identificação da composição em ácidos graxos. Propriedades do biodiesel de microalgas como índice de saponificação e de iodo foram calculadas com o auxílio da composição química e foram semelhantes para as duas metodologias, o poder calorífico calculado foi semelhante ao descrito para a soja. Os rendimentos em ácidos graxos a partir da saponificação foram melhores para a condição central do planejamento fatorial (80% umidade e solução KOH 5%), 9-12 % em base seca, em lipídeos totais, o rendimento do método a frio foi de 14 - 16%, porém em termos de conversão em ésteres metílicos de ácidos graxos, biodiesel, foi 60 a 75%, enquanto que a conversão dos extratos graxos obtidos por saponificação em biodiesel foi elevada, ao redor de 90% para os lotes 1 e 2, demonstrando a pureza do material extraído, e seletividade da saponificação para AG. O padrão de distribuição de ácidos graxos qualitativo e quantitativo nos cromatogramas de ambas as metodologias foram semelhantes, houve recuperação acima de 35% de ácidos graxos insaturados (lotes 1 e 2), o que pode acarretar possibilidades de oxidação no armazenamento do biodiesel produzido com estas características. O processo de saponificação foi realizado em escala piloto na condição central e resultou em um rendimento ao redor de 12 % de material graxo, indicando que a metodologia apresenta-se como uma alternativa para o processo em escala piloto no NPDEAS.

Palavras-chave: microalgas, óleo, ácidos graxos, biodiesel.

ABSTRACT

Microalgae have numerous biotechnological applications because they are excellent sources of protein, carbohydrates, fatty acids and carotenes. More recently, the potential for extraction of lipids from microalgae for biodiesel production is being studied. However numerous are the stages of research and development so that this source of oil becomes feasible for biofuel production, a major challenge is extracting oil from microalgae. In this work, the goal is to develop a methodology for extraction saponification of fatty acids of wet biomass of microalgae, since they are grown in aqueous medium and the classical methods of oil extraction are used for dry matrices. For this, four batches were grown biomass of microalgae of the genus *Scenedesmus*, two crops grown in heated room, and two cultivated in tubular photobioreactor with external capacity of 10 m³ cultivation. The biomass was flocculated with NaOH. The extraction was performed by saponification using wet biomass, ethanol and KOH according to a factorial design varying volume of ethanol, the sample moisture and alkali concentration. In addition to these tests, total lipids were extracted by standard methods batches of Bligh and Dyer (1959) and Soxhlet (1879). The extracts obtained by all the methods were subjected to esterification by the method of Harman and Lago (1973), and the esters analyzed by gas chromatography for identification of components in terms of fatty acids. Properties of biodiesel from microalgae as saponification number and iodine were calculated. The yields of fatty acids were better for the central condition (80% humidity and 5% KOH solution) in lots 1 and 2, and were around 12%, suitable for the species worked. Response surface Graphing were prepared at STATISTICA software, and indicated that use of an alcoholic solution less than 8% KOH and humidity between 50% and 80 show similar results for extraction by saponification. The yield and total lipids by Bligh and Dyer and Soxhlet was higher than the saponification (14-16%), but the conversion of fatty extracts of saponification biodiesel was high, around 90% for lots 1 and 2, demonstrating the purity of the extracted material, whereas from the same lipids ranged from 60-75%. The chromatograms of both methods were similar and palmitic and oleic fatty acids were identified, resulting in improving the properties of biodiesel from microalgae. The saponification process was conducted in a pilot scale in the central condition and resulted in a yield around 12% fatty acids, considered satisfactory.

Keywords: microalgae, oil, fatty acids, biodiesel.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - CULTIVO EM SISTEMAS ABERTOS. FONTE: (SPERAZZO; BAGHERPOUR,1998).....	22
FIGURA 2 – REAÇÃO DE SÍNTESE DOS TRIACILGLICERÍDEOS. FONTE: (MERÇON, 2010).....	27
FIGURA 3 - REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DE UM TRIACILGLICERÍDEO. FONTE: (DAMBISKI, 2007).....	29
FIGURA 4 - REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DE UM ÁCIDO GRAXO. FONTE: ADAPTADO DE SERRA (2010).....	30
FIGURA 5 - MECANISMO DE SAPONIFICAÇÃO DOS TRIACILGLICERÍDEOS. FONTE: (VERGA REI, 2009)	34
FIGURA 6 - FOTOMICROGRAFIA DA MICROALGA <i>Scenedesmus</i> sp.. (AUMENTO DE 400 X). FONTE: A AUTORA (2012).....	40
FIGURA 7 - SISTEMA DE CULTIVO DE <i>Scenedesmus</i> sp. EM SALA DE CULTIVO. FONTE: A AUTORA (2012).....	42
FIGURA 8 - ASPECTO VISUAL DAS MICROALGAS FLOCULADAS NO AGITADOR MECÂNICO. FONTE: A AUTORA (2011).	43
FIGURA 9- SISTEMA DE CULTIVO DE <i>Scenedesmus</i> sp. EM FBR DO NPDEAS. FONTE: NPDEAS (2012).	44
FIGURA 10 - ASPECTO VISUAL DA BIOMASSA SECA (A) E ÚMIDA (B). FONTE A AUTORA (2011)	45
FIGURA 11 - FLUXOGRAMA DA REAÇÃO DE SAPONIFICAÇÃO. ADAPTADO DE NPDEAS (2011).	46
FIGURA 12 - APARATO EXPERIMENTAL PARA EXTRAÇÃO SOXHLET. FONTE: CEPPA (2012).....	51
FIGURA 13 – FLUXOGRAMA DO MÉTODO DE ESTERIFICAÇÃO	52
FIGURA 14 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO PILOTO DE SAPONIFICAÇÃO NO NPDEAS. FONTE: NPDEAS (2012).	59
FIGURA 15 - ÁCIDOS GRAXOS OBTIDOS A PARTIR DOS MAIORES RENDIMENTOS DA EXTRAÇÃO POR SAPONIFICAÇÃO.....	61

FIGURA 16 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POR SAPONIFICAÇÃO EM RELAÇÃO AO VOLUME DE ETANOL E UMIDADE POR GRAMA DE BIOMASSA SECA.....	62
FIGURA 17 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POR SAPONIFICAÇÃO EM RELAÇÃO AO VOLUME DE ETANOL E MASSA DE KOH POR GRAMA DE BIOMASSA SECA.....	63
FIGURA 18 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POR SAPONIFICAÇÃO EM RELAÇÃO À UMIDADE E MASSA DE ÁLCALI POR GRAMA DE BIOMASSA SECA.....	64
FIGURA 19 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE SOLUÇÃO ALCOÓLICA UTILIZADA E UMIDADE.....	65
FIGURA 20 - LIPÍDEOS TOTAIS OBTIDOS A PARTIR DA EXTRAÇÃO Á FRIO DOS LOTES DE BIOMASSA.....	66
FIGURA 21 ASPECTO VISUAL DO MATERIAL GRAXO EXTRAÍDO POR A) MÉTODO A FRIO E B) SAPONIFICAÇÃO. FONTE: O AUTOR (2012).....	64
FIGURA 22 - TEOR DE ÉSTERES A PARTIR DA CONVERSÃO DOS EXTRATOS DE LT E AG EM ÉSTERES METÁLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS.	70
FIGURA 23 – MATERIAL GRAXO OBTIDO POR SAPONIFICAÇÃO EM ESCALA PILOTO.....	76

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - APLICAÇÕES COMERCIAIS DAS MICROALGAS.....	24
TABELA 2 - PRODUTIVIDADE EM ÓLEO E BIODIESEL DE DIFERENTES MATÉRIAS-PRIMAS. FONTE: ADAPTADO DE (MATA, 2010).....	21
TABELA 3 - AS ESTRUTURAS DE ÁCIDOS GRAXOS COMUNS E SUA NOMENCLATURA.....	28
TABELA 4 - CONDIÇÕES DE CULTIVO DOS LOTES DE BIOMASSA DE <i>Scenedesmus</i> sp.....	41
TABELA 5 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DOS LOTES DE BIOMASSA DE <i>Scenedesmus</i> sp.....	45
TABELA 6 - NÍVEIS PARA A DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DA REAÇÃO DE SAPONIFICAÇÃO COM KOH PARA 1 g DE AMOSTRA SECA.....	48
TABELA 7 - PLANEJAMENTO FATORIAL ESTATÍSTICO PARA A REAÇÃO DE SAPONIFICAÇÃO.....	48
TABELA 8 - CONDIÇÕES REACIONAIS DETERMINADAS PELO PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO PARA A REAÇÃO DE SAPONIFICAÇÃO.	49
TABELA 9 - RESULTADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2 ³ PARA EXTRAÇÃO DE AG DA BIOMASSA SAPONIFICAÇÃO.	61
TABELA 10 - RESULTADO DA CONVERSÃO MÁSSICA EM EMAG'S.....	67
TABELA 11 - CONVERSÃO MÁSSICA (%) EM EMAG.	67
TABELA 12 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS EXPERIMENTOS DE SAPONIFICAÇÃO.....	71
TABELA 13 - COMPOSIÇÃO EM AG DOS LOTES UTILIZADOS PARA EXTRAÇÃO PELO MÉTODO A FRIO E POR SAPONIFICAÇÃO.....	69
TABELA 14 - PROPRIEDADES ESTIMADAS DOS EMAG'S OBTIDOS A PARTIR DOS LOTES CULTIVADOS NO FBR.	74
TABELA 15 – PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS OBTIDOS PELO PROCESSO PILOTO DE SAPONIFICAÇÃO.....	77

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 MICROALGAS	20
2.1.1 Sistemas de cultivo de microalgas	21
2.1.1.1 Lagoas abertas.....	21
2.1.1.2 Fotobiorreatores fechados.....	22
2.1.2 Aplicações biotecnológicas das microalgas	23
2.1.3 Microalgas como biocombustível de segunda geração	23
2.2 BODIESEL	26
2.2.1 Síntese do biodiesel	27
2.2.2.1 Transesterificação de triacilglicerídeos.....	28
2.2.2.2 Esterificação de ácidos graxos.....	30
2.3 BODIESEL DE MICROALGAS.....	30
2.3.1 Processos de extração de óleo de microalgas	31
Um tópico particularmente importante na produção de biodiesel de microalgas é a extração do óleo.....	31
2.3.1.1 Extração pelo método a frio proposto por Bligh e Dyer (1959).....	31
2.3.1.2 Extração com fluido supercrítico	32
2.3.1.4 Extração de ácidos graxos por saponificação	33
2.3.2 Estimativa das propriedades do biodiesel de microalgas	35
2.4 DESAFIOS NA TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DE BODIESEL DE MICROALGAS	37
3 OBJETIVOS	39
3.1 OBJETIVO GERAL	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 CULTIVO DA MICROALGA <i>Scenedesmus sp.</i>	40
4.1.1 Sala de cultivo	41
4.1.2 Fotobiorreator.....	43
4.2 SECAGEM DA BIOMASSA.....	44
4.3 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POR SAPONIFICAÇÃO.....	45
4.3.1 Planejamento experimental.....	47
4.4 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS (LT) PELO MÉTODO A FRIO.....	49
4.5 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS PELO MÉTODO A QUENTE.....	50
4.6 ESTERIFICAÇÃO <i>IN SITU</i> PELA METODOLOGIA DE HARTMAN E LAGO (1973) MODIFICADA	51

4.6.1 Esterificação dos extratos de material graxo obtidos por saponificação e extração a frio.....	52
4.7 ANÁLISES DOS PRODUTOS.....	53
4.7.1 Ácidos graxos obtidos por saponificação	53
4.7.2 Lipídeos totais obtidos pelo método de extração a frio	54
4.7.3 Lipídeos totais obtidos pelo método de extração a quente	54
4.7.4 Teor de ésteres na biomassa <i>in natura</i>	54
4.7.5 Conversão mássica em ésteres metílicos de ácidos graxos – EMAG's	54
4.7.6 Teor de ésteres a partir da conversão dos extratos de LT e AG em EMAG's ..	55
4.7.7 Análises dos resultados do planejamento fatorial para saponificação	55
4.8.1 Cromatografia de fase gasosa	56
4.8.2 Estimação das propriedades dos EMAG's obtidos.....	57
4.9 SAPONIFICAÇÃO EM ESCALA PILOTO NO NPDEAS	58
5.1 EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS POR SAPONIFICAÇÃO	60
5.2 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	62
5.3 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS PELOS MÉTODOS A QUENTE E A FRIO.....	64
5.5 CONVERSÃO DOS EXTRATOS DE AG E LT EM EMAG'S.....	66
5.6 COMPARAÇÃO DO TEOR DE ÉSTERES OBTIDOS A PARTIR DO MÉTODO <i>IN SITU</i> , EXTRAÇÃO A FRIO E DE SAPONIFICAÇÃO	68
5.7 ANÁLISE DA VARIÂNCIA – ANOVA para extração de AG por saponificação....	71
5.8 COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS	72
5.9 ESTIMATIVA DAS PROPRIEDADES DOS EMAG's	73
5.10 RENDIMENTO DO PROCESSO PILOTO DE SAPONIFICAÇÃO	75
6 CONCLUSÕES.....	76
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AG	Ácidos graxos
LT	Lípídeos totais
EMAG	Ésteres metílicos de ácidos graxos
FAME	Fatty acid methyl esters
X	Conversão mássica
II	Índice de Iodo
PCS	Poder calorífico Superior
IS	Índice de Saponificação
FBR	Fotobiorreator
NPDEAS	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável
MFR	Método á frio
SAP	Saponificação
h	Hora
EtOH	Etanol
%	Por cento
°C	graus Celsius
NOx	Óxidos de nitrogênio
rpm	Rotações por minuto
MM	Massa molar
nm	Nanômetro
ha	hectare
M	Média
<i>sp.</i>	Espécie
σ	Erro padrão da amostra
CSTR	Reator agitado contínuo
ANP	Agência Nacional do Petróleo

1 INTRODUÇÃO

As microalgas são um grupo de microorganismos que tem despertado interesse ao seu potencial significativo para aplicações industriais: tanto como matéria-prima na aquicultura, assim como para a produção de bioprodutos valiosos, tais como lipídeos, carotenóides e proteínas. Além disso, variações nos fatores de cultivo (temperatura, pH, luz, fonte de carbono, salinidade, nutrientes) têm sido utilizados para melhorar tanto a produtividade de biomassa bem como de bioprodutos específicos. Particularmente, as microalgas podem constituir excelente fontes de óleo na forma de lipídeos e ácidos graxos para aplicações na produção de biodiesel (BENEMANN *et al.*, 1982; CHISTI, 2007). Neste trabalho por vezes será denominado óleo de microalgas, tanto os triacilglicerídeos quanto à mistura de ácidos graxos, também será utilizada a denominação material graxo para o produto da saponificação.

Avanços significativos têm também sido realizados para melhorar as formas de cultivo e no processamento para obter/separar biomassa celular e óleo. Contudo, a maior parte dos artigos concentram-se no desenvolvimentos de metodologias em escala de laboratório (KONUR, 2011).

Neste cenário, foi criado o Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS) do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR) a partir dos projetos aprovados pelo CNPq (Edital MCT/CNPq/CTA Agro/CTBio 39/2007) de incentivos à pesquisa de matérias-primas para a produção de biodiesel.

Este projeto tem como propósito construir um prédio autossustentável em energia elétrica gerada a partir da queima do biodiesel produzido do material graxo extraído de microalgas cultivadas em fotobiorreatores tubulares.

A definição brasileira do biodiesel, de acordo com a Resolução nº 14 da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2012), determina que o biodiesel (B100) é um “combustível composto de alquilésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, produzido a partir da transesterificação ou esterificação de matérias graxas, de gorduras de origem animal ou vegetal, e que atenda as especificações contidas no Regulamento Técnico”. O óleo de soja tem sido a matéria-prima mais utilizada para a fabricação do biodiesel no Brasil, mais de

80% da produção de biodiesel advém do óleo de soja (ANP). Este cenário pode colocar em risco a oferta de biodiesel, uma vez que o preço da soja é controlado pelo mercado global, pelo fato desta ser uma commodity atrelada ao mercado alimentício (CARVALHO *et al.* , 2011). Por isso, os governos mundiais estão apoiando programas de pesquisa, reduções e isenções fiscais para a produção industrial de matérias-primas alternativas para produção de biodiesel (PNPB, 2012).

A produção de biodiesel de microalgas, em contrapartida, é vantajosa do ponto de vista da não utilização de terras aráveis, como na agricultura, e também de que podem ser produzidas continuamente, fornecendo biomassa para extração de óleo o ano todo, fazendo com que sua produtividade seja superior a de muitas culturas de oleaginosas, no entanto, os custos de produção de biomassa e de conversão em biodiesel ainda tem barrado a sua utilização em larga escala (CHISTI, 2007; MARIANO *et al.*,2009).

A extração do material graxo de microalgas é relativamente dispendiosa em relação ao gasto de energia, uma vez que são microrganismos que vivem em meio aquoso. Assim, o desenvolvimento de um processo de extração viável energeticamente e que necessite de menos etapas de purificação é um grande desafio para a viabilidade do biodiesel derivado de microalgas. Portanto, este trabalho vem apresentar uma proposta de metodologia de extração de ácidos graxos via úmida, considerando a conversão dos ácidos graxos em biodiesel. Sobretudo, com o objetivo de desenvolver um método que seja passível de ser realizado em grande escala no NPDEAS para propiciar a produção de biodiesel a partir de microalgas.

1.1 ORGANIZAÇÃO DO DOCUMENTO

Esse documento encontra-se dividido em 6 seções. A primeira apresentou a introdução e a organização do documento. A segunda, a revisão bibliográfica dos temas pertinentes a essa dissertação: microalgas e aplicações, sistemas de cultivo, microalgas como fonte de óleo para biodiesel, produção de biodiesel, processos de extração de óleo de microalgas e desafios na tecnologia de produção de biodiesel de microalgas no NPDEAS. Na terceira, apresentam-se o objetivo geral e as metas para ser alcançado. Na quarta seção, são abordados os materiais e métodos utilizados para obtenção dos resultados, que são apresentados e discutidos na

quinta seção. Finalmente, a quinta seção desse documento apresenta as conclusões inferidas a partir dos resultados obtidos neste trabalho.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MICROALGAS

Microalgas são um grupo heterogêneo de organismos com uma série de características que os distinguem, como o tamanho da célula, cor, habitat aquático, bem como ser unicelular e muitas vezes fotoautotrófica, também podem ser procarióticas ou eucarióticas, e esta diversidade cria a capacidade de serem uma fonte de produtos para alimentação humana e animal, indústrias farmacêuticas e de combustível (OLAIZOLA, 2003).

As microalgas unicelulares constituem a base das cadeias tróficas aquáticas. Vivem em suspensão (fitoplâncton) ou aderidas ao substrato consolidado ou arenoso (microfitobentos), podendo estar isoladas ou em cadeias. As características taxonômicas e a dinâmica espaço-temporal das comunidades microalgais são estabelecidas pelo regime meteorológico, circulação e características geomorfológicas regionais, podendo ser alteradas por impactos antropogênicos nas áreas costeiras e por fatores biológicos, sobretudo nas relações tróficas (BRANDINI *et al.*, 1997).

Nos últimos anos, as microalgas ganharam atenção como uma possível fonte alternativa para produção de biocombustível, e como uma fonte potencial de muitos compostos bioativos destinados ao consumo humano (ômega-3, o qual é comumente proveniente de populações de peixes). Devido à preocupação de sustentabilidade dos peixes, as microalgas têm o potencial de ser uma alternativa viável para a obtenção de óleos ricos em ômega-3 (CONNOR, 2000).

Já quando se remete a produção de biodiesel a partir do material graxo de microalgas, esses microrganismos apresentam vantagens sobre as tradicionais culturas energéticas, pois têm uma taxa de crescimento superior a de outras oleaginosas, bem como a utilização de uma área menor para produzir a mesma quantidade de óleo (LEE *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2010). Além disso, com microalgas não há competição por espaço de terra que poderia ser usado para culturas alimentares (KHAN *et al.*, 2009). Por exemplo, usando o amido do milho como matéria-prima para fabricação de etanol pode-se criar uma competição entre

o fornecimento para consumo humano e/ou animal ou para a produção de combustível.

Microalgas também têm o potencial para neutralizar parte do efeito estufa e poluição da água, pois através da fotossíntese as microalgas, têm a capacidade de fixar dióxido de carbono produzido por plantas industriais e a absorção de nutrientes resulta em purificação de águas residuárias (KONUR, 2011; HO *et al.*, 2010). Algumas microalgas também podem fixar nitrogênio e absorver outros contaminantes, como metais pesado e fósforo (BRANDINI *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 2007).

2.1.1 Sistemas de cultivo de microalgas

2.1.1.1 Lagoas abertas

Tradicionalmente, o cultivo de microalgas tem sido realizado em tanques abertos, como indicado na FIGURA 1, com numerosas instalações comerciais existentes (SPERAZZO; BAGHERPOUR, 1998). Segundo Benemann e colaboradores. (1982) o conceito de Lagoas de Alta Taxa (*High Rate Pond* - HRP) têm sido elaborado desde 1950, nos Estados Unidos, Alemanha, Israel e Japão baseando-se em lagoas abertas, canalizadas, rasas e de baixo escoamento. Nestes sistemas, em forma de circuito fechado, o meio de cultivo é impulsionado por paletas rotatórias e geralmente requerem grandes áreas (500-5000 m²), mas têm como vantagem o baixo custo de produção de biomassa de microalgas (FLORES; PENACASTRO; FLORES-COTERA, 2003). Os tanques são, geralmente, construídos em concreto, fibra de vidro, policarbonato, com fundo de terra ou revestido com material plástico.

As lagoas têm sido menos usadas devido à baixa produtividade e à dificuldade de se manter turbulência suficiente para que as células das microalgas possam utilizar o máximo da fonte luminosa (DUARTE; RADMANN; COSTA, 2003).



FIGURA 1 - CULTIVO EM SISTEMAS ABERTOS. Fonte: (SPERAZZO; BAGHERPOUR,1998).

2.1.1.2 Fotobiorreatores fechados

Fotobiorreatores podem ser definidos como sistemas utilizados para o desenvolvimento de reações fotossintéticas. Os cultivos são realizados em sistema fechado, em painéis de forma achatada, serpentinadas, espirais ou cilindros, construídos com tubos de plástico, vidro ou policarbonato (PÉREZ, 2007).

Estes equipamentos podem ser classificados de acordo com o modo de alimentação da mistura reagente (descontínuo ou contínuo), através do tipo de escoamento (mistura completa ou pistonada), pelo tipo de cultivo empregado (células livres ou imobilizadas) e através da configuração do biorreator (reatores abertos ou fechados) (MUÑOZ, 2005).

Os reatores de mistura completa são caracterizados pela intensa homogeneização da cultura. A concentração dos compostos é a mesma em qualquer parte do sistema, bem como na saída do reator. Por outro lado, nos reatores de fluxo pistonado, o meio reacional move-se através do reator sem que ocorra a mistura axial dos componentes, de forma que a estabilização ocorre através de gradientes de concentração na direção longitudinal do sistema (NIELSEN; VILLADSEN; LIDÉN, 2003). Desta forma, os reatores de mistura completa são utilizados preferencialmente quando os compostos presentes provocam a inibição celular, uma vez que permitem a diluição das concentrações. Quando não há problemas de inibição, os reatores tubulares são preferidos, por permitirem o cultivo de microrganismos em elevadas concentrações de nutrientes, favorecendo a taxa de crescimento. Os reatores de fluxo pistonado, entretanto, não são comumente utilizados em sistemas com microalgas, devido à necessidade de agitação intensa associado a elevadas áreas de exposição à energia luminosa, características

facilmente obtidas em sistemas de tanques agitados (GROBBELAAR,1994). As configurações mais comuns utilizadas em fotobiorreatores são os reatores tubulares (coluna de bolhas) e sistemas tubulares arranjados em espiral (MERCHUK; WU; 2004; MOLINA GRIMA *et al.*, 1999).

No entanto, a classificação mais utilizada faz referência ao tipo de fotobiorreator, sendo os mais conhecidos os reatores de coluna vertical, os de placas planas e os tubulares – verticais ou horizontais.

2.1.2 Aplicações biotecnológicas das microalgas

Atualmente, destaca-se o estudo bioquímico das microalgas, principalmente, devido ao interesse comercial dos produtos derivados do seu metabolismo. Investigações farmacológicas dos metabólitos produzidos por vários gêneros de microalgas mostraram atividades biológicas, entre elas, atividade antibiótica para a microalga *Phaeocystis* sp, atividade antiviral em cianobactérias e antioxidante nas microalgas *Dunaliella primolecta* e *Haematococcus pluvialis* (PELEGRIN, 2001). Na TABELA 1 são exemplificadas as principais aplicações comerciais das microalgas.

2.1.3 Microalgas como biocombustível de segunda geração

As microalgas podem servir como matéria-prima para se produzir vários tipos de combustíveis renováveis, uma vez que são compostas de carboidratos, proteínas e lipídeos. Por sua capacidade de sintetizar triacilglicerídeos e ácidos graxos vem sendo estudada para produção de biocombustível de segunda geração, já que os mesmos podem ser transformados em biodiesel (TEIXEIRA; MORALES, 2006).

As microalgas mais estudadas para a produção de biodiesel são as pertencentes aos grupos das cianofíceas (ou cianobactérias), clorofíceas (mais conhecidas como algas verdes) e diatomáceas, a citar os gêneros com maior conteúdo lipídico: *Chlorella* sp. 18 a 57%; *Dunaliella* sp. de 17,5 a 67%;

Scenedesmus obliquus 11 a 55% (BAKY *et al.*, 2012; ZAO *et al.*,2012; LI *et al.*,2011; GOUVEIA;OLIVEIRA, 2009).

TABELA 1 - APLICAÇÕES COMERCIAIS DAS MICROALGAS.

Área	Aplicação
I. Alimentos	Suplemento protéico/ fortificação de dietas de adultos e crianças desnutridas
II. Alimentação animal	Suplemento de proteínas e vitaminas para peixes, aves e frutos do mar.
III. Terapias	Produção de pigmentos para tratamento de câncer. Regulação da síntese de colesterol. Produção de antibióticos.
IV. Pigmentos	Produção de pigmentos para indústria alimentícia e reagentes analíticos.
V. Química Fina	Polissacarídeos para gomas. Glicerol para alimentos, cosméticos.
VI. Combustíveis	Extração de lipídeos para produção de biocombustíveis. Hidrogênio. Biogás. Etanol.
VII. Hormônios	Auxinas, giberilinas.
VIII. Outros	Condicionador de solos. Tratamento de Efluentes.

FONTE: ADAPTADO PELA AUTORA (BECKER,1994).

Embora o teor e o tipo de lipídeos dependa do gênero da microalga, geralmente este conteúdo é maior que o de outras culturas de óleos vegetais, como mostrado na TABELA 2, que compara a eficiência e produção de biodiesel quanto ao uso da terra por microalgas (com teor hipotético de 30% de lipídeos) e outras culturas de óleos vegetais, incluindo o teor de óleo em peso seco e a produção de óleo por hectare, por ano (CHISTI, 2007; TEIXEIRA, MORALES, 2006; HILI, FEINBERG, 1984).

A TABELA 2 mostra que, embora os teores de lipídeos sejam compatíveis entre plantas superiores e microalgas, existem variações significativas na produtividade global e conseqüentemente no rendimento em biodiesel, com vantagem para microalgas. Em termos de uso da terra, o óleo de microalgas,

seguido do óleo de palma são os mais vantajosos devido a sua maior produtividade de biomassa e rendimento de óleo.

TABELA 2. PRODUTIVIDADE EM ÓLEO E BIODIESEL DE DIFERENTES MATÉRIAS-PRIMAS.
FONTE: ADAPTADO DE (MATA *et al.*, 2010).

MATÉRIA-PRIMA	TEOR DE ÓLEO (%)	PRODUTIVIDADE EM ÓLEO (l.ha ⁻¹ a ⁻¹)	ÁREA NECESSÁRIA (m ² .ano ⁻¹ .kg ⁻¹ BIODIESEL)	PRODUTIVIDADE EM BIODIESEL (kg.ha ⁻¹ .a ⁻¹)
Milho	44	172	66	152
Soja	18	636	18	562
Canola	41	1.190	12	862
Girassol	40	1070	11	946
Mamona	48	1307	9	1156
Palma	36	5366	2	4747
Microalga	30	58700	0,2	51927

Além das vantagens em relação à produção de óleo na forma de lipídeos, as microalgas podem também ser cultivadas em água do mar, água salobra e águas residuárias; podem sequestrar CO₂ dos gases de combustão de instalações industriais que utilizam combustíveis fósseis, reduzindo assim as emissões desse gás que é um dos principais causadores do aquecimento global, estima-se que para produzir 1 kg de biomassa de microalgas são necessários 1,8 kg de CO₂ (CARVALHO *et al.*, 2011); a biomassa residual após a extração dos lipídeos pode ser utilizada como fonte proteica na alimentação animal, como fertilizante ou até mesmo ser utilizada, após um tratamento físico, químico ou biológico para despolimerização da celulose e do amido, para fermentação e produção de etanol.

No entanto, a sua utilização com a finalidade de produzir biodiesel ainda apresenta desvantagens como, por exemplo, o custo dos sistemas de produção de biomassa em grande escala (fotobiorreatores), a eficiência da colheita da biomassa (separação do meio aquoso), e eficiente extração lipídica para produção de biodiesel (SONG; FU; SHI, 2008). Assim como, que o perfil em ácidos graxos gere um biocombustível com propriedades físicas e químicas adequadas para utilização em motores ciclo diesel.

2.2 BIODIESEL

A produção do biodiesel tem tido um interesse crescente em todo o mundo devido às flutuações dos preços do petróleo, aos benefícios ambientais associados à sua combustão e a um maior potencial para o desenvolvimento regional de países como o Brasil (LIMA, 2004; MARQUES, *et al.*, 2010). O biodiesel é renovável, menos tóxico, e mais biodegradável que o diesel de petróleo (MELO, 2007). Em termos ambientais, a substituição do óleo diesel por biodiesel é mais vantajosa, devido à grande redução das emissões de gases poluentes, em especial o CO₂ que é o principal causador do aquecimento global. Porém, existe um aumento nas emissões de óxidos de nitrogênio, cuja quantidade emitida se torna significativa a partir da utilização de misturas com mais de 20% de biodiesel, no entanto, essa questão pode ser resolvida com sistemas de pré-aquecimento do combustível, ou ainda com a utilização de um aditivo denominado agente redutor (KUCEK, 2004).

O biodiesel possui propriedades físico-químicas semelhantes ao diesel de petróleo e pode substituir, parcialmente ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo e gás natural em motores a combustão do ciclo diesel ou em outros sistemas, como por exemplo, equipamentos para geração de energia elétrica.

Dentre as matérias-primas que podem ser utilizadas para a produção de biodiesel estão os óleos vegetais (soja, algodão, canola, palma, girassol, entre outros), as gorduras animais, os óleos residuais de restaurantes e os ácidos graxos. Os óleos vegetais e as gorduras animais são basicamente constituídos de triacilglicerídeos, mas podem conter uma pequena quantidade de outros compostos apolares, tais como fosfolípidos, pigmentos, flavorizantes e enzimas (MELO, 2007; WUST, 2004).

O óleo de soja tem sido a matéria-prima mais utilizada para a fabricação do biodiesel, por ser o único agronegócio com escala para atender o mercado, seguida do sebo bovino e do óleo de algodão. A escolha da matéria-prima constitui um fator crítico no custo final do biodiesel, pois representa 50 a 85% desse. Portanto, para minimizar o custo do biodiesel, é importante fazer uma avaliação da matéria-prima

em relação ao rendimento, qualidade e aproveitamento dos coprodutos (SUAREZ; MENEGHETTI; PLENTZ; 2007).

2.2.1 Síntese do biodiesel

O processo para produção de biodiesel consiste na seleção do método adequado, que varia de acordo com a matéria-prima selecionada: transesterificação para os triacilglicerídeos e esterificação para os ácidos graxos.

Quimicamente, o biodiesel é constituído de ésteres de ácidos graxos, que podem ser obtidos por meio da transesterificação de triacilglicerídeos, ou da esterificação de ácidos graxos, ambos na presença de um álcool monohidroxilado de cadeia curta, como o etanol ou metanol e preferencialmente de um catalisador ácido ou básico, em condições experimentais adequadas (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009). Os produtos da reação com o metanol são muitas vezes denominados ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG's), ou FAME, do inglês, 'fatty acid methyl esters'.

Os óleos são substâncias de origem vegetal ou animal, são solúveis em solventes orgânicos e insolúveis em água. De um modo geral, são descritos como substâncias líquidas à temperatura ambiente (REDA; CARNEIRO, 2007). Na FIGURA 2, pode-se observar que os óleos são formados, principalmente, por triacilglicerídeos, resultante da combinação de três moléculas de ácido graxo e uma molécula de glicerol (glicerina). Os triacilglicerídeos, portanto, fazem parte dos lipídeos, e são encontrados nas membranas celulares e reservas energéticas das células vegetais (MERÇON, 2010).

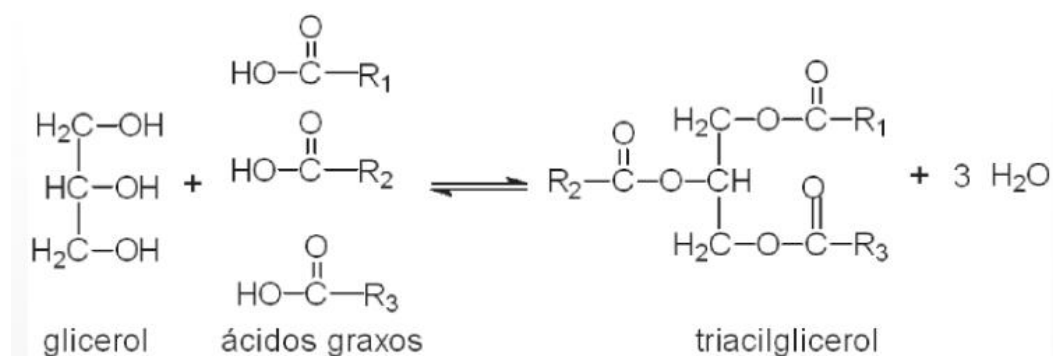


FIGURA 2 – REAÇÃO DE SÍNTESE DOS TRIACILGLICERÍDEOS. FONTE: (MERÇON, 2010).

Os ácidos graxos presentes nos óleos são constituídos, geralmente, por ácidos carboxílicos que contêm de 4 a 30 átomos de carbono e podem ser saturados ou insaturados, com sua distribuição variando em tipo e quantidade de acordo com o óleo. As estruturas de ácidos graxos comuns e sua nomenclatura são dadas na TABELA 3, em que o número ao lado do carbono (C) indica a quantidade de carbonos na cadeia e o número ao lado a quantidade de insaturações na estrutura, sendo 0 para molécula saturada, 1 para ácidos graxos monoinsaturados e 2 e 3 já para ácidos graxos poliinsaturados. O conhecimento da composição dos óleos determinará propriedades do biodiesel produzido, como a estabilidade à oxidação, desse modo, a qualidade do biodiesel pode sofrer variações conforme as estruturas moleculares dos seus ésteres constituintes ou devido à presença de contaminantes oriundos da matéria prima, do processo de produção ou formados durante a estocagem (PONTES, 2010).

TABELA 3 - ÁCIDOS GRAXOS COMUNS E SUA NOMENCLATURA.

Ácidos graxos	Fórmula
Láurico	C12:0
Mirístico	C14:0
Palmítico	C16:0
Palmitoléico	C16:1
Esteárico	C18:0
Oléico	C18:1
Linoléico	C18:2
Linolênico	C18:3

2.2.2.1 Transesterificação de triacilglicerídeos

A reação de transesterificação de óleos vegetais pode ocorrer por catálise básica ou ácida, homogênea ou heterogênea, que consiste na reação do triacilglicerol com um álcool de cadeia curta, normalmente usando metanol ou etanol, em condições experimentais adequadas de razão molar álcool:óleo, temperatura e tempo de reação; os catalisadores usualmente utilizados são alcóxidos de sódio e potássio, que podem ser obtidos da reação dos respectivos

hidróxidos com o álcool utilizado como agente da alcoólise (KUCEK, 2004) tais como o hidróxido de sódio ou potássio, onde é obtido biodiesel e glicerina (FIGURA 3).

A separação de fases é uma etapa importante no processo de produção de biodiesel. Se a reação atingir um alto nível de conversão, o produto formará duas fases líquidas e uma fase sólida se for usado um catalisador sólido. A fase inferior será a glicerina e a fase superior será uma mistura de álcool e ésteres (SRIVASTAVA; PRASAD, 2000).

A pureza dos reagentes é um fator importante que afeta significativamente o rendimento da conversão de biodiesel. O meio reacional deve estar isento de água para evitar a ocorrência de reações de hidrólise dos triacilglicerídeos e a formação de sabões que acabam consumindo o catalisador, levando a um aumento na viscosidade, formando emulsões e dificultando a separação da glicerina (DAMBISKI, 2007).

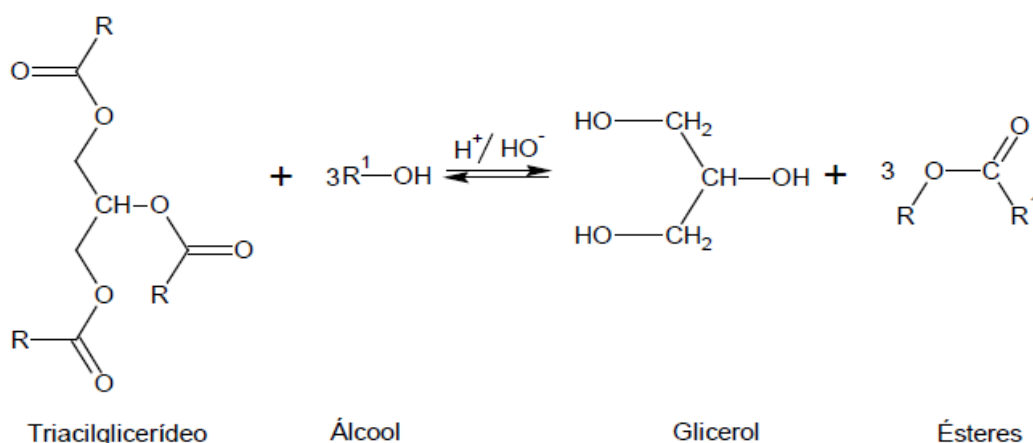


FIGURA 3 - REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DE UM TRIACILGLICERÍDEO. FONTE: (DAMBISKI, 2007).

Entretanto, para teores de ácidos graxos livres maiores que 1%, a reação de transesterificação acarreta consumo excessivo do catalisador e perda considerável do potencial de rendimento em biodiesel devido à formação de sabão que impede a separação final do biodiesel da glicerina (VIEIRA, 2011).

A estratégia para materiais com alta acidez é converter ambas as frações (ácidos graxos livres e triacilglicerídeos) em biodiesel. Para este objetivo, duas reações podem ser conduzidas sequencialmente: uma etapa de esterificação dos

ácidos graxos livres seguida de uma etapa de transesterificação para produzir ésteres metílicos a partir dos triacilglicerídeos remanescentes (GERPEN, 2005).

2.2.2.2 Esterificação de ácidos graxos

A reação de esterificação consiste na obtenção de ésteres a partir da reação entre um ácido carboxílico e um álcool (por exemplo, metanol ou etanol), com formação de água como coproduto (FIGURA 4).

A formação de ésteres por meio da reação entre ácidos graxos livres e um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol) na presença de um catalisador ácido vem sendo considerada outra rota promissora para a obtenção de biodiesel (ARANDA *et al.*, 2009), pois possibilita a utilização de matérias ricas em ácidos graxos livres presentes em resíduos e subprodutos de processamentos industriais da biomassa, destacando os óleos brutos, borras ácidas, óleos usados em frituras e ainda produtos de origem animal, como a banha ou o sebo (WUST, 2004; XU *et al.*, 2008). Esses materiais graxos apresentam menor custo agregado em relação à matéria utilizada no processo de transesterificação (CARDOSO; NEVES; SILVA, 2008).

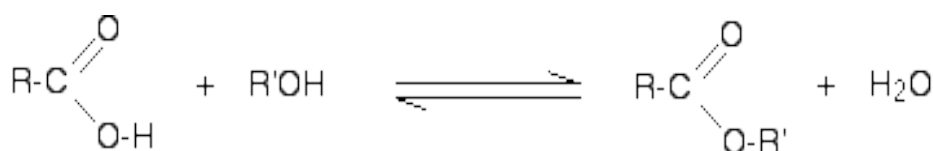


FIGURA 4 - REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DE UM ÁCIDO GRAXO. Fonte: ADAPTADO DE SERRA (2010).

2.3 BIODIESEL DE MICROALGAS

O potencial de produção de biodiesel de microalgas teve seu marco acadêmico com a publicação do pesquisador Chisti (2007), o qual apontou as microalgas como a possível fonte de óleo renovável e não competidora com a indústria alimentícia. Segundo o autor, microalgas podem apresentar até 80% de óleo em peso de biomassa seca. Sendo que, porcentagens de 20 a 50% são bastante comuns para algumas espécies. Porém, não aborda aspectos da qualidade

deste óleo para biodiesel nem os processos de extração, que são distintos para as microalgas em comparação com as outras oleaginosas, visto que elas são cultivadas em meio extremamente aquoso, aproximadamente 1 a 2 g de biomassa a cada litro de cultivo. Desse modo, uma breve descrição dos processos existentes para extração de óleo de microalgas é apresentada a seguir.

2.3.1 Processos de extração de óleo de microalgas

Um tópico particularmente importante na produção de biodiesel de microalgas é a extração do óleo.

A respeito das metodologias utilizadas em laboratórios para determinar o conteúdo lipídico de microalgas, há variáveis que afetam a extração de lipídeos que não são bem conhecidas, fazendo com que o escalonamento do processo para produção comercial seja difícil (HALIM *et al.*, 2011). Um processo de extração de óleo ideal para microalgas deveria ser seletivo para os lipídeos, a fim de minimizar a co-extração de contaminantes não lipídicos e priorizar frações lipídicas desejáveis (lipídeos neutros que contenham cadeias de ácidos graxos di-e trienóico) (FAJARDO *et al.*, 2007, MEDINA *et al.*, 1998).

A seguir, uma visão geral sobre alguns dos métodos mais utilizados nas pesquisas sobre extração de óleo de microalgas.

2.3.1.1 Extração pelo método a frio proposto por Bligh e Dyer (1959)

Em 1959, Bligh e Dyer sugeriram um método para extrair gordura a frio que utiliza uma mistura de três solventes: Clorofórmio, metanol e água. 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). Geralmente é utilizado como um método de pequena escala, isto é, a análise é feita em tubos de ensaio com a vantagem de proporcionar maior precisão na análise e reduzir gastos pelo gasto menor de solvente (BLIGH; DYER, 1959). Este procedimento foi originalmente projetado para extrair lipídeos a partir de tecido de peixe, porém, tem sido usada

como ponto de referência para a comparação de métodos de extração em microalgas. Uma desvantagem da utilização deste método é que, em grande escala, quantidades significativas de resíduos de solvente são geradas, fazendo com que a reciclagem de solventes seja dispendiosa. Há que se ressaltar também o fato de que a utilização de solventes orgânicos tóxicos como o clorofórmio e o metanol, que podem limitar a utilização dos resíduos para outras finalidades, por exemplo, alimentação animal com biomassa residual de microalgas. No entanto, os recentes estudos de viabilidade de produção de biodiesel a partir de microalgas tem utilizado este método para extração de lipídeos. Pandian e David (PRABAKARAN, RAVINDRAN, 2012) extraíram lipídeos totais de *Scenedesmus* sp. pelo método de Bligh e Dyer obtendo $27,04 \pm 0,75\%$, a maior quantidade em ácido oléico ($11,77 \text{ mg g}^{-1}$ em peso seco), demonstrando a potencialidade da mesma para produção de biodiesel. No entanto, nos extratos obtidos por esta metodologia, além dos lipídeos encontram-se outros materiais como clorofila e carotenóides que não se transformarão em biodiesel.

2.3.1.2 Extração com fluido supercrítico

A extração com fluido supercrítico envolve a utilização de substâncias que possuem propriedades de líquidos e gases quando expostas a elevadas temperaturas e pressões (SAHENA *et al.*, 2007). Esta propriedade permite-lhes atuar como um solvente de extração, não deixando resíduo quando o sistema é trazido de volta à pressão atmosférica e temperatura ambiente.

Fluidos supercríticos são um meio de extração promissor devido à sua difusividade molecular elevada e baixa viscosidade. O fluido supercrítico mais utilizado é o dióxido de carbono, pela sua disponibilidade, sua não toxicidade e custo. Uma restrição ao uso do CO₂ supercrítico é a umidade da amostra, que deve estar completamente seca, pois a umidade pode servir como barreira à difusão do CO₂ na amostra (MERCER & ARMENTA, 2011).

Halim *et al.* (2011) estudaram o desempenho da extração de lipídeos da microalga *Chlorococcum* sp. com dióxido de carbono supercrítico (CO₂ supercrítico) comparada à extração com solvente apolar, hexano, pelo método proposto por Soxhlet (1879). O rendimento máximo de lipídeos foi considerado baixo (7,1% em peso a seco da biomassa), porém exibiu um perfil adequado de ácidos graxos para

se produzir biodiesel: C18:1 (63%), C16:0 (19%), C18:2 (4%), C16:1 (4%), e C18:0 (3%). No entanto, para extração com CO₂ supercrítico, a redução da temperatura e aumento de pressão resulta em melhores rendimentos lipídicos. Todavia, a extração com fluido supercrítico em 80 minutos forneceu rendimento maior do que com 5,5 h de extração pelo método Soxhlet (1879).

2.3.1.3 Extração por Soxhlet (1879)

O método clássico de Soxhlet (1879) é a metodologia mais usada para extração de lipídeos de amostras. Ele foi originalmente desenvolvido para a extração de lipídeos a partir de um material sólido e quaisquer outros compostos difíceis de extrair (SOXHLET, 1879). Este aparato extrator utiliza refluxo de solvente em um processo intermitente, tem entre suas vantagens a facilidade de execução e o fato da amostra permanecer em contato com o solvente que está sempre sendo renovado no extrator. No entanto, o tempo requerido pela extração e o grande volume de solvente utilizado são desvantagens desse tipo de extração. Além disso, a degradação térmica de alguns lipídeos e o carregamento de outros compostos apolares na fase solvente são um inconveniente (LUKE DE CASTRO & GARCIA AYUSO, 1998). No entanto, a eficiência do método depende da: natureza do material a ser extraído; natureza e polaridade do solvente; ligação dos lipídeos com outros componentes; circulação do solvente através da amostra; tamanho das partículas; umidade da amostra; velocidade de refluxo e quantidade relativa de solvente.

Balasubramanian e colaboradores (2011) estudaram a extração de lipídeos de *Scenedesmus obliquus* por microondas, operando um sistema de 1,2kW a 95°C por 30 minutos obtiveram a extração máxima de lipídeos ($31,38 \pm 2,06\%$) em relação ao método clássico de Soxhlet (em 10 horas de extração), $40,71 \pm 4,46\%$. Ou seja, 77% dos lipídeos foram obtidos com uma redução de 20 vezes no tempo de extração. Foram obtidos em maior composição, lipídios insaturados, porém cálculos energéticos não foram realizados para nenhum dos métodos estudados.

2.3.1.4 Extração de ácidos graxos por saponificação

A saponificação é a reação dos triacilglicerídeos com álcali promovendo o rompimento das ligações ésteres na matriz lipoproteica, como demonstrado na Figura 5. Geralmente, prefere-se a utilização do hidróxido de potássio (KOH) por produzir sabão mole, o que determina a não solidificação dos extratos obtidos à temperatura ambiente, porém o hidróxido de sódio (NaOH) também é utilizado devido ao seu baixo custo (PERKINS, 1993).

Após a formação do sabão, é necessário transformá-lo no respectivo ácido graxo conjugado através de uma reação ácido/base, e em seguida é necessário efetuar uma esterificação dos ácidos graxos - AG's - de forma a transformá-los em biodiesel.

A principal vantagem da utilização deste processo é a possibilidade de não só converter triacilglicerídeos como também os ácidos graxos livres existentes, permitindo assim a utilização de óleos com altos valores de ácidos graxos livres, como as gorduras animais e material com certa umidade (GOMES, 2009). A principal desvantagem resulta de o processo consistir de uma basificação seguida de uma acidificação, o que resulta num elevado teor de sais no produto final. Este processo, além de requerer maiores dispêndios de reagentes, requer também um maior número de operações de separação/purificação, resultando custo maior em operações de separação/purificação (VERGA REI, 2007).

No entanto, no caso do biodiesel de microalgas, apresenta a vantagem de utilização da biomassa úmida *in natura*, sem a necessidade de secagem, pois a presença de água no meio reacional favorece a reação com o álcali.

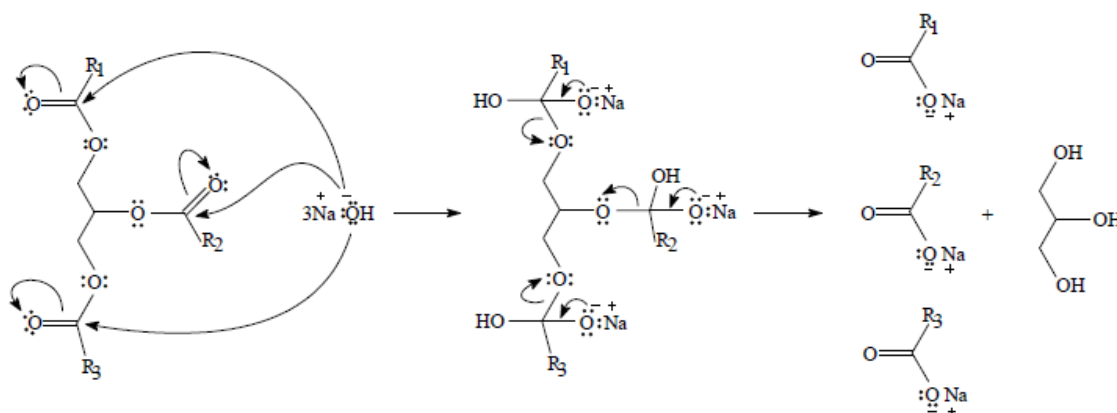


FIGURA 5 - MECANISMO DE SAPONIFICAÇÃO DOS TRIACILGLICERÍDEOS. Fonte: (VERGA REI, 2009)

Alguns autores já demonstraram a possibilidade de saponificação de biomassa de microalgas com o intuito de extrair ácidos graxos poliinsaturados de alto valor biotecnológico. Por exemplo, Gonzalez *et al.* (1998) otimizaram a extração de ácidos graxos de biomassa úmida da microalga *Phaeodactylum tricornutum* para obter o ácido eicosapentaenóico (EPA) altamente purificado, um importante ácido graxo da classe dos ômega-3. A metodologia consistiu em três etapas: a saponificação direta de biomassa úmida com KOH, a extração de insaponificáveis apolares com solvente orgânico, e posterior extração e purificação de ácidos graxos com solvente orgânico. O solvente utilizado para a extração era n-hexano, escolhido pela sua menor toxicidade, a facilidade de manuseio, segurança e baixo custo. O agente básico de hidrólise era de KOH (99%). O material saponificado foi tratado com HCl para formar ácidos graxos, e separados com n-hexano. Após a evaporação do solvente, todos os ácidos graxos tiveram a composição analisada por cromatografia em fase gasosa. Usando a biomassa úmida, a recuperação de ácidos graxos foi ligeiramente inferior do que a recuperação de ácidos graxos quando se utiliza a biomassa liofilizada, mas tal fato é compensado pela redução do custo de produção de ácidos graxos altamente purificados. No sentido de produção de ácidos graxos para biodiesel, não foram encontrados outros artigos que relatassem a metodologia de saponificação com esta finalidade.

2.3.2 Estimativa das propriedades do biodiesel de microalgas

A partir da extração do material graxo das microalgas por uma metodologia alternativa, faz-se necessário proceder à esterificação do mesmo a fim de se obter ésteres metílicos de ácidos graxos – EMAG's (ou biodiesel). As estruturas moleculares dos ésteres (EMAG'S) podem variar tanto no tamanho da cadeia carbônica, quanto na quantidade e posição de insaturações ou mesmo devido à presença de agrupamentos na cadeia. Óleos de microalgas diferem da maioria dos óleos vegetais sendo muito ricos em ácidos graxos poliinsaturados com quatro ou mais ligações duplas (BELARBI; MOLINA; CHISTI, 2000), como por exemplo, o ácido eicosapentaenóico (EPA, C20: 5n-3; cinco ligações duplas) e ácido docosahexaenóico (DHA, C22: 6n-3, seis duplas ligações) que ocorrem comumente

em óleos de microalgas, estes ácidos graxos, e que tem grande importância biotecnológica, devido ao seu uso farmacológico (CHISTI, 2007).

A distinção dos óleos com base no seu grau de insaturação, no tamanho das moléculas e pela presença ou não de grupos químicos reflete diretamente nas qualidades do biocombustível produzido. Dessa forma, os EMAG's obtidos a partir da esterificação dos ácidos graxos de microalgas terão características particulares a depender da característica da cadeia carbônica de cada ácido graxo presente na biomassa utilizada (CERIANI *et al.*, 2007).

Em linhas gerais, quanto maior a cadeia hidrocarbônica, maior o número de cetano, que é a escala que define a qualidade de combustível em relação ao seu poder de autoinflamação; a lubricidade, assim como os pontos de névoa e de entupimento (KNOTHE, 2008).

Quanto às insaturações, quanto menor o número de duplas ligações, maior a cetanagem do combustível, ocasionando uma melhor qualidade da combustão. Por outro lado, um aumento no número de cetano ocasiona também um aumento no ponto de névoa e de entupimento (maior sensibilidade aos climas frios). Entretanto a armazenagem ou transporte de combustível com maior número de insaturações (menos estáveis) provocam a oxidação, degradação e polimerização do mesmo, ocasionando um menor número de cetano ou formação de resíduos sólidos. Dessa forma, tanto os ésteres alquílicos de ácidos graxos saturados (láurico, palmítico, esteárico) como os de poli-insaturados (linoléico, linolênico) possuem alguns inconvenientes, uma vez que são pouco resistentes à oxidação e o número de cetano é geralmente baixo ((KNOTHE, 2005).

Os óleos saturados do tipo esteárico ou palmítico são pouco fluídos (grande viscosidade), mas são resistentes à oxidação. Encontram-se normalmente no estado sólido à temperatura ambiente, porém sua alta viscosidade, aliados à resistência à oxidação dificultam sua degradação, remoção e limpeza. De uma forma geral, um biodiesel com predominância de ácidos graxos combinados mono-insaturados (oléico) são os que apresentam os melhores resultados nas propriedades pertinentes (KNOTHE, 2009).

O controle de qualidade do biodiesel final é fundamental já que o não cumprimento dos parâmetros da norma pode trazer problemas não só ao motor, como também a qualquer outro componente do sistema do combustível. Por exemplo, poderá acarretar elevados índices de iodo, relacionado com a insaturação

do biodiesel, causa maior emissão de NOx nos gases de combustão; índices de cetano muito alto ou muito reduzido, leva à má qualidade na ignição do combustível e está relacionado com a quantidade de compostos voláteis; estabilidade oxidativa, que está relacionada à quantidade de duplas ligações nos EMAG's e se muito baixa acarreta rápida degradação no armazenamento do biocombustível (CARVALHO *et al.*, 2011).

2.4 DESAFIOS NA TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL DE MICROALGAS

As microalgas podem apresentar vantagens em relação às plantas cultivadas em solo como rápido crescimento, alto teor de óleos e possibilidade de utilização de água imprópria para a agricultura. Tendo em vista as atuais necessidades de desenvolvimento de tecnologia na área de biocombustíveis e recursos renováveis, em 2007, foi criado o Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS), localizado no Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná em Curitiba – Paraná. O objetivo inicial consiste em demonstrar o conceito de geração de potência distribuída autossustentável produzida a partir da obtenção e utilização de biodiesel de microalgas (MARIANO *et al.*, 2009). No entanto, inúmeros são os desafios deste projeto para que tal propósito seja alcançado, entre os quais se podem citar:

- Adaptação de uma espécie potencialmente acumuladora de óleo às condições ambientais externas em fotobiorreator tubular;
- Confecção de meio de cultivo alternativo para redução de custo de produção de biomassa (ANDRADE; COSTA, 2008);
- Processo eficiente de separação da biomassa de microalgas do meio de cultivo (SCHAFRANSKI, 2011);
- Desenvolvimento de método para extração de óleo da biomassa úmida, excluindo a necessidade de secagem objetivando redução do gasto energético;
- Realização de estimativas de gasto energético bem como ciclo de vida do biodiesel de microalgas.

Diante disso, até o momento não foram encontrados dados suficientes na literatura para se comparar os resultados obtidos por todos os estudos realizados pelo projeto do NPDEAS. Desta forma, faz-se necessária uma apreciação, como sendo um estudo de caso da melhor alternativa face ao cenário em que se vem trabalhando. Muitos trabalhos do grupo estão sendo realizados em escala piloto, a fim de que se possam ter resultados para avaliação da viabilidade de inserção do biodiesel de microalgas na matriz energética atual e assim sendo, este tipo de trabalho fornece respostas a respeito das dificuldades do processo de produção de biodiesel de microalgas que experimentos apenas em escala de laboratório podem eventualmente falhar em fornecer.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Dentre os desafios listados, selecionou-se desenvolver uma metodologia para extrair material graxo da biomassa úmida da microalga *Scenedesmus sp.* cultivada no NPDEAS, com o intuito de que este seja um método que não necessite secagem da biomassa e não contamine a biomassa após a extração do óleo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atingir o objetivo geral, o trabalho foi dividido em algumas metas ou objetivos específicos, a citar:

- Testar a metodologia de saponificação seguida de acidificação em biomassa úmida de *Scenedesmus sp.* e obter o material graxo a partir dos lotes de biomassa;
- Estudar o método de saponificação a partir de um planejamento fatorial;
- Comparar a extração de lipídeos totais pelas metodologias clássicas a frio, proposta por Bligh e Dyer (1959) e a quente, proposta por Soxhlet (1879) com o material graxo obtido por saponificação;
- Esterificar os maiores rendimentos em material lipídico das metodologias e avaliar a sua conversão em EMAG's;
- Identificar o perfil dos EMAG's obtidos por cromatografia em fase gasosa e estimar propriedades potenciais do biodiesel produzido a partir destes EMAG's;
- Propor um processo piloto de extração via saponificação para ser utilizado no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTIVO DA MICROALGA *Scenedesmus* sp.

A microalga do gênero *Scenedesmus* (FIGURA 6) foi escolhida por ser mesma com a qual o grupo do NPDEAS possui outros trabalhos relacionados. Trata-se também de uma microalga predominante no fitoplâncton dos lagos, reservatórios e rios da região de Curitiba e adapta-se bem às condições climáticas da cidade e às impostas por um sistema de cultivo. Faz parte do grupo das clorófitas ou clorófitas, mais conhecidas como algas verdes, por sua coloração verde intensa característica da clorofila.

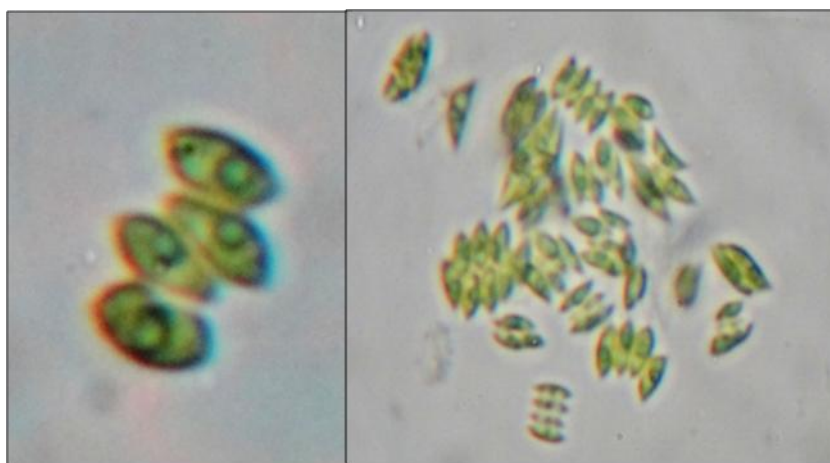


FIGURA 6 - FOTOMICROGRAFIA DA MICROALGA *Scenedesmus* sp.. (AUMENTO DE ATÉ 400 X).
FONTE: A AUTORA (2012).

A fim de padronizar as condições para os experimentos de extração de ácidos graxos, foram confeccionados lotes de biomassa em duas escalas, a escala laboratorial, a partir de 2 cultivos em sala de cultivo, e escala piloto, a partir de 2 cultivos realizados em fotobiorreator (FBR), de acordo com a TABELA 4. O meio de cultivo utilizado pelo grupo é o Meio CHU (1942), rico nos seguintes sais nutrientes e microelementos (g.L^{-1}): NaNO_3 (0,25), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,025), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,075), K_2HPO_4 (0,075), KH_2PO_4 (0,175), NaCl (0,025), EDTA (0,05), KOH (0,031), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($4,98 \cdot 10^{-3}$), H_3BO_3 ($11,42 \cdot 10^{-3}$), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($8,82 \cdot 10^{-6}$), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($1,44 \cdot 10^{-6}$), $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($1,19 \cdot 10^{-6}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($1,57 \cdot 10^{-6}$), $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($0,49 \cdot 10^{-6}$), portanto neste trabalho ao ser citado meio de cultivo, subentende-se que o meio de cultivo é o CHU.

TABELA 4 - CONDIÇÕES DE CULTIVO DOS LOTES DE BIOMASSA DE *Scenedesmus* sp..

Biomassa de <i>Scenedesmus</i> sp.	Sistema de Cultivo	Condições de Cultivo
Lote 1	Erlenmeyers de 2 L / Galões de 20 L	Meio de cultivo CHU
Lote 2		Iluminação 2500 lx – 24 horas
Lote 3	Tanque de 2 m ³ / FBR 12 m ³	Temperatura 20 a 25 °C
Lote 4		Fonte de CO ₂ : ar comprimido
		Meio de cultivo CHU
		Iluminação durante o dia
		Temperatura variável (ambiente): 15 a 25 °C
		Fonte de CO ₂ : ar comprimido

4.1.1 Sala de cultivo

A sala de cultivo do NPDEAS (FIGURA 7) é o local onde são preparados os inóculos para o fotobiorreator. Inóculo pode ser definido como a porção de uma amostra ou de uma cultura, contendo uma quantidade de microorganismos, suficiente para iniciar um crescimento quando transferida para um meio adequado (KNIE, 2004).

As condições de temperatura, vazão de ar nos cultivos e iluminação são padronizados e fixos. Para obter o lote 1 e 2 de biomassa foram utilizados 3 erlenmeyers de 2 L para cada lote. Em cada erlenmeyer foi utilizado um volume de inóculo com $1,7 \times 10^6$ cel.mL⁻¹, que consiste em uma suspensão algácea em maior concentração em células.mL⁻¹, referente a 20% do volume de cultivo no erlenmeyer.

Os erlenmeyers foram mantidos a temperatura entre 20 °C e 25 °C e aeração por compressor de ar de 5 L.min⁻¹, A iluminação foi contínua de 2500 lx, ou seja, sem fotoperíodo, com lâmpadas fluorescentes. Os cultivos foram monitorados pela relação da absorbância a 670 nm com a biomassa seca em uma curva padrão. A partir da observação de um pico de crescimento, aproximadamente 1,5 g.L⁻¹, nos erlenmeyers, os mesmos foram utilizados como inóculos para cultivo em galões de 20 L. Nos galões (FIGURA 7) os dados de absorbância e biomassa também foram monitorados. Quando observado um crescimento estacionário nos mesmos (caracterizado pela ausência de crescimento nas medições de biomassa), metade

do seu volume foi retirado para obtenção da biomassa úmida, e o volume foi repostado com Meio CHU somente.



FIGURA 7 - SISTEMA DE CULTIVO DE *Scenedesmus* sp. EM SALA DE CULTIVO. FONTE: A AUTORA (2012)

Para obtenção dos lotes de biomassa úmida, o volume retirado do galão foi floculado. De acordo com trabalho de Schafranski *et al.* (2010), assumiu-se como volume ideal de adição do agente floculante 50 mL de NaOH (99% P.A. Vetec®) $3,0 \text{ mol.L}^{-1}$ por litro de suspensão, ou seja, em uma concentração de 5% (v/v). Seguiu-se à agitação da solução com agitador mecânico de bancada Fisaton® modelo 713, com velocidade de rotação no início – 1000 rpm durante 3 minutos – para garantir a homogeneidade da solução, seguida de velocidade mais branda – 500 rpm por 10 minutos – para garantir o choque entre as partículas e consequente aglomeração e sedimentação (FIGURA 8). O líquido clarificado foi retirado da parte mais alta dos recipientes com o auxílio de uma mangueira, e o espessado ao fundo, que posteriormente foi enviado para a filtração a vácuo, sendo assim obtida uma biomassa úmida consistente. Vale ressaltar que os lotes 1 e 2 foram obtidos em datas distintas pela limitação do volume de trabalho na sala de cultivo, porém, mantendo-se as mesmas condições no cultivo.



FIGURA 8 - ASPECTO VISUAL DAS MICROALGAS FLOCULADAS NO AGITADOR MECÂNICO. FONTE: O AUTOR (2011).

4.1.2 Fotobiorreator

O fotobiorreator está situado na área externa ao laboratório (FIGURA 9) e exposto às condições climáticas externas bem como intempéries. Sua configuração é tubular compacta, pois utiliza em área apenas 10 m^2 (8 m de altura, 5 m de comprimento e 2 m de largura) e seu volume de trabalho é de 12 m^3 . É composto de tubos de PVC transparente para permitir a passagem de luz. O inóculo para o FBR é produzido a partir de um tanque retangular de 2 m^3 utilizando o meio CHU. As condições de temperatura não são padronizadas, devido ao mesmo estar exposto ao tempo, a iluminação é unicamente durante o dia, e a aeração que promove a fonte de carbono para a fotossíntese das microalgas é fornecida a partir de um compressor de ar.

O monitoramento do crescimento no FBR é realizado pelos técnicos do NPDEAS, os quais realizam a contagem diárias de células. mL^{-1} , medição de pH e densidade óptica.

Para obter a biomassa úmida dos lotes 3 e 4, determinado volume do FBR foi floculado com $\text{NaOH } 3 \text{ mol.L}^{-1}$ e $\text{FeSO}_4 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ em um floculador situado na parte externa do NPDEAS. A biomassa sedimentada foi filtrada em um filtro de pano para retirada do excesso de umidade.

Os Lotes 3 e 4 foram obtidos em cultivos independentes e datas distintas, os parâmetros de cultivo foram mantidos para os dois lotes, desse modo, houve somente variação da temperatura ambiente e iluminação externa.



FIGURA 9 - SISTEMA DE CULTIVO DE *Scenedesmus* sp. EM FBR DO NPDEAS. FONTE: NPDEAS (2012).

4.2 SECAGEM DA BIOMASSA

Em escala laboratorial, utilizar a biomassa úmida fresca para pesagem e extração em tubo de ensaios tornou-se impraticável, pois a mesma é pastosa (FIGURA 10) e impregna nas paredes superiores do tubo de ensaio. Desse modo, um lote de cada sistema de cultivo foi submetido à secagem para execução dos experimentos de extração por saponificação, de acordo com a TABELA 5. A biomassa foi seca em estufa a 50 °C por 24 h, a matriz seca obtida foi ressuspensa nos experimentos de saponificação para obter a umidade desejada. Tanto os lotes que foram utilizados frescos e úmidos quanto os que estavam previamente secos passaram por um mixer tipo liquidificador por 5 minutos a fim de romper as membranas celulares e facilitar as reações para retirada do material lipídico da microalga. Os lotes que foram utilizados úmidos e frescos, a umidade foi calculada em um medidor de umidade por infravermelho Gehaka® modelo IV2000 e seca parcialmente para obtenção de umidade diferenciada ou adicionada a um volume determinado de água para obtenção de umidade desejada. Ressalta-se que

para todas as outras metodologias de extração de lipídeos ou materiais graxos, foi utilizada biomassa seca.

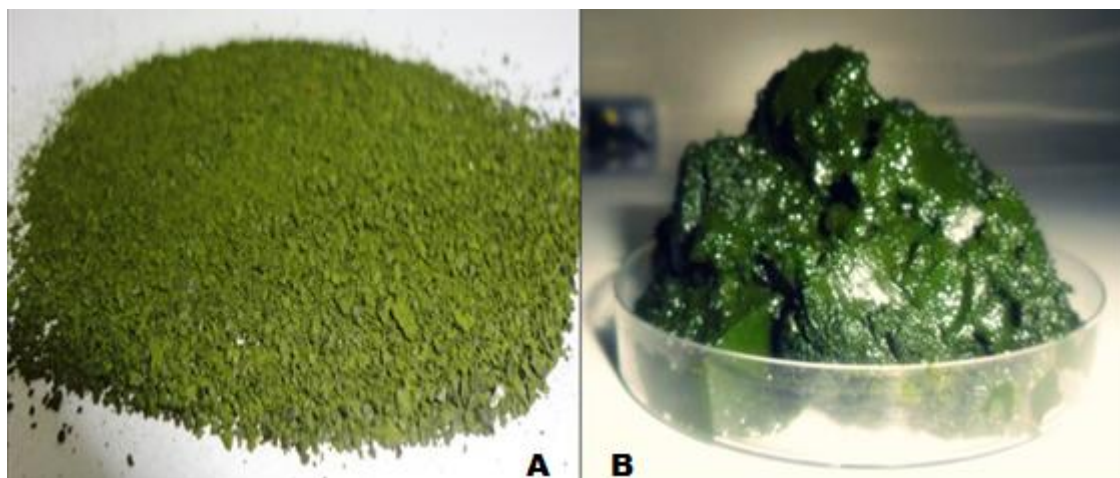


FIGURA 10 - ASPECTO VISUAL DA BIOMASSA SECA (A) E ÚMIDA (B). FONTE: A AUTORA (2011)

TABELA 5 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DOS LOTES DE BIOMASSA DE *Scenedesmus* sp..

Biomassa de <i>Scenedesmus</i> sp.	Execução do ensaio de Saponificação
Lote 1	Úmida e fresca
Lote 2	Seca e ressuspendida
Lote 3	Seca e ressuspendida
Lote 4	Úmida e fresca

4.3 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POR SAPONIFICAÇÃO

As reações de saponificação foram realizadas com aproximadamente 1 g de base seca de biomassa de *Scenedesmus* sp., ou seja, nos experimentos que utilizaram a biomassa úmida fresca foi calculada a quantidade de água presente na amostra para evitar erros na pesagem. No procedimento adotado, de acordo com o fluxograma mostrado na FIGURA 11 11 uma solução alcoólica (álcool etílico P.A. 99,5% Biotec®) de KOH Vetec® (99% m/m) foi adicionada à biomassa dos lotes contida em um tubo de ensaio de 30 mL de vidro com tampa rosqueável. Para ocorrência da reação de saponificação dos ácidos graxos da amostra, utilizou-se um banho termostatizado a 60 °C por 60 minutos, como mostrado na FIGURA 11. Após o término da reação o material foi transferido para um banho de gelo e após o resfriamento foi adicionado HCl Microquímica® 36,5% (v/v) até pH 1,0 para completa liberação dos ácidos graxos dos seus respectivos sais (sabões). Os ácidos graxos foram extraídos utilizando Hexano p.a. Biotec® e vortex agitador de tubos Phoenix®

AP56 em velocidade moderada, sendo executadas 3 extrações consecutivas intercaladas com 3 lavagens com água até separação de fases.

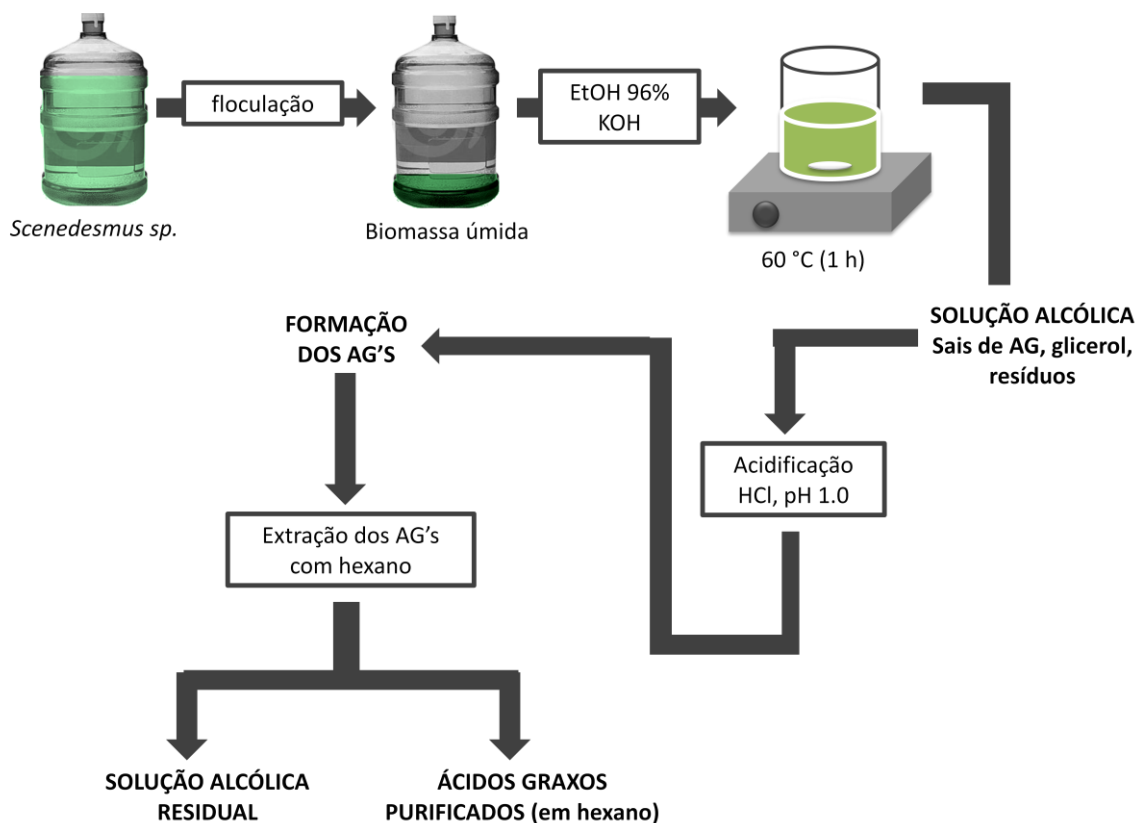


FIGURA 11 - FLUXOGRAMA DA REAÇÃO DE SAPONIFICAÇÃO. ADAPTADO DE NPDEAS (2011).

A fase apolar (hexano) foi rota-evaporada, e o material disposto em um vial, espécie de ampola utilizada para armazenar amostras para cromatografia, com massa pré-determinada. Depois de secos em estufa e aspensão de nitrogênio gasoso, os vials foram pesados em balança analítica AG 200 Gehaka® e a massa de ácidos graxos (AG) determinada em termos de porcentagem sobre a biomassa seca utilizada para o experimento.

4.3.1 Planejamento experimental

Para avaliar a melhor condição de extração de ácidos graxos pela metodologia proposta, faz-se necessário estudar a interação das variáveis que mais influenciam no processo de saponificação. Os reagentes utilizados, como o etanol e os álcalis e também a umidade da amostra podem influenciar na eficiência do método. Sendo assim, um estudo dessas variáveis foi feito para cada lote trabalhado. O objetivo foi saber a melhor quantidade dos dois reagentes principais, o etanol e o álcali (KOH) e a umidade limitante do processo (em termos de volume de água), já que se propõe trabalhar com a biomassa com elevada umidade.

Para um melhor conhecimento desse processo, o nível assumido pelo ponto central do planejamento experimental foi fundamentado no procedimento experimental descrito por González *et al.* (1998), que utilizou biomassa em determinada condição de umidade, concentração de KOH e etanol para saponificação; a partir daí, pequenas variações para mais e para menos compuseram a faixa de valores assumidos pelas variáveis. Para esse planejamento, o tipo escolhido foi o de compósito central rotacionais, que inclui uma faixa maior de valores no processo. Nos experimentos do tipo 2^k , os níveis dos fatores são codificados em -1 (valor mais baixo da variável), 0 (valor central) e +1 (valor mais alto da variável). Todos os experimentos foram realizados de maneira inteiramente aleatória com quadruplicata no ponto central. A utilização de repetições no ponto central teve como objetivo viabilizar o cálculo do erro experimental e consequentemente a verificação do ajuste do modelo.

Foi realizado planejamento fatorial completo 2^3 com auxílio do software STATISTICA 7.0, incluindo 6 pontos axiais e 4 repetições no ponto central, totalizando 18 ensaios. A TABELA 6 apresenta os valores codificados das variáveis para as reações de saponificação utilizando KOH. O tempo e a temperatura foram fixados para os experimentos, a decisão de não trabalhar com estas variáveis deve-se ao fato de que a temperatura empregada é próxima à ebulição do solvente (etanol), uma temperatura acima disso provocaria grande evaporação, e uma temperatura inferior implicaria rendimento inferior também; o tempo foi fixado em 60 minutos devido aos trabalhos de saponificação encontrados na literatura

demonstrarem eficiência neste tempo (GONZÁLES *et al.*, 1998). Os valores dos níveis das variáveis podem ser visto na TABELA 6.

TABELA 6 - NÍVEIS PARA A DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DA REAÇÃO DE SAPONIFICAÇÃO COM KOH PARA 1 g DE AMOSTRA SECA.

Variáveis	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Etanol (mL)	1.6	5	10	15	25
Álcali KOH (g)	0.064	0.2	0.4	0.6	1
Água (mL)	0.7	1	4	7	12
Umidade Resultante (%)	40	50	80	87,5	92

A TABELA 7 apresenta o planejamento de composto central rotacionado obtido no software STATISTICA 7.0, o ponto central são representados pelos últimos experimentos (representado pela letra C na tabela), realizado em quadruplicata.

TABELA 7 - PLANEJAMENTO FATORIAL ESTATÍSTICO PARA A REAÇÃO DE SAPONIFICAÇÃO.

Experimental	Etanol	KOH	Água Destilada
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15 (C)	0	0	0
16 (C)	0	0	0
17 (C)	0	0	0
18 (C)	0	0	0

A TABELA 8 apresenta os valores numéricos das variáveis para cada ensaio do planejamento fatorial.

TABELA 8 - CONDIÇÕES REACIONAIS DETERMINADAS PELO PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO PARA A REAÇÃO DE SAPONIFICAÇÃO.

Experimental	Etanol	KOH	Água Destilada
Ensaio	(mL)	(g)	(mL)
1	5	0,2	1
2	15	0,2	1
3	5	0,6	1
4	15	0,6	1
5	5	0,2	7
6	15	0,2	7
7	5	0,6	7
8	15	0,6	7
9	1,6	0,4	4
10	25	0,4	4
11	10	0,064	4
12	10	1	4
13	10	0,4	0,7
14	10	0,4	12
15	10	0,4	4
16	10	0,4	4
17	10	0,4	4
18	10	0,4	4

4.4 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS (LT) PELO MÉTODO A FRIO

Para determinação de LT pelo método a frio, segundo Bligh e Dyer (1959), foram pesados aproximadamente 50 mg de biomassa seca em tubos de ensaio de polipropileno de 12 mL. Este procedimento foi realizado em triplicata para cada lote. Em seguida, adicionou-se 3 mL da mistura de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1 v/v) e 10 μL de uma solução de butil hidróxi tolueno (BHT) (1% em metanol). A seguir, as amostras foram submetidas à ultrassom em um sonicador UltraCleaner 1400 Unique® por 3 ciclos de 15 minutos e incubadas por 24 h a 4 °C protegidas da luz. Após esse período, as amostras foram submetidas novamente à sonicação por 3 ciclos de 15 minutos cada e centrifugadas em centrífuga Jouan BR4® a 4000 rpm por

10 minutos a 4 °C; o sobrenadante com a fase lipídica foi recuperado com uma pipeta Pasteur e reservado em outro tubo. Adicionou-se 1,5 mL da mistura de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ ao tubo com a biomassa residual e centrifugou-se novamente a 4000 rpm 10 minutos a 4 °C, sendo que o sobrenadante foi recuperado e transferido ao tubo reservado com a fase lipídica. Foram adicionados 2 mL de água destilada e 1 mL de clorofórmio ao tubo reservado, as amostras foram então centrifugadas a 4000 rpm por 10 min a 4 °C. Em seguida, a fase inferior (clorofórmio:lipídeo) foi recuperada e transferida para um vial com massa pré-determinada. A fase aquosa foi lavada com 1 mL de clorofórmio e centrifugada novamente a 4000 rpm, por 10 minutos a 4 °C. Então, a fase inferior foi recuperada e transferida para o vial. O vial contendo a fase lipídica foi seco em estufa a 50 °C e nitrogênio gasoso, e sua massa foi novamente determinada para cálculo dos lipídeos totais.

4.5 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS PELO MÉTODO A QUENTE

Para determinação de lipídeos totais pelo método a quente, segundo a metodologia proposta por Soxhlet (1879), o método padrão foi modificado para extração de lipídeos de microalgas (LOURENÇO, 2006), três amostras de aproximadamente 10 g da biomassa seca do lote 4 foram dspostas em um filtro faixa branca e o mesmo adaptado para ser colocado no extrator Soxhlet, indicado na FIGURA 12.

O balão de fundo chato de 250 mL foi previamente pesado e sua massa anotada. Ao extrator foram adicionados 100 mL de hexano P.A Biotec®. para extração e o conjunto extrator e balão foi acoplado a um condensador e aquecido a 60 °C para ebulição do solvente de acordo com a (FIGURA 12). O tempo de extração foi de 8 h de refluxo. Após esse tempo, o balão é retirado do extrator e o hexano evaporado. A massa contida no balão representa os lipídeos totais.



FIGURA 12 - APARATO EXPERIMENTAL PARA EXTRAÇÃO SOXHLET. FONTE: CEPPA (2012).

4.6 ESTERIFICAÇÃO *IN SITU* PELA METODOLOGIA DE HARTMAN E LAGO (1973) MODIFICADA

Em paralelo às extrações do material graxo pelas metodologias apresentadas, os lotes de biomassa foram submetidos à esterificação *in situ* para quantificação do teor de ésteres na biomassa de microalgas e posterior comparação com os métodos que utilizam previamente a extração seguida da esterificação.

O processo de preparação dos EMAG's segundo descrito por Hartman e Lago (1973), foi realizado com modificações propostas por MENEZES *et al.* (2012), conforme FIGURA 13. Para cada 200 mg de amostra em cada tubo, foram utilizados 3 mL de uma solução de Metóxido (NaOH – 99% m/m Vetec®/ MeOH P.A. Biotec® 0,5 mol.L⁻¹). Em seguida, os tubos foram imersos em um banho a 90 °C por 10 minutos. Ao término, foram colocados em um banho de gelo. Após resfriamento, foram adicionados 9 mL de uma solução Esterificante - preparada a partir de 2 g de cloreto de amônio (NH₄Cl P.A. Vetec®), 60 mL de metanol e 3 mL de ácido sulfúrico concentrado e imersos no mesmo banho a 90 °C por 10 minutos. Ao término do tempo, novamente foram resfriados e procedeu-se a extração dos monoésteres com n-heptano p.a Vetec®, sendo realizadas 3 extrações consecutivas, intercaladas com

3 lavagens com água destilada. A fase solvente contendo os monoésteres foi coletada com pipeta Pasteur e armazenada em um vial com massa pré-determinada. O mesmo foi submetido à secagem para determinação da massa de monoéster e cálculos de conversão. Após esse procedimento, o mesmo vial foi ressolubilizado com n-heptano p.a. 99% v/v Biotec® para conservação dos EMAG's e posterior análise cromatográfica para análise qualitativa.

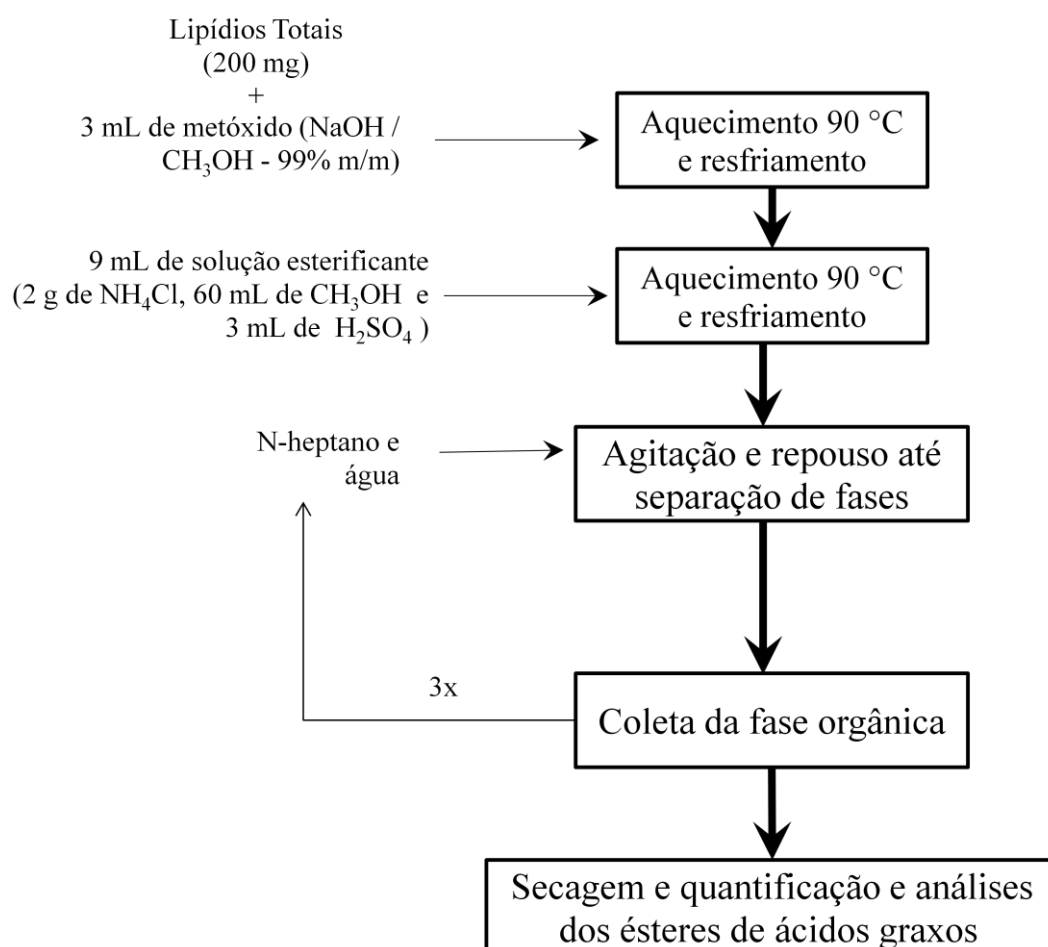


FIGURA 13 – FLUXOGRAMA DO MÉTODO DE ESTERIFICAÇÃO.

4.6.1 Esterificação dos extratos de material graxo obtidos por saponificação e extração a frio

Para saber se a metodologia de saponificação pode ser validada como alternativa para extração de ácidos graxos para produção de biodiesel, fez-se necessário proceder à esterificação dos extratos de ácidos graxos ou lipídeos totais

recuperados para obter os ésteres metílicos dos ácidos graxos (EMAG) correspondentes, como forma de avaliar a taxa de conversão do material extraído em metil ésteres. Assim sendo, para comparar as metodologias, procedeu-se a esterificação dos extratos graxos obtidos por saponificação e por extração a frio.

Para execução do ensaio, os vials contendo os extratos obtidos pelo melhor ensaio de saponificação de cada lote e dos ensaios de extração a frio foram ressolubilizados em hexano e transferidos para tubos de ensaio de tampa rosqueável. Após a secagem, as massas de amostra foram determinadas e procedeu-se à metodologia de Hartman e Lago (1973) modificada da mesma forma como descrita para esterificação *in situ*. Este ensaio permitiu a posterior verificação da conversão em EMAG's, ou seja, biodiesel.

4.7 ANÁLISES DOS PRODUTOS

4.7.1 Ácidos graxos obtidos por saponificação

A percentagem mássica de ácidos graxos nos lotes de biomassa ao final de cada ensaio do processo de extração por de saponificação, foi calculada gravimetricamente de acordo com a equação (1):

$$AG = (mf - m_0) * \frac{100}{m_B} \quad (1)$$

Em que:

AG = % de ácidos graxos na biomassa equivalente seca utilizada;

mf = massa do vial seco com os ácidos graxos (g);

m_0 = massa do vial vazio (g);

m_B = biomassa equivalente seca utilizada para o experimento (g).

4.7.2 Lipídeos totais obtidos pelo método de extração a frio

A percentagem mássica dos lipídeos totais presentes nos lotes de biomassa foi calculada de acordo com a equação:

$$LT = (mf - m_0) * \frac{100}{m_B} \quad (2)$$

Em que:

LT = % de lipídeos totais na biomassa seca utilizada;

mf = massa do vial seco com os lipídeos totais (g);

m_0 = massa do vial vazio (g);

m_B = biomassa seca utilizada para o experimento (g);

4.7.3 Lipídeos totais obtidos pelo método de extração a quente

A percentagem mássica dos lipídeos totais presentes no lote 4 de biomassa foi calculada de acordo com a equação 2, em que as massas do vial foram substituída pelas massas do balão de fundo chato.

4.7.4 Teor de ésteres na biomassa *in natura*

Os ensaios de esterificação *in situ* com a biomassa *in natura* permitiram calcular a percentagem de ésteres na biomassa de acordo com a equação 2, em que mf representa a massa do vial com os EMAG's e m_B a biomassa seca utilizada para esterificação.

4.7.5 Conversão mássica em ésteres metílicos de ácidos graxos – EMAG's

O cálculo de conversão mássica ensaios de esterificação dos extratos graxos em ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizado de acordo com a seguinte equação:

$$X = (mf - m_0) * \frac{100}{m_A} \quad (3)$$

Em que:

X = conversão mássica da amostra em EMAG's (%);

mf = massa do vial seco com os EMAG's obtidos (g);

m_0 = massa do vial vazio (g);

m_A = massa dos AG ou LT utilizada para o experimento (g).

4.7.6 Teor de ésteres a partir da conversão dos extratos de LT e AG em EMAG's

Para que se possa comparar a produtividade em EMAG das metodologias utilizadas para extração de material graxo, foi necessário calcular o teor de ésteres na biomassa, resultante após a conversão em EMAG, de acordo com a equação:

$$\% \text{ésteres} = (OL) * \frac{X}{100} \quad (4)$$

Em que:

% ésteres = teor de ésteres resultante após a esterificação (%);

OL = teor de LT ou AG obtidos nas extrações pelo método a frio e saponificação (%);

X = conversão dos LT ou AG em EMAG's (%).

4.7.7 Análises dos resultados do planejamento fatorial para saponificação

A influência das variáveis na extração por saponificação foi estudada pela confecção de gráficos de superfície de resposta no software STATISTICA 7.0.

Gráficos relacionando a influência da umidade, volume de etanol e massa de álcali foram produzidos. Como na modelagem do planejamento experimental a variável de resposta de interesse é influenciada por diversas variáveis independentes, e o objetivo é aperfeiçoar a variável resposta, faz-se necessária a confecção destes gráficos a fim de que se possa avaliar a eficiência do processo de saponificação dentro da faixa de valores de cada variável, em que foram obtidas as melhores respostas, ou seja, a maior porcentagem de extração de ácidos graxos. Essa análise também é de suma importância para o futuro escalonamento do projeto de extração no NPDEAS, como os volumes de reatores necessários e taxa de produção.

4.8 ANÁLISE QUALITATIVA DOS PRODUTOS

4.8.1 Cromatografia de fase gasosa

Para identificação e quantificação dos ácidos graxos presentes nos materiais graxos obtidos pelos diferentes métodos de extração, as amostras de ésteres metílicos de ácidos graxos - EMAG foram analisadas por cromatografia em fase gasosa no Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos – CEPPA dentro da Universidade Federal do Paraná.

A técnica foi escolhida por ser um método analítico capaz de identificar e quantificar os ésteres metílicos produzidos no processo de esterificação ou transesterificação. A cromatografia é um método físico-químico que tem a capacidade de separar componentes de uma amostra, realizada pela distribuição destes componentes entre duas fases. Uma das fases está fixa, enquanto a outra passa através dela. A amostra é introduzida no equipamento e conduzida pela fase móvel (líquida ou gasosa). Durante a passagem da fase móvel através da fase estacionária (líquida ou sólida), os componentes da amostra são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que, cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária por ter mais afinidade com esta, resultando em uma migração diferencial que promove a separação (METCALFE; SCHMITZ ; PELKA, 1966; SKOOG; HOLLER; NUMAN, 2002; COLLINS;BRAGA;BONATO, 2006).

As análises por cromatografia gasosa foram realizadas em um cromatógrafo gasoso marca Varian® modelo CP3900 com injetor split/splitless com detector de ionização de chama (FID). A coluna capilar utilizada foi a CpSil para FAME's com recheio de Polietileno Glicol – 100 m (comprimento) x 0,25 mm (diâmetro interno) x 0,39 µm (espessura do filme). O gás de arraste utilizado foi N₂ mantido a um fluxo de 40 psi. O volume de injeção foi 1,0 µL. O forno foi programado para trabalhar no modo isotérmico a 210 °C e a temperatura do detector foi de 260 °C, sendo o tempo total da corrida de 70 min. Para detecção dos perfis de ácidos graxos nas amostras foi utilizado o Padrão de FAME's da Sigma Supelco® com 37 componentes. O software para aquisição de dados foi o Starwork Station 5.0. Os tempos de retenção dos ácidos graxos da amostra foram comparados com os tempos de retenção dos padrões, normatizados e os resultados expressos em g.100g⁻¹.

4.8.2 Estimação das propriedades dos EMAG's obtidos

Com base na composição química dos EMAG's obtidos a partir das transesterificações dos extratos graxos, pode-se estimar algumas propriedades relevantes do biodiesel produzido que podem ser inferidas com o auxílio da composição obtida por cromatografia. Neste trabalho algumas propriedades foram estimadas de acordo com fórmulas que consideram o perfil dos ácidos graxos do biodiesel, posteriormente comparadas às obtidas por Carvalho *et al.* (2011). Medidas experimentais dessas propriedades não foram possíveis devido à limitação de amostras em termos mássicos.

- Poder calorífico: indica a quantidade de energia desenvolvida pelo combustível por unidade de massa. Para determiná-lo foi necessário calcular a massa molar média dos EMAG's obtidos, o que foi possível a partir das porcentagens de cada ácido graxo presente no perfil cromatográfico e com o auxílio da equação (5):

$$PCS = \left(\frac{61800}{IS} \right) - (0,08 * II) - 430 \quad (5)$$

- Índice de Iodo (*II*): segundo o método da AOCS Cd 1c-85 (AOCS, 1997) pode-se estimar o *II* com o auxílio do perfil cromatográfico de ácidos graxos de acordo com a equação (6):

$$II = (C16:1 * 0,9976) + (C18:1 * 0,8986) + (C18:2 * 1,810) + (C22:1 * 0,7497) \quad (6)$$

4.9 SAPONIFICAÇÃO EM ESCALA PILOTO NO NPDEAS

Antes da otimização do processo de extração de ácidos graxos por saponificação, a metodologia experimental considerando somente o ponto central foi realizada em escala piloto no Laboratório de Engenharia Química da Universidade Federal do Paraná – LABENGE. O processo está ilustrado na FIGURA 14. A microalga *Scenedesmus* sp. foi cultivada em meio CHU no fotobiorreator do NPDEAS, inoculado com 1000 L de volume concentrado. A biomassa foi obtida por floculação, usando NaOH 0,5 g.L⁻¹ e Fe₂SO₄ 0,1 mol.L⁻¹ como agentes coagulante e floculante, respectivamente. Após a decantação, o espessado passou por um filtro prensa localizado no Laboratório de Análises de Combustíveis Automotivos - LACAUT, obtendo-se aproximadamente 10 kg de biomassa com 80% de umidade. A hidrólise alcalina dos triacilglicerídeos e ácidos graxos livres ocorreu na presença de NaOH comercial Sodabel® (99% m/m – 0,05 g.g biomassa úmida⁻¹) e álcool etílico (99,5% v/v - 2 mL.g biomassa úmida⁻¹) em um reator de mistura encamisado, na temperatura de 60 °C, durante 1 hora. Em seguida o material foi encaminhado a um tanque de acidificação, onde se adicionou HCl Microquímica® (36,5% v/v) até atingir pH igual a 1,0 e degenerar o sal formado para liberação dos ácidos graxos. A etapa seguinte foi a extração líquido-líquido com benzina comercial, solvente apolar à base de hidrocarbonetos similar ao hexano, indisponível quando da execução da extração piloto. A fase solvente, contendo os ácidos graxos e frações apolares, foi separada em uma coluna de destilação até a sua completa purificação. Os ácidos graxos presentes na amostra foram analisados, quanto à sua composição, por cromatografia em fase gasosa.

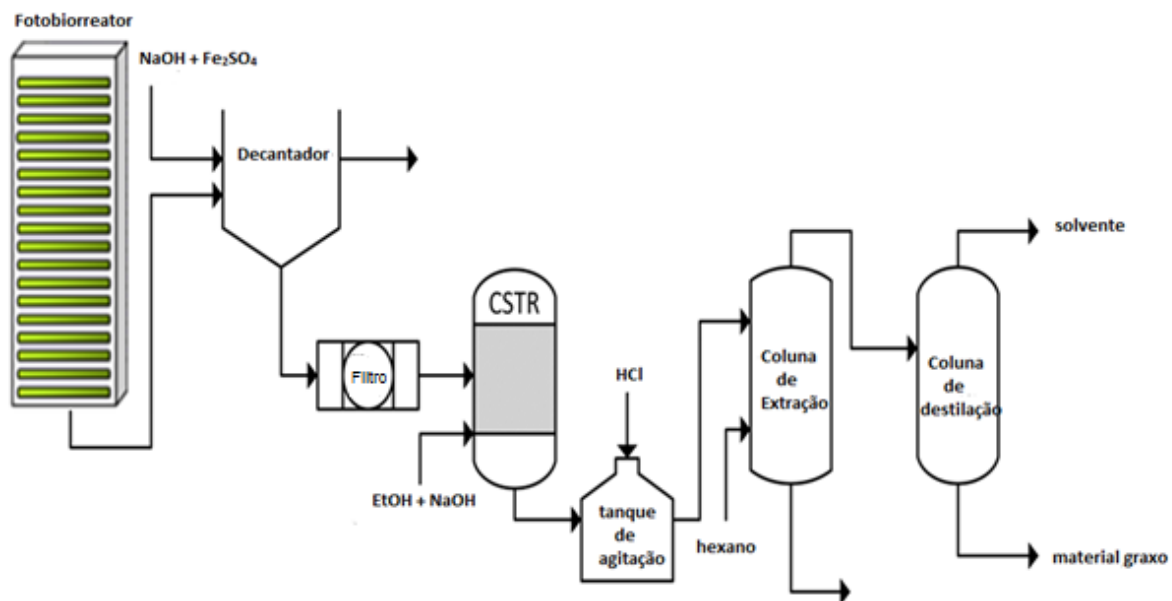


FIGURA 14 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO PILOTO DE SAPONIFICAÇÃO NO NPDEAS. FONTE: NPDEAS (2012).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS POR SAPONIFICAÇÃO

A partir do planejamento experimental gerado pelo software STATISTICA 7.0 de forma randomizada, os experimentos foram executados aleatoriamente e os resultados para os lotes 1 e 2, obtidos a partir da biomassa cultivada em sala de cultivo, encontram-se na TABELA 9.

O melhor resultado para o Lote 1, resultou em $11,92 \pm 0,96\%$ (m/m) para a condição reacional 11, de biomassa a 80% de umidade, e solução alcoólica 0,8% de KOH (0,064 g de KOH para 10 mL de etanol). Já para o lote 2, a melhor conversão foi de $12,17 \pm 0,39\%$ (m/m), para a condição reacional 10, de biomassa a 80% de umidade, e uma solução alcoólica de aproximadamente 2% de KOH (0,4 g de KOH para 25 mL de etanol). Essa diferença pode ser devido à utilização da biomassa seca e ressuspendida nos experimentos com o Lote 2, o que parece dificultar a reação de saponificação dos triacilglicerídeos, necessitando uma maior concentração de álcali para uma formação dos sabões.

Todavia, os resultados da recuperação de ácidos graxos nos experimentos do ponto central para os lotes 1 e 2, $9,48 \pm 0,96\%$ e $9,14 \pm 0,39\%$, respectivamente, não apresentou diferença significativa. Nessa condição reacional, a biomassa possuía 80% de umidade, e a solução alcoólica a aproximadamente 5% de KOH.

Na FIGURA 15, pode-se comparar os valores de recuperação de AG nos experimentos para todos os lotes. Como já explicitado, as melhores conversões para os lotes 1 e 2 foram acima de 10% de AG. No entanto os melhores rendimentos dos lotes 3 e 4, foram menores, $5,28 \pm 0,34\%$ e $6,08 \pm 0,32\%$. Tal fato indica a menor quantidade de ácidos graxos livres e lipídeos neutros (trialcilglicerídeos) nos lotes cultivados em fotobiorreator. Os resultados da recuperação podem ser comparados com a porcentagem de LT obtidos na extração pelo método a frio, mais adiante nesse trabalho.

TABELA 9 - RESULTADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2³ PARA EXTRAÇÃO DE AG DA BIOMASSA SAPONIFICAÇÃO.

Ensaio	Etanol (mL)	KOH (g)	Água (mL)	Lote 1 AG (%)	Lote 2 AG (%)
1	5	0,2	1	2,99	5,27
2	15	0,2	1	5,23	9,18
3	5	0,6	1	3,16	2,74
4	15	0,6	1	6,60	7,84
5	5	0,2	7	3,87	0,93
6	15	0,2	7	9,64	2,55
7	5	0,6	7	7,02	2,66
8	15	0,6	7	9,00	3,71
9	1,6	0,4	4	1,01	0,92
10	25	0,4	4	10,81	12,17
11	10	0,064	4	11,92	5,46
12	10	1	4	6,85	3,39
13	10	0,4	0,7	7,74	10,86
14	10	0,4	12	7,38	3,99
15 (C)	10	0,4	4	11,10	8,75
16 (C)	10	0,4	4	9,43	9,14
17 (C)	10	0,4	4	10,47	9,14
18 (C)	10	0,4	4	8,54	9,53
M(C)				9,48	9,14
σ (C)				0,96	0,39

M (C): média obtida no ponto central

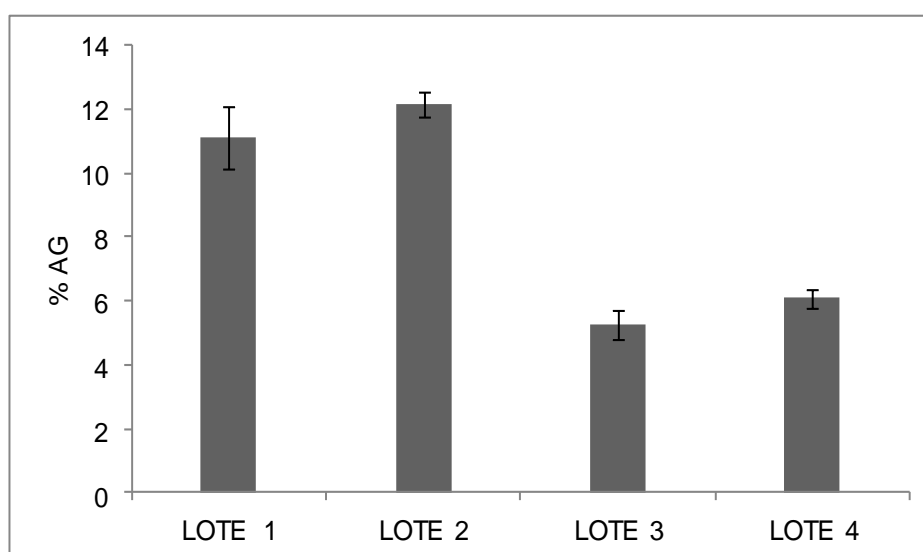
 σ (C): desvio padrão da média

FIGURA 15 - ÁCIDOS GRAXOS OBTIDOS A PARTIR DOS MAIORES RENDIMENTOS DA EXTRAÇÃO POR SAPONIFICAÇÃO.

As barras verticais representam o erro padrão σ .

5.2 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Na FIGURA 16, que representa a superfície de resposta para as variáveis estudadas, pode-se avaliar a interação da umidade da amostra com o volume de etanol utilizado. A área em vermelho intenso indica a maior recuperação em porcentagem AG sobre a biomassa seca equivalente. Numa avaliação preliminar, umidades entre 50 e 80% juntamente com volumes acima de 15 mL por grama de biomassa seca resultam numa recuperação maior em AG. Demonstrando que a reação de saponificação parece ser mais eficaz quanto mais fluida a amostra no momento do experimento.

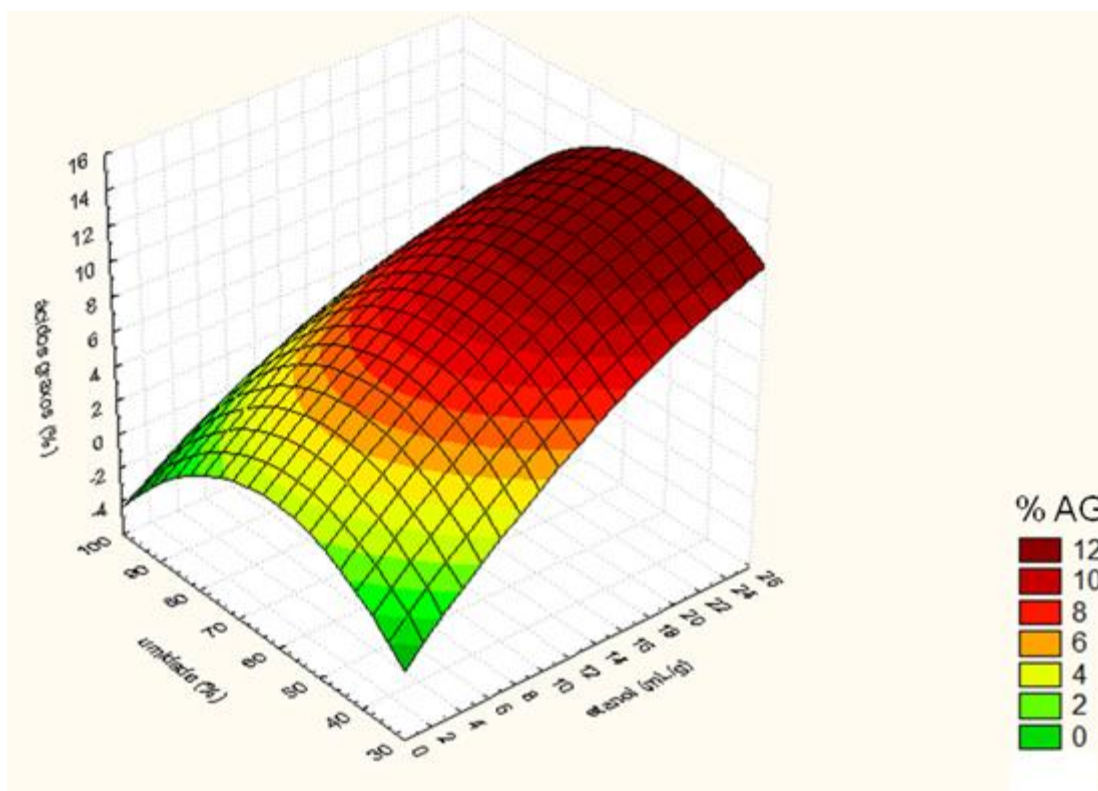


FIGURA 16 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POR SAPONIFICAÇÃO EM RELAÇÃO AO VOLUME DE ETANOL E UMIDADE POR GRAMA DE BIOMASSA SECA.

Já a análise da recuperação de AG considerando apenas a massa de KOH e volume de etanol por grama de biomassa seca, revela que as maiores recuperações se dão ao se utilizar massas entre 0,4 g e 0,8 g de KOH por grama de biomassa seca e acima de 15 mL de etanol, a recuperação de AG para essas condições analisadas isoladamente resulta em torno de 10% de AG por grama de biomassa, conforme a FIGURA .

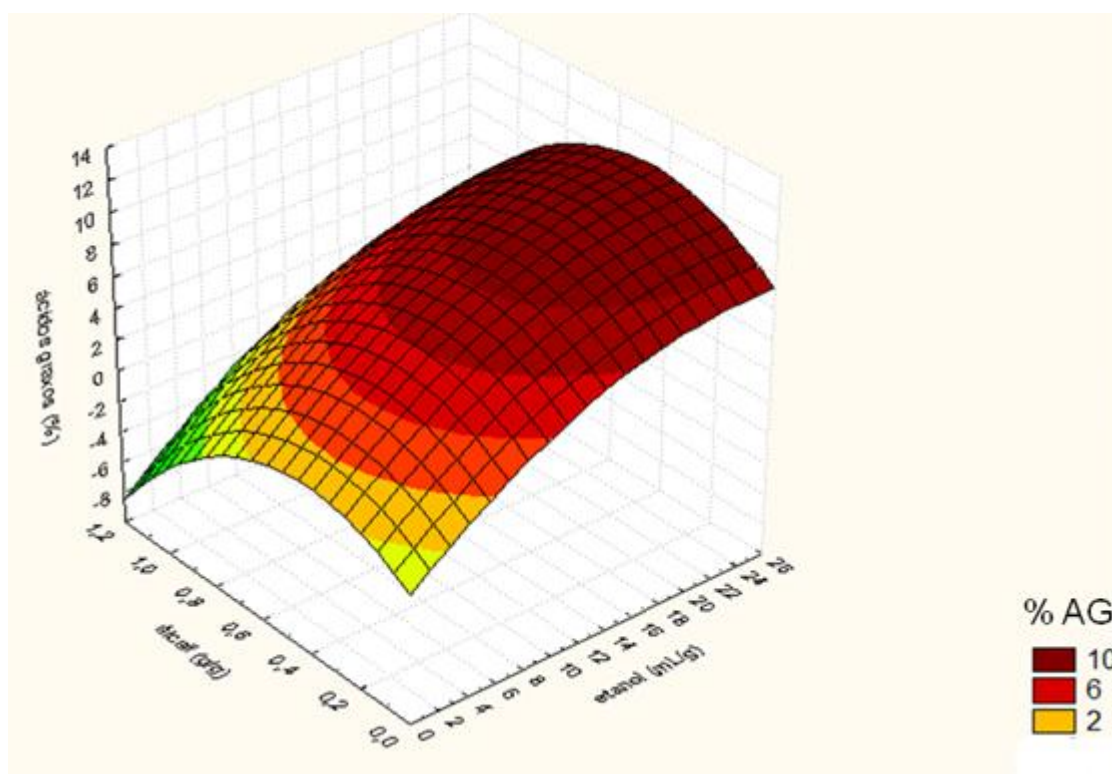


FIGURA 17 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POR SAPONIFICAÇÃO EM RELAÇÃO AO VOLUME DE ETANOL E MASSA DE KOH POR GRAMA DE BIOMASSA SECA.

Analisando o gráfico de superfície de resposta para a interação entre a umidade e a massa de KOH, conforme mostra a FIGURA 18, percebe-se pouca influência da umidade quando se compara essas duas variáveis isoladamente, valores abaixo de 0,8 g de KOH por grama de biomassa seca e umidades entre 50 e 80% resultam em recuperações de AG similares, ao redor de 5%.

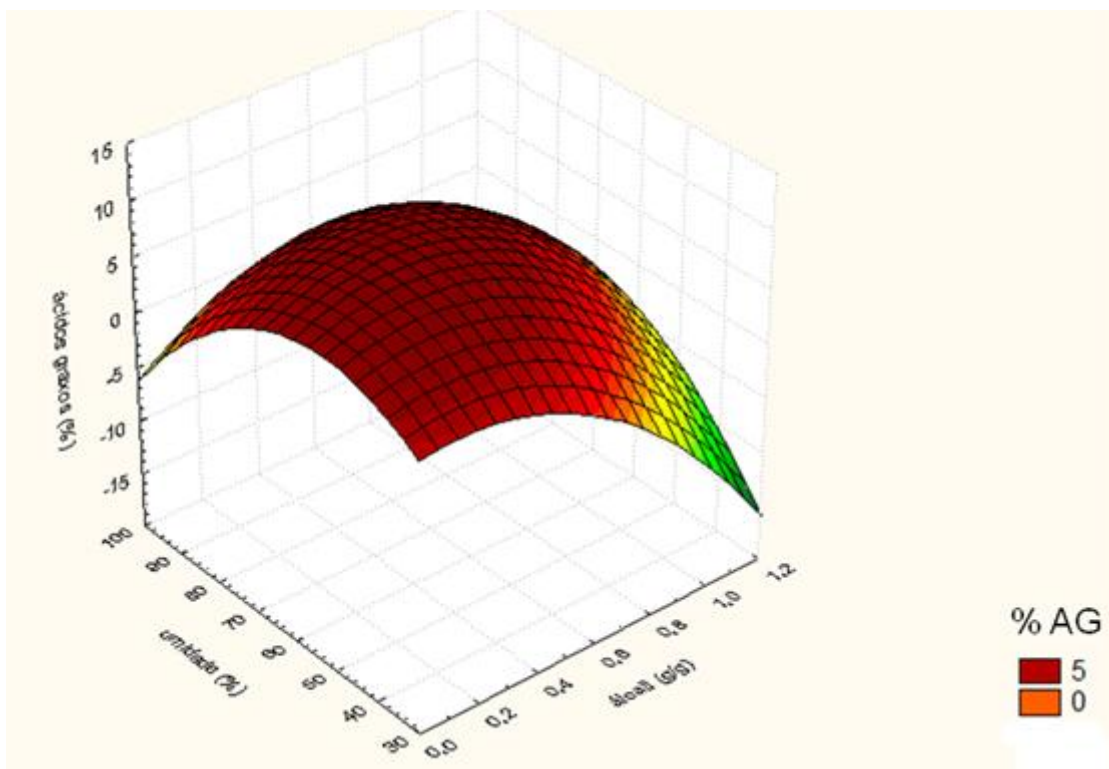


FIGURA 18 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POR SAPONIFICAÇÃO EM RELAÇÃO À UMIDADE E MASSA DE ÁLCALI POR GRAMA DE BIOMASSA SECA.

Por fim, os dados de massa de KOH e volume de etanol foram relacionados em forma de título em massa e um gráfico analisando as três variáveis simultaneamente pôde ser confeccionado, conforme a FIGURA 19. Pode-se prever então, confirmando o que demonstraram os outros gráficos isolados, que a utilização de uma solução alcoólica inferior a 8% de KOH e umidades entre 50 e 80% parecem atingir a mesma recuperação em AG, ao redor de 10%, ou seja, $0,1 \text{ g AG. g biomassa seca}^{-1}$.

5.3 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS PELOS MÉTODOS A QUENTE E A FRIO

Os resultados da recuperação de lipídeos totais obtidos pelo método a frio estão representados na FIGURA 20. Os lotes 1 e 2, apresentaram maior recuperação de LT, $14,96 \pm 1,31\%$, $16,62 \pm 0,21\%$, respectivamente. Já para os lotes 3 e 4, houve uma recuperação de $11,39 \pm 0,31\%$ e $14,32 \pm 0,34\%$.

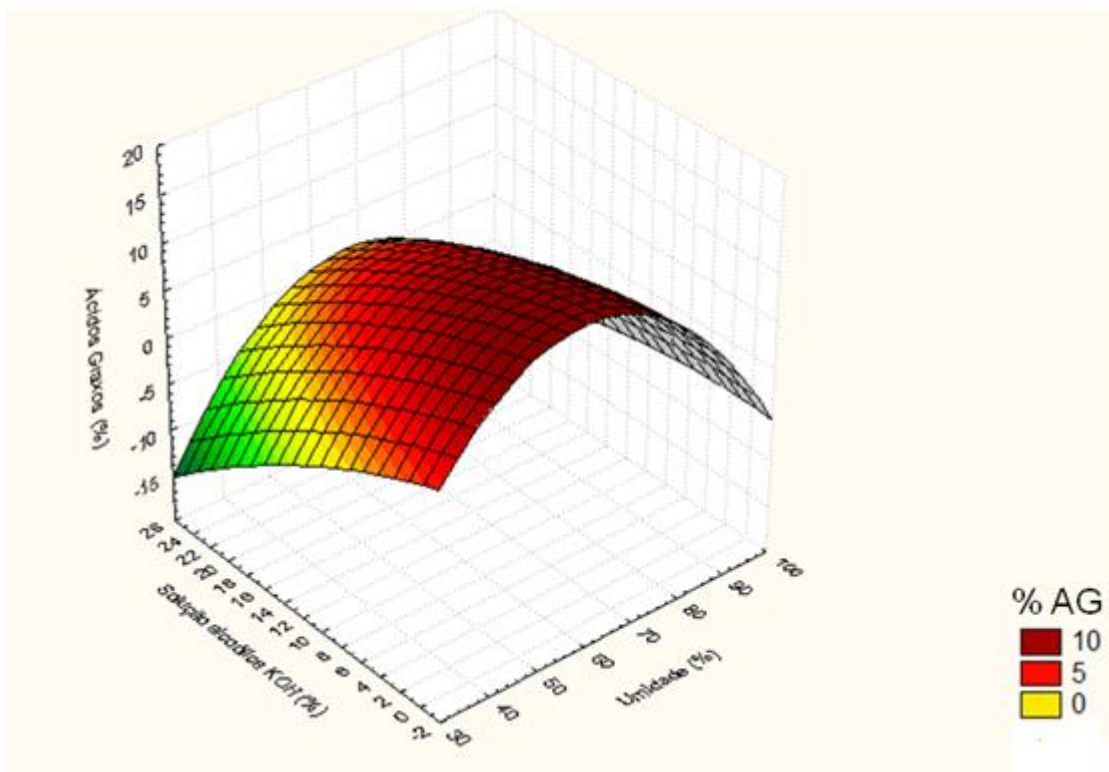


FIGURA 19 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DE SOLUÇÃO ALCOÓLICA UTILIZADA E UMIDADE.

O fato da porcentagem em massa de LT de todos os lotes ser maior que a extração de ácidos graxos por saponificação, dá-se pelo fato de que entre os lipídeos totais obtidos pelo método a frio, estão moléculas insaponificáveis, ou seja, que não apresentam ácidos graxos em sua composição, e também pelo fato de que nos lipídeos neutros, os triacilglicerídeos, há a molécula de glicerol acoplada ao ácido graxo, como visto na revisão de literatura, que infere no maior peso molecular dos extratos obtidos. A correta comparação das metodologias é realizada quando se avalia a conversão dos métodos em EMAG's.

A extração dos LT pelo método a quente do lote 4, por sua vez, resultou em $9,20 \pm 0,28\%$ de LT, considerado baixo, uma vez que, utilizou-se um tempo relativamente longo para extração, 8 h de refluxo. A diferença na recuperação de LT entre os lotes cultivados em sala de cultivo, 1 e 2, e fotobiorreator, 3 e 4, deve-se às condições de cultivo dentro do laboratório e no fotobiorreator. Porém, o objetivo deste trabalho não é de comparar os sistemas de produção. Desse modo cada lote comporta-se de maneira independente e serve como base apenas de comparação das metodologias. Assim sendo, os dados de LT obtidos pelo método a frio confirmam as recuperações de AG por saponificação, visto que os lotes 3 e 4 apresentaram menor quantidade de LT assim como de AG.

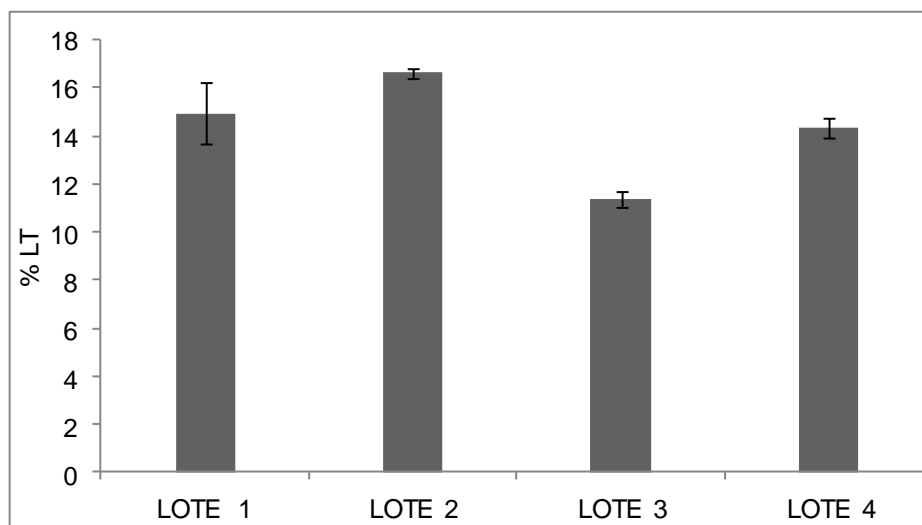


FIGURA 20 - LIPÍDEOS TOTAIS OBTIDOS A PARTIR DA EXTRAÇÃO Á FRIO DOS LOTES DE BIOMASSA.

As barras verticais representam o erro padrão σ .

5.5 CONVERSÃO DOS EXTRATOS DE AG E LT EM EMAG'S

A partir das massas de LT obtidas por extração a frio e de AG obtidas por saponificação, foi possível realizar o ensaio de esterificação desses extratos e calcular de acordo com a equação 3, quanto do material foi convertido em EMAG. Esse resultado torna-se importante para que se possa avaliar a eficiência da metodologia de saponificação para a produção de biodiesel de microalgas. Assim sendo, quanto mais próxima de 100% for a conversão, menos resíduos e material graxo insaponificável (pigmentos e outras moléculas apolares) há na amostra que foi submetida à esterificação. Na TABELA 10, são apresentados os teores de material graxo dos ensaios de saponificação (maior rendimento) e extração a frio, assim como a conversão mássica em EMAG em porcentagem. Pode-se perceber a diferença entre os valores de conversão, que para os extratos de AG (saponificação) fica em torno de 90% e para os extratos de LT, varia de 60 a 80%. Com esses resultados de conversão, a ideia de que por mais que se obtenham valores relativamente altos na recuperação de LT, dificilmente se obterá conversão eficiente em EMAG's, pois entre os LT há material insaponificável e também pigmentos como a clorofila, que é fortemente apolar e é extraída juntamente quando se utiliza o método de extração a frio proposto por Bligh e Dyer (1959). Por outro lado, recuperações modestas de AG ao se utiliza o método de saponificação, podem

garantir conversões maiores e menos problemas na separação de fases ao término da metodologia de esterificação.

TABELA 10 - RESULTADO DA CONVERSÃO MÁSSICA EM EMAG'S EM RELAÇÃO À BIOMASSA SECA.

Método de Extração	Lote 1		Lote 2	
	AG - LT	$X_{EMAG}(\%)$	AG - LT	$X_{EMAG}(\%)$
Saponificação	11,92 ± 0,96	90,31 ± 0,36	12,17 ± 0,39	89,66 ± 9,26
Método a frio	14,96 ± 1,31	74,13 ± 7,87	16,62 ± 0,20	64,89 ± 4,34

A TABELA 11 apresenta os valores de conversão mássica em EMAG's de todos os lotes de acordo com a metodologia de extração utilizada. Para todos os lotes, a conversão dos AG em EMAG's foi maior, confirmando o que foi discutido anteriormente. Ressalta-se que esta conversão de AG em EMAG ainda poderia ser maior, mais próxima a 100%, no entanto, como o método de saponificação utiliza hexano para extração, é praticamente impossível não extrair outras moléculas mais apolares juntamente com os AG. A FIGURA 21 apresenta a aparência do material graxo extraído pelas metodologias antes da conversão em EMAG'S, em que se percebe nitidamente a presença de pigmentos nos lipídeos obtidos por extração a frio. Há poucos dados na literatura que avaliam a conversão dos LT e AG em biodiesel, fator que leva a discussão a cerca da utilização destes microorganismos na produção de biodiesel ser baseada em extrapolações (TEIXEIRA, 2006).

TABELA 11 - CONVERSÃO MÁSSICA (%) EM EMAG.

Extração	Extração a frio	Extração por saponificação
Lote 1	68,63 ± 2,61	90,32 ± 1,94
Lote 2	64,93 ± 0,44	89,74 ± 0,81
Lote 3	61,72 ± 0,63	78,93 ± 0,90
Lote 4	40,81 ± 0,82	89,91 ± 0,63

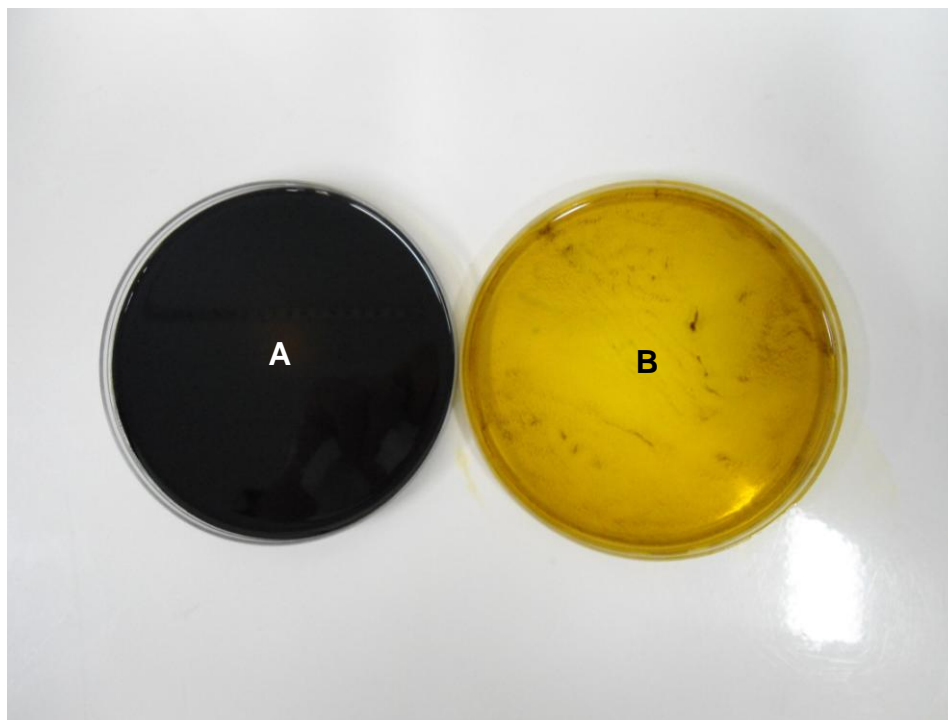


FIGURA 21 – ASPECTO VISUAL DO MATERIAL GRAXO EXTRAÍDO POR A) MÉTODO A FRIO E B) SAPONIFICAÇÃO. *SOLUBILIZADOS EM HEXANO. FONTE: A AUTORA (2012).

Como a extração a quente só pôde ser realizada com o Lote 4, a mesma apresentou uma conversão mássica de $28,72 \pm 3,01\%$, considerada baixa em relação às conversões pelos outros métodos e que não pode ser repetida devido à limitação de massa da amostra de lipídeos totais.

5.6 COMPARAÇÃO DO TEOR DE ÉSTERES OBTIDOS A PARTIR DO MÉTODO *IN SITU*, EXTRAÇÃO A FRIO E DE SAPONIFICAÇÃO

Como já citado anteriormente, para correta comparação das metodologias em escala laboratorial, foi calculado o teor de ésteres resultante para os quatro lotes frente as duas metodologias. Os resultados são apresentados na FIGURA 22.

A partir da esterificação *in situ* realizada de acordo com o método de Hartman e Lago modificado (MENEZES *et al.*, 2012), pode-se prever a quantidade de EMAG's em cada lote de biomassa. Os resultados serviram para avaliar também a eficiência de uma metodologia de esterificação *in situ* frente a metodologias que utilizam previamente a extração do material graxo para posterior conversão em biodiesel. Os lotes 1 e 2, apresentaram teor de $9,17 \pm 0,04\%$ e $6,73 \pm 0,31\%$,

respectivamente, sendo inferiores aos rendimentos dos lotes 3 e 4, $11,08 \pm 0,88\%$ e $9,89 \pm 0,54\%$, respectivamente.

A princípio, um maior teor de lipídeos totais e ácidos graxos resultariam em maior teor de ésteres na esterificação da biomassa, porém, isso não é observado, pois os lotes 3 e 4 apresentaram nos experimentos anteriores, menores porcentagens de LT e AG, logo deveriam apresentar menor teor de ésteres na metodologia *in situ* para obtenção dos EMAG's. No entanto, as características da biomassa podem influenciar esses resultados, como por exemplo, a biomassa seca do lote 3, cultivado em FBR, podem ter membranas celulares mais resistentes relacionadas às condições de cultivos a que foi exposta, e que não foram suficientemente quebradas para extração de LT e AG. E uma metodologia *in situ* com a utilização de reagentes mais agressivos, básicos e ácidos, essa conversão a ésteres metílicos pode ser substancialmente mais eficiente. Todavia, a execução dos experimentos *in situ* serviu de comparação às conversões de LT e AG em EMAG's posteriormente.

Para os lotes 1, 3 e 4 há diferença no rendimento das metodologias. No lote 1, o rendimento em ésteres foi de $10,26 \pm 1,32\%$ quando da execução da extração a frio e $10,02 \pm 0,96\%$ quando realizada a saponificação. Já para o lote 2, o rendimento em ésteres da extração por saponificação superou o da extração a frio, $10,91 \pm 0,24\%$ contra $10,78 \pm 0,39\%$. Ressalta-se neste ponto que, os rendimentos dos lotes 1 e 2 foram similares, ambos representam também o rendimento em ésteres quando o cultivo é realizado em sala de cultivo com condições controladas. Neste caso, não houve diferença significativa para a extração por saponificação quando a biomassa foi utilizada úmida e fresca ou seca e ressuspendida.

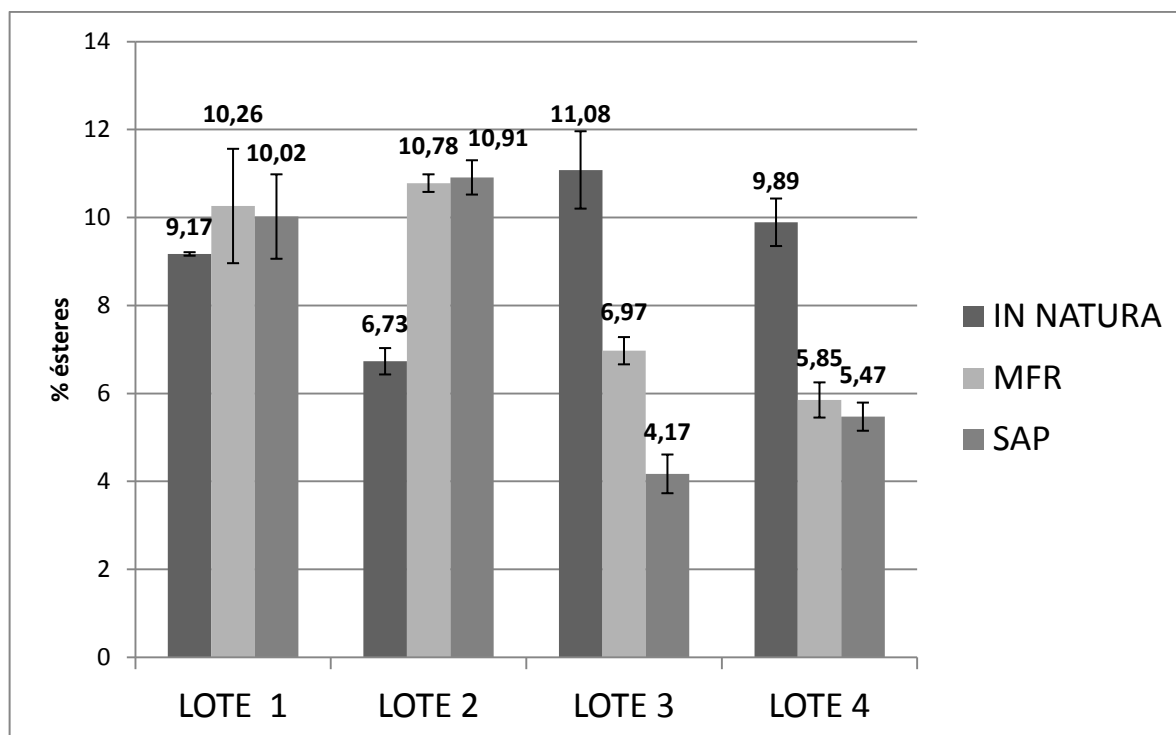


FIGURA 22 - TEOR DE ÉSTERES A PARTIR DA CONVERSÃO DA BIOMASSA *IN NATURA* E DOS EXTRATOS DE LT E AG EM EMAG'S. As barras verticais representam o erro padrão σ .

Já o lote 3 apresentou diferença no teor de ésteres para os dois métodos de extração, devido a diferença entre o LT e AG das extrações, valores que foram utilizados na equação 4, e também da própria extração com a biomassa seca e ressuspendida, a qual pode ter sido homogeneizada de maneira insuficiente. Todavia, surpreende o baixo teor de ésteres dos lotes 3 e 4 ambos cultivados no fotobiorreator do NPDEAS, no entanto, o baixo teor de ésteres pode ser decorrente de inúmeros fatores externos, como por exemplo o cultivo, e não do método de extração.

5.7 ANÁLISE DA VARIÂNCIA – ANOVA para extração de AG por saponificação

A Tabela 12 representa os valores dos efeitos estimados para cada variável independente (volume de etanol, massa de álcali e umidade). Esses valores se referem à influência que essas variáveis exercem sobre a resposta (conversão em ácidos graxos) a um nível de 95% de significância. A tabela de análise de variância é uma ferramenta do software STATISTICA e é gerada automaticamente quando comandada. Os valores utilizados para confecção da mesma foram os rendimentos do planejamento fatorial dos lotes 1 e 2.

A análise de variância baseia-se na decomposição da contribuição total da variável resposta em partes que podem ser atribuídas aos tratamentos e ao erro experimental. Essa variação pode ser medida por meio das somas de quadrados como mostrado na TABELA 12.

A partir destes dados gerados pelo software, obtém-se o valor de p para um nível de significância de 90%. A análise deste valor de p mostra que as variáveis volume de etanol e umidade são estatisticamente significantes na produção dos ácidos graxos como comentado na legenda da tabela. Já a massa de álcali (KOH) não foi significativa para esse nível de significância.

TABELA 12 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS EXPERIMENTOS DE SAPONIFICAÇÃO

Origem da Variância	SQ ^a	GL ^b	Fcal ^c	Valor – p ^d
Etanol	17,025	1	10,399	0,014
Álcali	0,121	1	0,073	0,794
Umidade	28,802	1	17,592	0,004
Incerteza	11,461	7	-	-

^a SQ = Soma dos quadrados ou soma quadrática; ^b GL = Graus de liberdade; ^cFcal = F calculado com a razão entre médias quadráticas (ou variâncias). Fcal é utilizado pela planilha no cálculo do valor- p correspondente. ^d $p \leq \alpha$ (normalmente $\alpha = 0,05$) significa que a fonte de variação é significativa no teste de hipóteses estatístico.

A observação das variáveis significantes no processo de extração por saponificação é importante no escalonamento do processo, pois demonstra que o teor de umidade da biomassa pode ser limitante e a quantidade de KOH na saponificação não necessita ter uma medição exata, visto ser agente qualitativo da reação e não quantitativo.

5.8 COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS

A composição em ácidos graxos obtidas a partir do EMAG'a processados por cromatografia em fase gasosa resultou no perfil que pode ser observado na TABELA 13.

TABELA 13 - COMPOSIÇÃO EM AG DOS LOTES UTILIZADOS PARA EXTRAÇÃO PELO MÉTODO A FRIO E POR SAPONIFICAÇÃO.

Ácidos Graxos	Resultados (g.100g ⁻¹)							
	Lote 1		Lote 2		Lote 3		Lote 4	
	MFR*	SAP**	MFR	SAP	MFR	SAP	MFR	SAP
C12:0 – Láurico	1,25	1,39	-	-	-	-	-	-
C13:0 - Tridecanóico	-	0,58	-	-	-	-	-	-
C14:0 – Mirístico	-	1,49	-	1,63	3,08	-	1,01	1,43
C14:1 - Miristoléico	1,25	0,70	-	-	-	-	-	-
C15:0 - Pentadecanóico	-	3,10	-	3,06	-	-	2,57	2,52
C16:0 – Palmítico	23,04	29,11	34,73	33,11	43,97	60,09	24,25	38,75
C16:1 – Palmitoléico	1,39	2,01	-	2,19	4,34	6,01	2,42	4,49
C17:0 - Heptadecanóico	0,94	0,93	-	0,88	-	-	1,42	1,17
C17:1 - Heptadecanóico	0,98	1,62	-	1,95	3,40	-	-	-
C18:0 – Estearico	2,64	1,33	5,75	1,04	-	-	0,46	0,96
C18:1 – Oléico	22,32	18,29	16,64	18,15	20,57	22,46	14,74	21,46
C18:2 – Linoléico	17,56	16,37	17,75	14,86	10,61	3,93	21,02	11,85
C18:3 - Linolênico	27,03	21,58	25,13	21,87	14,05	7,52	27,57	15,78
C20:1 - Eicoseinóico	1,59	1,33	-	1,27	-	-	-	1,32
C20:2 - Eicosadienóico	-	0,22	-	-	-	-	-	0,29
SATURADOS	27,86	37,89	40,48	39,72	47,05	60,09	29,72	44,79
MONOINSATURADOS	27,56	23,94	16,64	23,55	28,31	28,46	21,73	27,26
POLIINSATURADOS	44,58	38,17	42,88	36,73	24,65	11,45	48,57	27,93

* MFR – extração pelo método a frio; **SAP – extração por saponificação.

Como comentado na revisão bibliográfica, a composição em ácidos graxos na microalga pode sofrer grandes variações de acordo com as condições de cultivo fato observado para as amostras descritas na TABELA 13.

Segundo Makulla (2000), o padrão de ácidos graxos em microalgas é conhecido por ser altamente variável, primeiramente, depende do grupo ao qual a espécie em estudo pertence (LEE *et al.*, 1971), outro fator são as condições internas e externas a que estão submetidas as microalgas como temperatura (MORTENSEN *et al.*, 1988), irradiação (THOMPSON *et al.*, 1990), limitação de nutrientes (MULLER-NAVARRA, 1995) e por último a fase de crescimento da população de microalgas e sua taxa de crescimento (COHEN *et al.*, 1988) podem influenciar na composição química das microalgas.

Desse modo a comparação dos perfis em AG é tão somente para avaliar se a metodologia proposta obtém perfil semelhante ao de uma metodologia clássica como a de Bligh e Dyer, pois como são métodos intrinsecamente diferentes, poderiam resultar na extração majoritária de um ou outro ácido graxo. Pode-se observar que os dois métodos apresentaram perfis semelhantes para todos os lotes, um ou outro AG minoritário foi extraído por uma metodologia e pela outra não.

O ácido graxo C16:0 que apresenta estabilidade à oxidação, aparece em quase todos os perfis. Porém também há a presença dos insaturados: C18:1, C18:2 e C18:3 que, por apresentarem insaturações, possuem pouca estabilidade a processos oxidativos. Porém, a estimativa das propriedades do EMAG's obtidos com esses perfis auxilia na definição de algumas características do biodiesel de microalgas do ponto de vista técnico.

Em todos os lotes trabalhados, houve considerável recuperação de ácidos graxos poliinsaturados, destacam-se o C18:2 e C18:3. Assim, o cultivo de microalgas pode ser visto como alternativa para produção desses ácidos graxos poliinsaturados para nutrição de animais e seres humanos (MEDINA *et al.*, 1998).

Em suma, a metodologia de saponificação obteve em maior extração de ácidos graxos saturados, já para os ácidos graxos poliinsaturados a extração por saponificação foi ligeiramente inferior.

5.9 ESTIMATIVA DAS PROPRIEDADES DOS EMAG's

A partir dos perfis cromatográficos dos lotes, foi possível calcular as massas molares médias dos ácidos graxos constituintes e assim obter algumas propriedades do EMAG's das microalgas. As propriedades foram calculadas para os lotes 3 e 4,

cultivados em fotobiorreator. Os resultados são apresentados na TABELA 14. As massas molares médias dos ácidos graxos foram calculadas a partir da média ponderada considerando a porcentagem de cada ácido graxo presente; pela semelhança do perfil cromatográfico dos lotes as massas molares médias devem ser próximas.

TABELA 14 - PROPRIEDADES ESTIMADAS DOS EMAG'S OBTIDOS A PARTIR DOS LOTES CULTIVADOS NO FBR.

	Fotobiorreator				SOJA
	Lote 3		Lote 4		
Estimativas das propriedades do Biodiesel	MFR	SAP	MFR	SAP	-
Massa Molar media – ácidos graxos (g.mol ⁻¹)	257,59	264,51	247,81	251,60	-
Massa Molar media – EMAG (g.mol ⁻¹)	271,11	278,52	260,65	264,72	-
Índice de Iodo [I ₂ (g). amostra (100 g ⁻¹)	80,42	53,85	129,06	88,36	120 – 141
Poder Calorífico Superior (PCS) [(MJ.kg)]	44,10	41,67	41,25	41,39	39,5

Os índices de Iodo calculados foram maiores para o método de extração a frio nos dois lotes do fotobiorreator, e menores para saponificação, visto que esse é um índice que reflete o grau de insaturação do material graxo, o MFR como resultou em uma composição de AG com maior porcentagem de insaturados, logo, seu índice de Iodo seria maior. Para efeito de comparação, o biodiesel de soja apresenta comumente valores entre 120 – 141 I₂ (g). amostra (100 g⁻¹) (CECCHI, 2003 citado por COSTA, 2006), a norma europeia (EN 14214) institui o máximo para o índice de Iodo como sendo de 120 g I₂/100 g (LOBO, FERREIRA; CRUZ, 2009), desse modo, os valores alcançados para o perfil extraído por saponificação, apresentam melhores índices que a metodologia clássica a frio, para os dois lotes dentro do limite das normas.

Quanto ao poder calorífico calculado, os perfis extraídos por saponificação apresentaram valores ligeiramente superiores, considera-se que quanto maior o valor deste parâmetro maior será a quantidade de energia gerada. Em MJ, porém, os valores são da mesma ordem, de 41 a 44 MJ por kilo de biodiesel. Em seu trabalho, Carvalho *et al.* (2011), obteve PCS de aproximadamente 41,6 MJ por mol de biodiesel de microalgas a partir de metanólise *in situ*, desse modo, os valores

encontrados condizem com a realidade para o biodiesel de microalgas, já que o biodiesel de soja apresenta em torno de 39,5 MJ (CERBIO, 2007) por kg.

5.10 RENDIMENTO DO PROCESSO PILOTO DE SAPONIFICAÇÃO

Para cálculo do rendimento do processo piloto de extração por saponificação, primeiramente considerou-se uma perda de biomassa durante todo o processo: houve perdas de material no transporte e operação dos equipamentos, estimadas em torno de 10%, além disso, não foi verificado o grau de degradação do material no momento da floculação, totalizando as perdas de biomassa em 30%. Assim sendo, este valor foi descontado da massa inicial (biomassa úmida de *Scenedesmus sp.*) de partida do reator, ao final do todo o processo, um vial de massa conhecida recebeu 10 mL do solvente contendo o material graxo. Este vial foi seco em estufa a 60 °C até massa constante, e de posse deste valor, extrapolou-se a massa para o volume de solvente que foi utilizado para o experimento piloto. Assim, o rendimento do processo foi de 12,3% de material graxo em relação à biomassa seca presente inicialmente, semelhante aos resultados alcançados em laboratório.

Este cenário mostra apenas as perspectivas para a espécie *Scenedesmus sp.*. Estudos apontam que o conteúdo lipídico total dessa microalga varia de 12 a 14% em relação ao peso seco (BECKER, 1994), sendo que os valores obtidos pela saponificação da biomassa úmida condizem com o esperado para a espécie. Certas espécies chegam a acumular até 80% de lipídeos em relação ao seu peso seco, mas comumente são encontrados valores em torno de 20 a 50%, como por exemplo: *Nannochloropsis sp.* 31–68% *Schizochytrium sp.* 50–77%, *Chlorella sp.* 28–32% e *Phaeodactylum tricornutum* 20–30% (CHISTI, 2007). A FIGURA 23 mostra o aspecto visual do material extraído em escala piloto, todavia, bastante diferente do material graxo obtido em laboratório que tem coloração amarelada, o material graxo obtido pelo processo piloto possui alguma quantidade de clorofila, uma vez que a extração foi realizada com benzina comercial, solvente orgânico composto por alcanos de cadeia de 5 a 9 carbonos, com maior caráter apolar que o hexano utilizado em laboratório.



FIGURA 23 – MATERIAL GRAXO OBTIDO POR SAPONIFICAÇÃO EM ESCALA PILOTO.

Os principais ácidos graxos presentes verificados na análise cromatográfica idêntica a realizada com os lotes de laboratório, bem como sua classificação, estão indicados na Tabela 15.

Sendo assim, pode-se prever que os ésteres derivados dos ácidos graxos de microalgas apresentem baixa estabilidade oxidativa, visto que aproximadamente 65% da sua composição compreendem ácidos graxos insaturados. Assim, esse material possui grande importância no mercado farmacêutico e alimentício (HARUN *et al.*, 2010).

O processo piloto revelou alguns problemas no aumento de escala da extração, como por exemplo, as perdas de biomassa na floculação e partida do reator, bem como a impossibilidade de se retirar todo o material graxo das microalgas sem arraste de pigmentos, porém a curto prazo pode servir para extração do material graxo em maior quantidade que possam servir de base para outros estudos do grupo na produção de biodiesel.

TABELA 15 – PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS OBTIDOS PELO PROCESSO PILOTO DE SAPONIFICAÇÃO

Ácidos Graxos	Resultado (g/100g)
C16:0 - Palmítico	18,50
C18:0 - Esteárico	2,60
C16:1 - Palmitoléico	14,01
C18:1 - Oléico	19,91
C18:2 - Linoléico	10,05
C18:3 - Linolênico	20,08
Outros	14,85
Saturados	28,45
Monoinsaturados	36,31
Poli-insaturados	28,84
Trans-Isômeros Totais	6,40

Tendo em vista a necessidade de autossuficiência, o Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável visa à construção de novos fotobiorreatores para a alimentação da planta de produção de biodiesel e também uma planta piloto de extração apropriada à execução de ensaios com a biomassa úmida, todavia, a pesquisa também foca em outros coprodutos derivados de microalgas, como por exemplo, compostos de elevado valor biotecnológico, como ácido linoleico (ômega 6) e linolênico (ômega 3), visto a quantidade de ácidos graxos poliinsaturados presentes nas microalgas.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, os ácidos graxos de biomassa úmida da microalga *Scenedesmus sp.* foram extraídos pela metodologia de saponificação e comparados quantitativamente e qualitativamente à metodologia clássica de extração de lipídeos de microalgas (método a frio proposto por Bligh e Dyer (1959)). As conclusões podem ser resumidas como se segue:

[1] Os lotes de biomassa de *Scenedesmus sp.* cultivados tanto em sala de cultivo quanto em FBR apresentaram rendimento médio de 9-12% de material graxo utilizando a metodologia de extração por saponificação, que mostrou ser seletiva na extração de material graxo com riqueza de ácidos graxos, pois a conversão em EMAG's foi superior a 78% nos experimentos; a coloração amarelada do material extraído corroborou a pureza do material graxo;

[2] Os maiores rendimentos na extração por saponificação foram obtidos com biomassa de aproximadamente 80% de umidade e solução alcoólica ao redor de 5% de KOH em etanol; condizente com o ponto central do planejamento fatorial realizado, todavia, segundo a análise dos gráficos de superfície de resposta e de variância, a utilização de uma solução alcoólica inferior a 8% de KOH e umidades entre 50 e 80% demonstraram atingir a mesma recuperação em AG, sendo a umidade e o volume de etanol estatisticamente significantes ao processo;

[3] Na extração a frio, obteve-se 14 - 16% de LT, porém houve menor conversão na esterificação por Hartman e Lago modificado, de 40 – 65%; visto que método a frio extrai muitos pigmentos (clorofila) e lipídeos polares presentes na biomassa, que não apresentam ácidos graxos em suas estruturas. No entanto, em teor de ésteres - EMAG, as duas metodologias apresentaram rendimentos semelhantes para cada lote, todavia, a extração a frio apresenta inúmeras etapas e utiliza solventes tóxicos em sua execução (metanol e clorofórmio), desse modo, conclui-se que a metodologia de saponificação é viável na escala utilizada, pela diminuição de etapas (omite-se a secagem), seletividade para ácidos graxos e utilização de solvente menos tóxico;

[4] Por fim, a composição em AG dos lotes extraídos por ambas as metodologias apresentaram elevada semelhança quanto a composição qualitativa de saturados, mono e poliinsaturados, demonstrando que o processo de saponificação pode ser utilizado sem ônus do perfil dos ácidos graxos extraídos. Assim sendo, a secagem da biomassa úmida pode ser dispensada para extração de material graxo de *Scenedesmus sp.* pelo NPDEAS, contribuindo com a redução de operações unitárias a o processo e obtendo-se material purificado para produção de biodiesel de microalgas em maior escala a partir da extração por saponificação;

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Considerando os resultados e conclusões desta dissertação, sugere-se para trabalhos futuros:

- Saponificação de biomassa de outras espécies de microalgas, com maior rendimento em material graxo;
- Esterificação do material graxo obtido por saponificação em escala piloto;
- Cálculo do gasto energético das metodologias de extração de material graxo;
- Estudo da cinética da reação de saponificação dos ácidos graxos de microalgas;
- Escalonamento do processo de saponificação no NPDEAS;
- Estudo do ciclo de vida do biodiesel de microalgas;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, M. R.; CAMERINI, F. V.; COSTA, J. A. V.. Perda química de carbono e cinética do crescimento celular em cultivos de *Spirulina*. **Química Nova**, v. 31, p 2031-2034, 2008.

ANP. **AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS**. Disponível em: <http://www.anp.gov.br>. Acesso em 04/10/2012.

ANVISA. Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999, **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de óleos e gorduras vegetais**, Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, p. 82 - 87, 1999.

AOCS - American Oil Chemists Society; Official and Tentative Methods, 3ª ed., Chicago, 1985, vol. 1.

AOCS International. 1997. Official methods of analysis. Calculated Iodine Value: **Cd 1c-85**.

AOCS International. 1997. Official methods of analysis. Calculated Saponification Value: **Cd 3a-94**.

ARANDA, D. A. G. GONÇALVES, J.A. PERES, J.S. RAMOS, A.L.D.RIBEIRO DE MELO, C.A. ANTUNES, O.A.C. FURTADO, N.C., CARLTON, A. The use of acids, niobium oxide, and zeolite catalysts for esterification reactions. **Journal Physical Organic Chemistry**, London, v. 22, n. 7, p. 709-716, July 2009.

BALASUBRAMANIAN S., ALLEN, J. D., KANITKAR, A.; BOLDOR, D.. Oil extraction from *Scenedesmus obliquus* using a continuous microwave system – design, optimization, and quality characterization. **Bioresource Technology**. p.3396-3403 (2011).

BAKY, H. H. A. E., EL-BAROTY, G. S., BOUAID, A., MARTINEZ, M., ARACIL, J. Enhancement of lipid accumulation in *Scenedesmus obliquus* by optimizing CO₂ and Fe³⁺ levels for biodiesel production. **Bioresource Technology**. 2012;119:429–32.

BECKER, E. W. **Microalgae: Biotechnology and microbiology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.

BELARBI, E. H.; MOLINA, E.; CHISTI, Y. A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. **Enzyme and Microbial Technology**. v.26. p 516–529. 2000.

BENEMANN, J. R.; GOEBEL, R. P.; WEISSMAN, J. C.; AUGENSTEIN, D. C.. **Microalgae as a source of liquid fuels**. 1982. U.S. Department of Energy, Office of Energy Research 280 p.

BLIGH, E. G., DYER, W. J.. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**. 1959.

BRANDINI, F. P.; LOPES, R. M.; GUTSEIT, K. S.; SPACH, H. L.; SASSI, R.. **Planctologia na plataforma continental do Brasil - Diagnose e Revisão Bibliográfica**. Ministério do Meio Ambiente dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal (MMA), Comissão Interministerial para os Recursos do Mar (CIRM), Fundação de Estudos do Mar (FEMAR). 1997.

CARDOSO, A. L.; NEVES, S. C. G.; SILVA, M. J.. **Esterification of oleic acid for biodiesel production catalyzed by SnCl₂: a kinetic investigation**. *Energies*, Paris, v. 1, p. 79-92. 2008.

CARVALHO JÚNIOR R.M., VARGAS J.V.C, RAMOS L.P., MARINO C.E.B, TORRENS J.C.L. Microalgae biodiesel via in situ methanolysis. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. 2011. P. 1418–27.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Editora da UNICAMP: 2º Ed. rev.- Campinas, SP, editora da UNICAMP, 2003. 207p

CERBIO - Centro Brasileiro de Referência em Biocombustíveis/ TECPAR - Instituto de Tecnologia do Paraná. **Relatório técnico interno de caracterização de óleos vegetais e biodiesel** (2007).

CERIANI, R., GONÇALVES, C., RABELO, J., CARUSO, M., CUNHA, A.C.C, CAVALERI, F.W., BATISTA, E.A.C., MEIRELLE, A.J.A., 2007, "Group contribution model for predicting viscosity of fatty compounds", **Journal of Chemistry Engineering**. V. 52, p. 965-972.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends Biotechnology**. n. 26, p. 126–131, 2008.

CHU S.P, The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae. **Journal of Ecology**. v.30. p. 284–325. 1942.

COHEN, Z., VONSHAK, A., RICHMOND, A. Effect of environmental conditions on fatty acid composition of the red alga *Porphyridium cruentum*: correlation to growth rate. **Journal of Phycology**. v.24: 328-332. 1988.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Unicamp, 2006. 453 p.

CONNOR WE. The importance of n–3 fatty acids in health and disease. **American Journal of Clinical Nutrition**. 2000;71:171S–5S.

COSTA, T. L. **Propriedades físicas e físico-químicas do óleo de duas cultivares de mamona**. Campina Grande. 2006. Dissertação de Mestrado em Engenharia Agrícola. Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Recursos Naturais.2006.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**. v. 32., p. 776-792, 2009.

DAMBISKI, Lorena, **Síntese de Biodiesel de Óleo de Nabo Forrageiro Empregando Metanol Supercrítico**, 2007, Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Mecânica e de Materiais, UTFPR. 2007.

DUARTE, P. F.; RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V.. **Comportamento Fluidodinâmico de Fotobiorreatores do tipo Tanques Abertos Utilizados no Cultivo da Microalga *Spirulina platensis***. In: XIV SINAFERM (Simpósio Nacional de Fermentações). **Anais**. 2003, Florianópolis. XIV SINAFERM, 2003.

FAJARDO, A.R., Cerdan, L.E., MEDINA, A.R., FERNANDES, F.G.A., MORENO, P.A.G., GRIMA E.M. Lipid extraction from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **European Journal of Mass Spectrometry**. 2007. p. 1605–8.

FLORES, C. C., PENA-CASTRO, J. M., FLORES-COTERA, L. B.. **Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas**. 2003. vol.28. p.450-456.

GERPEN, J. VAN. Biodiesel processing and production. **Fuel Processing Technology**. v. 86. p. 1097-1107. 2005.

GOMES, M. M. R.. **Produção de biodiesel a partir da esterificação dos ácidos graxos obtidos por hidrólise de óleo de peixe**. Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Escola de Química – EQ – 2009.

GONZALEZ M.J.I, MEDINA A.R., GRIMA E.M., GIMÉNEZ A.G., CARTENS M CERDÁN LE, Optimization of fatty acid extraction from *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 biomass. **Journal of american Oil Chemists Society** . v. 75.p. 1735-1740. 1998.

GOUVEIA, L., OLIVEIRA, A. C.. Microalgae as a raw material for biofuels production. **The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 2009. v. 36, p. 269–274.

GROBBELAAR, J. U.. Turbulence in mass algal cultures and the role of light-dark fluctuations. **Journal of Applied Phycology**.n.6.p.331-335, 1994.

HALIM, R., GLADMAN, B., DANQUAH, M.K., WEBLEY, P.A. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. **Bioresource Technology** 102 (2011) 178–185.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice, London**, v. 22, p. 475-476, 1973.

HARUN, R., SINGH, M., FORDE, G. M., DANQUAH, M. K.. **Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products**. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2010, 14, 1037–1047.

HILI, A. M., FEINBERG D. A.. Fuel from microalgae: lipid products, energy from biomass: building on a generic technology base. In: **Second technical review meeting**; 1984.

HO, S.A., CHEN, W., CHANG, J. *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO₂ mitigation and biodiesel production. **Bioresource Technology** v.101. 8725–8730. 2010.

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

KHAN, S. A., RASHMI, MIR. Z., HUSSAIN.. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. 2009. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**.

KIM, M. K., PARK, J. W., PARK, C. S., KIM, S. J., JEUNE, K. H., CHANG, M. U., ACREMAN, J. Enhanced production of *Scenedesmus spp.* (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. **Bioresource Technology** 2007;v.98.p.2220–8.

KNIE, Joachim L.W..**Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis : FATMA/GTZ,2004.289p.

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

KNOTHE, G.“Designer’ biodiesel: optimizing fatty acid ester composition to improve fuel properties”, **Energy & Fuels**, v. 22, p. 1358-1364, 2008.

KNOTHE, G. “Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition”, **Energy Environ Sci**, v. 2, p. 759-766, 2009.

KONUR O. The scientometric evaluation of the research on the algae and bio-energy. **Applied Energy**. v.88.p. 3532–40, 2011.

KUCEK, K. T.. **Otimização da transesterificação etílica do óleo de soja em meio alcalino**. 2004. 123 f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná.

LEE, J.-Y., YOO, C., JUN, S.-Y., AHN, C.-Y., OH, H.-M.. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource. Technology**. 2009, 101, S75–S77.

LEE, R.E, NEVENZEL, J.C., PFAVFENHOFER, G.A. (1971): **Importance of wax esters and other lipids in the marine food chain: phytoplankton and copepods**. Mar. Biol. 9: 99-108.

LI Y., ZHOU W., HU B., MIN M., CHEN P., RUAN, R.R. Integration of algae cultivation as biodiesel production feedstock with municipal wastewater treatment: Strains screening and significance evaluation of environmental factors. **Bioresource Technology** 2011;v.102.p.10861–7.

LIMA, R. C. P.. **O biodiesel e a inclusão social**. Câmara dos Deputados – Consultoria Legislativa (2004).

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S.L.C.; CRUZ, R.S. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, v. 32, p.1596-1608, 2009.

LOURENÇO S. **Cultivo de Microalgas Marinhas – Princípios e Aplicações**. 1st ed. São Carlos – Brazil: Rima; 2006.

LUKE DE CASTRO M.D., GARCÍA-AYUSO, L.E. Soxhlet extraction of solid materials: as outdated technique with a promising innovative culture. **Analytica Chimica Acta**. 1998; v.369. p.1–10.

MAKULLA, A. Fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus*: Correlation to dilution rates. **Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters**. v.2, p. 162–168. 2000.

MARIANO, A.B.,TORRENS,J., SATYANARAYANA, K. G., VARGAS, J.V.C. **Energia auto-sustentável a partir de biodiesel derivado de microalgas**. 4º Congresso Internacional De Bioenergia E 1º Congresso Brasileiro De Geração Distribuída E Energias Renováveis, 2009.. Anais Do 4º Congresso Internacional De Bioenergia, 1º Congresso Brasileiro De Geração Distribuída E Energias Renováveis. Curitiba, Paraná, Brasil: Editora FUPEF - Fundação De Pesquisas Florestais Do Paraná, 2009.

MARQUES, M. V. Determinação do teor de ésteres graxos em biodiesel metílico de soja por cromatografia gasosa utilizando oleato de etila como padrão interno. **Química Nova**. v. 33, p. 978-980.2010.

MATA, T. M., A. A. MARTINS E N. S. CAETANO. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, **14(1)**: p. 217-232, 2010.

MEDINA, A.R., GRIMA, E.M., GIMENEZ, A. G., IBANEZ, M.J. Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advances**. 1998;v.16; p.517–80.

MELO, J. C. de. **Otimização da Produção de Biodiesel**. Pernambuco, 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2007.

MENEZES, R. S.; LELES, M. G.; SOARES, A.T.; BRANDÃO, P. I.; ANTONIOSI FILHO, N.. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química. Nova**. v. XY,p. 1-6, 2012.

MERCER, P., ARMENTA, R. E.. Developments in oil extraction from microalgae. **European Journal of Lipid Science and Technology**. 2011.

MERCHUK, J. C.; WU, X.. Simulation of algae growth in a bench scale internal loop airlift reactor. **Chemical Engineering Science**.n.59. p.2899–2912, 2004.

MERÇON, F. **O que é uma Gordura Trans?**. QUÍMICA NOVA NA ESCOLA. v. 32, 2010..

METCALFE LD, SCHMITZ AA AND PELKA JR, Rapid Preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. **Analytical Chemistry**. v.38, p.514–515.1966.

MOLINA GRIMA, E.; FERNANDÉZ, F. G. A.; CAMACHO, F. G.; CHISTI, Y..Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scale up. **Journal of Biotechnology**.n.70.p.231-247, 1999.

MORTENSEN, S.H., BORSHEIM, K.Y., RA~NUZZO, J.R. & KNUTSEN, G.Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis*. Effects of silicate deprivation, temperature and light intensity. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** . v.122:173-185.

MULLER-NAVARRA, D. : Evidence that a highly unsaturated fatty acid limits *Daphnia* growth in nature. **Arch Hydrobiol**.1995. 132: 297-307

MUÑOZ, R. T..**Algal-bacterial photobioreactors for the degradation of toxic organic pollutants**. Doctoral Dissertation. Lund University, Sweden, 2005.

NIELSEN, J.; VILLADSEN, J.; LIDÉN, G..**Scale-up of bioprocesses**. Bioreaction Engineering Principles. Kluwer Academic Publishers, 2003.

OLAIZOLA, M..Commercial development of microalgal biotechnology: From the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering** . 2003, v.20,p. 459–466.

PELEGRIN, Y. F.."**Algas em la “botica”**". Avance y Perspectiva. v. 20, p. 283-292, 2001.

PÉREZ, H. E. B..**Biodiesel de microalgas**. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). 2007.

PERKINS, E. G..**Analysis of fats, oils and derivatives**. American Oil Chemists Illinois: Society Champaign, 1993. 664p.

PNPB. PROGRAMA NACIONAL DE PRODUÇÃO E USO DE BIODIESEL. Disponível em: http://www.mda.gov.br/portal/saf/arquivos/view/biodiesel/arquivos-2011/Biodiesel_Book_final_Low_Completo.pdf. Acesso em 04/10/2012.

PONTES, A. S. G. C. "**Influência das propriedades fluidodinâmicas na matriz do biodiesel metílico e suas misturas diesel/biodiesel de óleo de peixe**". Dissertação de mestrado. Pós- graduação em química. Universidade Federal da Paraíba. 2010.

PRABAKARAN P., RAVINDRAN A. D.. **Scenedesmus as a potential source of biodiesel among selected microalgae** Department of Biology, Gandhigram Rural Institute-Deemed. 2012. University, Gandhigram.

REDA, S. Y., CARNEIRO,P. I. B.. **Óleos e gorduras:aplicações e implicações**. Revista Analytica •n. 27. 2007.

SAHENA, F., Z Aidul, I. S. M., JINAP, S., KARIM, A. A..Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review. **Journal of Food Engineering**. 2009, v.95, p.240–253.

SCHAFRANSKI, A. S.; SCHROEDER, L.; ZAIA, L. L. ;BARBOSA, F. T.; MARIANO, A. B.; VARGAS, J. V. C. **Separação de biomassa de microalgas através da alteração de pH para produção de biodiesel**. Congresso Internacional de Bioenergia, 2011.

SERRA, T. M. **Desenvolvimento de catalisadores a base de Estanho(IV), para produção de ésteres metílicos de Ácidos graxos, via transesterificação e**

esterificação. Dissertação de mestrado. Pós-graduação em Engenharia Química. UFAL. 2010.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NUMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental.** 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836p.

SONG, D.; FU, J.; SHI, D. Exploitation of oil-bearing microalgae for biodiesel. **Chinese journal of biotechnology**, v. 24, p. 341-348, 2008.

SOXHLET F. Die gewichtsanalytische bestimmung des milchfettes. **Polytechnisches Journal** . v. 232. P. 461-465.1879.

SPERAZZO, P. BAGHERPOUR, S.. **Comparison of Spirulina growth in tubular bioreactor and open raceway pond.** Abstracts of papers scheduled for the 52ND Annual Meeting of the Phycological Society of America. 1998.

SRIVASTAVA, A.; PRASAD, R. **Triglycerides-based Diesel Fuels.** Pergamon – Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2000.

SUAREZ, P A. Z.; MENEGHETTI, Simoni M. Plentz. 70º aniversário do biodiesel em 2007: evolução histórica e situação atual no Brasil. **Química Nova.** 2007, v.30, p. 2068-2071.

TEIXEIRA, C. M., MORALES, M. E. **Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel.** In: I Congresso da rede brasileira de tecnologia do biodiesel, 2006, Brasília. Anais. Brasília.

THOMPSON, R. A., HARRISON, R. J. WRYTE, J.N.C. (1990): Influence of irradiance on the fatty acid composition of phytoplankton. **Journal of Phycology.** 1990. v.26: p. 278-288.

VERGA REI, P. A. G..**Procedimentos laboratoriais para o controle da qualidade do Biodiesel.** Lisboa. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)..Instituto Superior Técnico. Universidade técnica de Lisboa. 2007.

VIEIRA, S. Produção de biodiesel via esterificação de ácidos graxos livres utilizando catalisadores heterogêneos ácidos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras, 2011.

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

XU, L. *et al* . Preparation of mesoporous polyoxometalate-tantalum pentoxide composite catalyst for efficient esterification of fatty acid. **Catalysis Communications**. v. 9, p. 1607-1611, 2008.

ZAO, G., YU, J., JIANG, F., ZHANG, X., TAN, T. The effect of different trophic modes on lipid accumulation of *Scenedesmus quadricauda*. **Bioresource Technology**. 2012;v.114. p. 466–71.

YING–HU, W., YIN, Y., XIN, L., HONG–YING, H., ZHENG–FENG, S. Biomass production of a *Scenedesmus sp.* under phosphorous–starvation cultivation condition. **Bioresource Technology**. 2012. v.112. p193–198.